



CAPTAR
ciência e ambiente para todos

volume 1 • número 1 • p 11-19

Efeito do Crómio-Cobre-Arsenato (CCA) sobre a função renal no ratinho

O Crómio-Cobre-Arsenato (CCA), um protector da madeira ainda utilizado actualmente, apesar da sua restrição, constitui um perigo para a saúde pública e ambiental. Saliente-se a grande durabilidade da madeira tratada com este produto e a dificuldade em eliminar os resíduos produzidos. O presente trabalho realça efeitos adversos desta mistura na função renal de ratinhos. Procedeu-se à quantificação do arsénio (As) e do crómio (Cr) total nos rins para uma melhor compreensão do padrão de distribuição destes elementos no organismo dos animais de forma a contribuir para a compreensão dos mecanismos de acumulação e depuração do As e Cr. Previamente, validou-se o método analítico, determinando-se a exactidão, precisão e respectivos limites de detecção. Os animais foram divididos em grupos para a administração, por via subcutânea, de CCA, CrO_3 e As_2O_5 . Ao grupo controlo foi administrado soro fisiológico. Após 14h, 24h, 48h e 96h procedeu-se ao abate dos animais para remoção dos rins. Realizaram-se análises histológicas, histoquímicas dos órgãos e foi feita a quantificação do teor destes compostos, nos rins, por espectrometria de absorção atómica com atomização electrotérmica. Os estudos histológicos revelaram necrose tubular nos animais expostos ao CCA e ao CrO_3 . A análise quantitativa demonstrou uma diminuição progressiva da acumulação de Cr e de As nos rins e um padrão de distribuição distinto de Cr e de As nos organismos pertencentes aos diferentes grupos de tratamento. Por fim, o presente trabalho permitiu concluir que a nefrotoxicidade induzida pelo CCA nos ratinhos é muito mais acentuada do que a dos restantes elementos, representando um perigo para a saúde animal e humana.

Palavras-chave

crómio-cobre-arsenato
rim
histologia
necrose tubular
espectrometria de absorção atómica

Rita Cerejeira Matos¹

Catarina Vieira²

Simone Morais²

Maria de Lourdes Pereira^{1*}

Júlio Pedrosa³

¹Departamento de Biologia, CICECO, Universidade de Aveiro.

²REQUIMTE, Instituto Superior de Engenharia do Porto, Departamento de Engenharia Química.

³Departamento de Química, CICECO, Universidade de Aveiro.

*mlourdespereira@ua.pt

ISSN 1647-323X

INTRODUÇÃO

A saúde humana e ambiental tem sido alvo da acção de numerosos agentes de *stress* químico que afectam diversos níveis de organização biológica. O Crómio-Cobre-Arsenato (CCA), um protector químico amplamente utilizado no tratamento da madeira, é um dos exemplos existentes. Esta mistura, formada por arsénio pentavalente (As_2O_5), crómio hexavalente (CrO_3) e óxido de cobre (CuO) (Read, 2003), tem uma acção protectora da madeira relativa aos danos causados por insectos, sol e água. O CCA tipo C, uma das formulações mais utilizadas, é constituído por 47,5% de CrO_3 , 18,5% de CuO e 34% de As_2O_5 (AWPA, 2005).

A madeira tratada com CCA tem sido utilizada para diversos fins, nomeadamente na construção de parques de recreio infantil, docas, cercas, estaleiros, convés de navios, aquacultura e viticultura. Um dos problemas associados à sua utilização prende-se com a libertação de alguns dos seus componentes, potencialmente perigosos para o meio ambiente e para a saúde pública (Nygren et al., 1992). De facto, o potencial carcinogénico do arsénio e do crómio foi demonstrado em inúmeros trabalhos, nomeadamente nos artigos de revisão de Chen e Shin (2002) e de Kitchin (2001). Este problema adquiriu relevância após estudos realizados em parques infantis, entre os quais se destacam os de Solo-Gabriele e Hemond (2005) e Barraj e colaboradores (2007). Nestes trabalhos, os autores relacionaram a probabilidade de libertação de arsénio, do equipamento infantil, com o desenvolvimento de vários processos patológicos. A exposição ao CCA pode ocorrer durante o manuseamento da madeira tratada com este protector e pode estar associada ao equipamento contaminado com este produto (Cocker et al., 2006). Vários estudos em crianças analisaram a libertação do arsénio para a pele e o risco de intoxicação por ingestão, nomeadamente através da saliva (Hamula et al., 2004; Shalat et al., 2006; Shibata et al., 2007; Solo-Gabriele, 2005). A absorção cutânea e a ingestão são as principais vias de intoxicação.

Com o passar do tempo, e em condições de humidade específicas, os elementos constituintes do CCA são lixiviados, podendo ser potencialmente perigosos para o ambiente e para a saúde pública. Apesar de ter sido proibida a sua utilização em Portugal, em 2003, com a aprovação do Decreto-lei 208/2003, de 15 de Setembro, que interditou a utilização de compostos contendo arsénio, o CCA continua a ser utilizado. Acresce-se ainda a grande durabilidade deste produto nas madeiras tratadas (~60 anos) (Shibata et al., 2007) e a dificuldade em eliminar os resíduos produzidos. Desta forma, o perigo para o ambiente e a toxicidade para os seres vivos é um problema de difícil resolução, que persistirá, apesar de este produto ter sido legalmente banido.

Estudos recentes realizados pelo nosso grupo de investigação demonstraram que o CCA e os seus constituintes apresentam um potencial elevado de toxicidade na função renal (Matos 2008; Matos et al., 2009; Matos et al., em impressão). O trabalho que se apresenta pretende evidenciar alguns dos efeitos adversos do CCA e dos seus componentes maioritários na função renal de ratinhos. Para o efeito, estudou-se a toxicidade aguda do CCA no rim e comparou-se com a nefrotoxicidade provocada pelos mesmos teores dos seus componentes químicos quando testados individualmente: As_2O_5 e CrO_3 . A avaliação dos efeitos tóxicos envolveu estudos histológicos e histoquímicos com o objectivo de compreender o efeito destes compostos ao nível celular. Foi ainda utilizada a digestão assistida por microondas no tratamento e processamento das amostras e a análise por Espectrometria de absorção atómica com atomização electrotérmica (GFAAS) para quantificação do arsénio e do crómio total bioacumulado nos rins dos animais.

METODOLOGIA

Preparação da Solução de CCA, As₂O₅ e CrO₃ e Análise da Solução de CCA

A amostra de CCA tipo C foi obtida numa indústria local. Efectuou-se uma diluição de duzentas vezes, com água destilada, e ajustou-se a solução a pH 7. Os teores totais de crómio e de arsénio nesta solução foram determinados por espectrometria de plasma (ICP) e confirmado por espectrometria de absorção atómica (AAS) e por espectrometria de massa, por plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), revelando os seguintes valores: 1034 mg L⁻¹ de crómio, 721 mg L⁻¹ de arsénio e 3 mg L⁻¹ de cobre (Matos et al., 2005). A determinação da especiação do crómio na solução de CCA foi efectuada de acordo com o método de referência (AWWA/APHA/WEF, 1992). Prepararam-se ainda duas soluções, uma de As₂O₅ e outra de CrO₃, contendo os mesmos teores de As(V) e Cr(VI) existentes na solução de CCA, a fim de serem testadas como a seguir se indica.

Animais e Protocolo de Administração do CCA, As₂O₅ e CrO₃

Para este trabalho utilizaram-se ratinhos machos ICR-CD1 (27-40 g), com 2 meses de idade. Os animais foram divididos em grupos de 5 e mantidos em gaiolas apropriadas, e em condições controladas de temperatura (20 ± 2°C), humidade relativa (40-60%), e fotoperíodo 12h^L:8h^E. Os animais tiveram acesso a água e ração *ad libitum*. Todos os animais foram injectados por via subcutânea: os do grupo controlo foram injectados com soro fisiológico. Após a administração de CCA, As₂O₅ e CrO₃ procedeu-se ao abate, após anestesia, do número de animais estritamente necessário para o tratamento estatístico dos dados, às 14, 24, 48 e 96 horas de exposição. De cada animal foram colhidos e pesados os rins para a realização das técnicas histológicas, histoquímicas e análises quantitativas. As amostras para análise dos teores em metais foram congeladas a -20°C.

Estudos Histológicos e Histoquímicos

As amostras de rim para análise histológica e histoquímica foram imediatamente fixadas em solução de Bouin, durante 24 horas, à qual se seguiu a desidratação e inclusão em blocos de parafina. A partir dos blocos efectuaram-se cortes no micrótopo (Leitz 1512) (Figura 1), que foram posteriormente corados com hematoxilina e eosina (H&E). A identificação histoquímica dos polissacarídeos e proteínas foi efectuada pelos métodos do Ácido Periódico – Schiff (PAS) e de indocianina brilhante 6B (IB6B), respectivamente, tal como descrito por Kiernan (1990). Procedeu-se à observação das preparações histológicas usando um microscópio Nikon AFX-Dx, com sistema fotográfico FD-35DX para a análise das lesões.



FIGURA 1: Micrótopo para realização de cortes histológicos.

Estudos Quantitativos

Digestão Assistida por Microondas

As amostras do rim de ratinho foram descongeladas, pesadas e transferidas para o vaso de digestão (m ≈ 300 mg). Estas foram digeridas num microondas apropriado (Figura 2; Marx-X “1500 W Accelerated Reaction System”, CEM, Mathews, NC, USA). Para que a etapa de digestão fosse eficientemente conseguida, efectuou-se primeiramente a secagem das amostras. Este processo foi realizado no mesmo sistema, sem controlo da pressão e temperatura do microondas (durante 10 minutos a 25%, 30% e 35% da potência). As amostras consideraram-se secas quando, em pesagens sucessivas, a diferença de massa da

amostra foi inferior a 0,01 g. Seguidamente, para a etapa de digestão, seleccionou-se o vaso com maior massa de amostra seca, como vaso controlo, pois uma massa superior provoca uma digestão mais violenta no seu interior. Este vaso foi assim usado para se controlar a temperatura e pressão no seu interior por intermédio de sondas. Adicionou-se 10,0 mL de ácido nítrico a cada um dos vasos, que foram posteriormente fechados com cuidado e colocados no carrossel do microondas. Ligaram-se as sondas e seleccionou-se o programa de digestão adequado que foi otimizado com base no protocolo de amostras de rim de rato (Morais e Pereira., 2000; Pereira et al., 1999). Após a digestão e arrefecimento, a uma pressão e temperatura de segurança, retiraram-se os vasos do interior do microondas. As amostras foram transferidas para frascos apropriados, previamente lavados, identificadas e conservadas a -18°C.

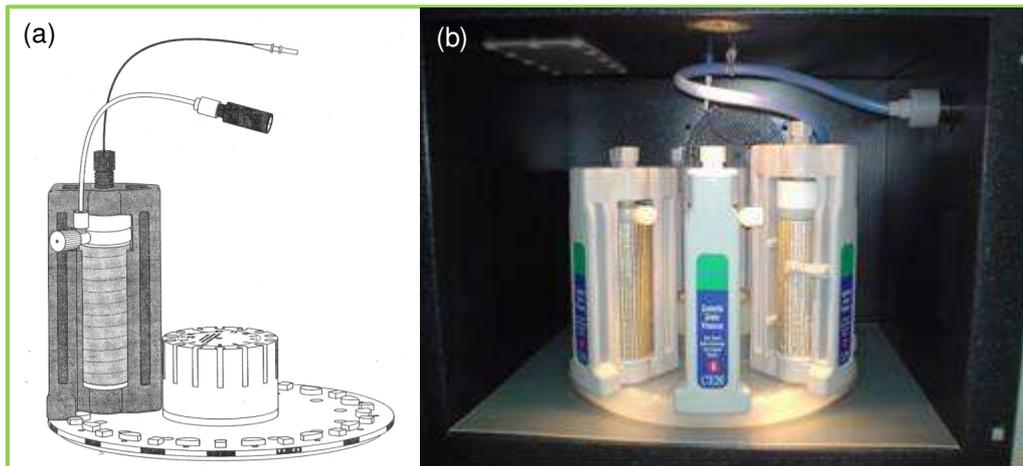


FIGURA 2: 1500 W *Microwave Accelerated Reaction System*: a) Vaso de controlo equipado com sensor de temperatura e de pressão. (b) Disposição do conjunto dos vasos com os sensores dentro da cavidade do microondas.

Análise por Espectrometria de Absorção Atómica com Atomização Electrotérmica

A análise das amostras, para determinação do teor em metais, foi realizada num espectrómetro de absorção atómica (AAS) com atomização em forno de grafite (AnalytikJena, modelo ZEE nit 659), com amostrador e sistema de injeção de amostras automático (AnalytikJena, modelo MPE60) (Figura 3). Os elementos As e Cr foram quantificados nas amostras de rim dos animais submetidos ao tratamento de CCA, As₂O₅ e CrO₃, pelo Método da Curva de Calibração¹, utilizando-se no máximo seis soluções padrão no intervalo 1,25-12,50 µg L⁻¹ para o As e 1,33-30,00 µg L⁻¹ para o Cr. Nas amostras dos organismos de controlo, o As e o Cr foram quantificados pelo Método da Adição Padrão pela Curva de Calibração com seis e cinco adições de solução padrão, respectivamente. Para



FIGURA 3: Espectrómetro de absorção atómica com atomização em forno de grafite.

¹ No Método da Curva de Calibração, vários padrões que contêm concentrações rigorosamente conhecidas de analito são introduzidas no equipamento e o sinal instrumental é registado. Os dados resultantes são então representados graficamente. Curva de calibração é a expressão matemática que melhor define os pontos experimentais.

determinação dos teores em As, o aparelho pipetou 20 µL da amostra biológica digerida (ou da solução mãe padrão, 20 µL) e 5 µL do modificador Pd(NO₃)₂. Para quantificação de Cr, foram utilizados 20 µL da amostra biológica digerida (ou da solução padrão Mãe, 20 µg/L) e 5 µL do modificador Mg(NO₃)₂.

Análise Estatística

Os resultados obtidos foram utilizados para o cálculo de médias ± erros padrão, para o número de animais de cada grupo de tratamento. A análise estatística foi realizada através de Análises de Variância (ANOVAs) de uma via (SigmaStat for Windows Version 3.1., SPSS Inc., USA) e estabeleceu-se como nível para diferenças significativas p <0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos histológicos e histoquímicos

A taxa de sobrevivência dos animais foi de 100% após o período de exposição. Após a administração de CCA (períodos de exposição de 14h e 96h) e de CrO₃ (exposição de 96h), observou-se uma progressiva inatividade dos animais, quando comparados com os dos respectivos grupos controle. Os restantes manifestaram um comportamento normal.

Os resultados demonstraram que o crômio hexavalente e o arsênio pentavalente (administrados sob as formas de CrO₃, As₂O₅ e de CCA) induziram lesões nos túbulos renais. Estas lesões foram caracterizadas pela presença de cilindros hialinos e granulares, e pela degenerescência das células epiteliais ao longo dos túbulos renais (Figura 4).

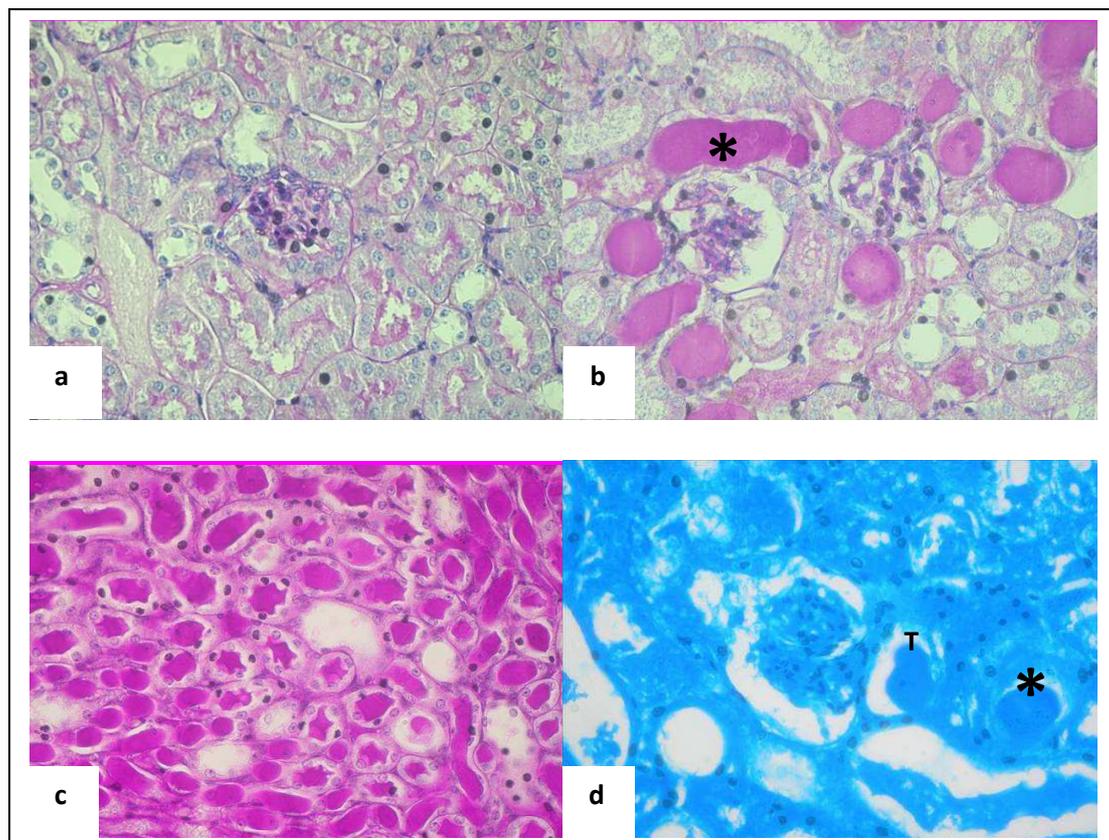


FIGURA 4: Cortes histológicas na região cortical e medular do rim. Colorações PAS (a-c); Coloração IB6B (d); (a) Controle evidenciando estruturas aparentemente normais; as restantes mostram a presença de cilindros hialinos e granulares, evidenciados pelas marcações histoquímicas (b) As₂O₅; (c) CrO₃ (d) CCA. T – Túbulo renal; * – Cilindro hialino.

Através das técnicas histoquímicas comprovou-se a natureza glicoproteica dos cilindros presentes nos túbulos renais. Estes resultados evidenciam necrose tubular aguda (ATN)² para todos os grupos administrados com CCA, e para o grupo de animais administrado com CrO₃, no período de exposição de 96h. Esta lesão caracteriza-se pela diminuição repentina da velocidade de filtração glomerular, pela acumulação de resíduos azotados e pela incapacidade do rim em manter o sódio, os electrólitos, os ácidos e outros componentes essenciais para a sua homeostasia (Esson e Schrier, 2002). Tal como descrito, o rim, pelo seu papel na bio-transformação e eliminação de múltiplos compostos, constitui um órgão alvo de uma grande variedade de metais e metalóides (Ruegg, 1997; Madden et al., 2000).

Estudos Quantitativos

Optimização da metodologia

Neste trabalho optimizou-se o programa de temperatura, tanto para a análise do crómio como para a do arsénio no rim. A amostra, ao ser injectada no forno de grafite passa por várias fases antes da leitura da sua absorvância, tais como secagem, pirólise e atomização. Nestas fases há um aumento gradual de temperatura que difere de elemento para elemento.

Para que a sensibilidade fosse máxima, foi necessário, antes de iniciar as análises, fazer a optimização das temperaturas de pirólise e atomização, assim como, da concentração de modificador, de modo a obter o máximo de absorvância para o analito (elemento químico em análise) e um mínimo sinal dos interferentes. Este procedimento assegura uma maior sensibilidade de leitura e minimiza o efeito da matriz da amostra. Assim, seleccionou-se a temperatura à qual, eficazmente se destrói a matéria orgânica ($T_{\text{pirólise}}$) sem comprometer a formação do vapor atómico dos elementos As e Cr que se formam a uma temperatura óptima ($T_{\text{atomização}}$). Estes átomos foram seguidamente quantificados. As temperaturas que permitem uma determinação mais exacta dos elementos As e Cr são respectivamente $T_{\text{pirólise}}=1100^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{atomização}}=2400^{\circ}\text{C}$ e $T_{\text{pirólise}}=1500^{\circ}\text{C}$, $T_{\text{atomização}}=2450^{\circ}\text{C}$. Os modificadores são compostos químicos introduzidos simultaneamente no tubo de grafite com a amostra e que reduzem drasticamente o efeito de matriz. O principal mecanismo de acção dos modificadores químicos consiste na remoção da matriz da amostra na etapa de pirólise, enquanto o analito a determinar permanece no atomizador. Tal, é alcançado por duas técnicas distintas como, a conversão da matriz da amostra em compostos orgânicos voláteis, ou por uma drástica diminuição da volatilidade dos compostos do analito (o que torna possível a remoção dos compostos não voláteis da matriz, a temperaturas superiores 1000°C).

Neste trabalho utilizou-se como instrumento de determinação dos metais o método da curva de calibração obtida pela adição padrão. Este método consiste na construção de uma curva de calibração em que são adicionados vários padrões a um volume fixo de amostra. Tendo em conta a constituição da amostra digerida ser composta essencialmente por ácido e outros materiais inorgânicos usou-se um volume fixo de ácido nítrico suprapuro.

A técnica analítica GF-AAS revelou-se sensível e exacta aos elementos, apresentando baixos limites de detecção³ ($0,33 \text{ mg L}^{-1}$ para o Cr e $0,35 \text{ mg L}^{-1}$ para o As).

² ATN pode ser induzida pela exposição a agentes tóxicos para o rim ou pela falta de oxigénio nos tecidos, provocando lesões nos túbulos renais.

³ Limite de detecção é a concentração de analito que pode ser detectada com um determinado nível de confiança, e que conduz a um sinal significativamente diferente do branco ou do ruído.

Acumulação do crómio e do arsénio no rim

O doseamento do Cr e As total nas amostras de rim digeridas está sintetizado nas Figuras 5 e 6. Os valores estão expressos em µg/g de massa seca. Pelas figuras é possível verificar que todos os grupos de animais sujeitos aos diferentes tratamentos (e aos diferentes tempos de exposição), apresentaram valores de concentração de Cr e As, significativamente diferentes dos valores exibidos pelo grupo controlo. Como é possível observar pelas concentrações totais de cada um dos elementos, houve uma bioacumulação superior de Cr no rim, comparativamente ao As. Para ambos os elementos verificou-se que as concentrações de Cr e As mais elevadas foram registadas durante os períodos de exposição de 14h e 24h, tanto para os grupos tratados com CCA como para os grupos tratados com Cr(VI) e As(V), sendo as quantidades destes elementos inferiores no rim dos organismos expostos durante 48h e 96h em ambos os grupos. Desta forma, constatou-se que em ambos os grupos de animais (CrO₃-CCA e As₂O₅-CCA) há uma tendência para o decréscimo dos teores de Cr e As acumulados no rim, a partir das 24h, o que poderá resultar da entrada em funcionamento de mecanismos de excreção destes elementos. Constatou-se que as concentrações destes elementos nos animais do grupo controlo se mantiveram baixas e constantes.

Os valores de CCA observados nos rins dos ratinhos contaminados com este composto são superiores aos valores dos grupos tratados com o composto individual CrO₃ para 96h. No entanto, o oposto é verificado no estudo do As. Os grupos tratados com As₂O₅ apresentam valores significativamente inferiores aos valores acumulados nos grupos tratados com CCA.

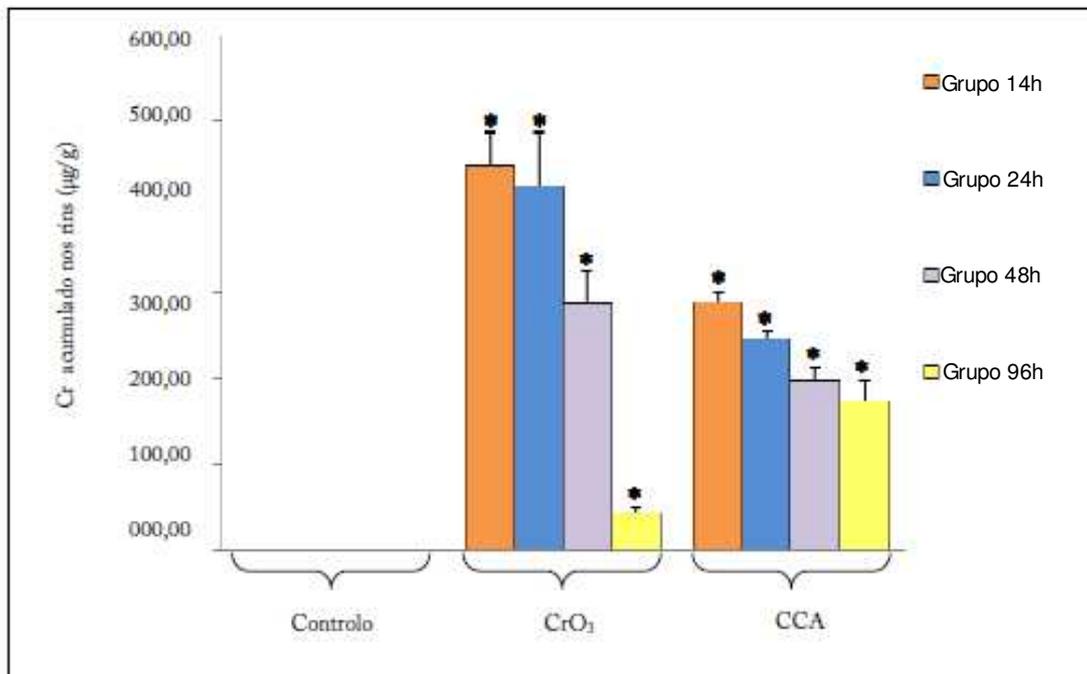


FIGURA 5: Teor de Cr total acumulado nos rins de ratinhos após a administração das soluções de CCA e de CrO₃. Os asteriscos correspondem a diferenças significativas entre os grupos de tratamento e o grupo controlo (p <0,05).

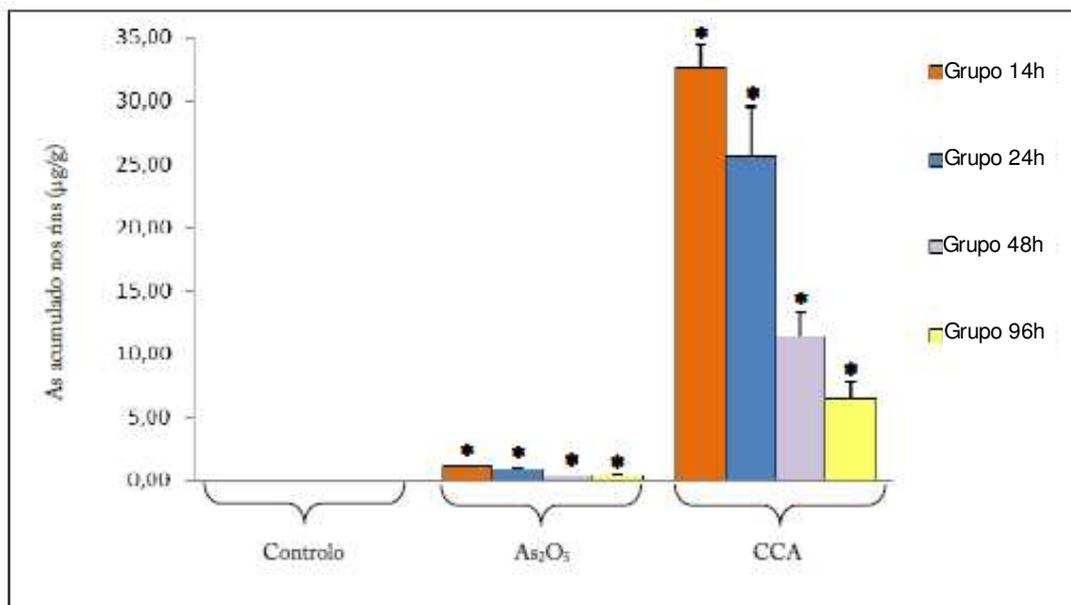


FIGURA 6: Teor de As total acumulado nos rins de ratinhos após a administração das soluções de CCA e de CrO₃. Os asteriscos correspondem a diferenças significativas entre os grupos de tratamento e o grupo controlo (p < 0,05).

APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho confirma a nefrotoxicidade do As₂O₅, CrO₃ e CCA, revelando, este último uma toxicidade mais elevada. Apesar de proibido, o CCA continua a ser utilizado. De qualquer forma, este composto continua a representar um perigo para o ambiente e para a saúde pública, como consequência da sua durabilidade. Por esta razão, e apesar dos ensaios desenvolvidos, torna-se imperioso considerar estudos noutros órgãos vitais, para uma compreensão mais ampla destas misturas perigosas, dada a acumulação de metais no organismo.

agradecimentos • Os autores agradecem ao CICECO parte do financiamento para a realização deste trabalho e à Dr^a. Cristina Delerue-Matos pelas facilidades concedidas na utilização dos equipamentos para a análise quantitativa do crómio e do arsénio nas amostras de rim.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AWPA (2005). Book of Standards. American Wood Preservers' Association, Selma AL, USA.
- AWWA/APHA/WEF (1992). Standard methods for the examination of water and wastewater, 18th ed. Washington DC, 1100 pp.
- Barraj LM, Tsuji JS, Scrafford CG (2007). The SHEDS-Wood Model: Incorporation of Observational Data to Estimate Exposure to Arsenic for Children Playing on CCA-Treated Wood Structures. *Environmental Health Perspectives* 115: 781–786.
- Chen F, Shin X (2002). Intracellular signal transduction of cells in response to carcinogenic metals. *Critical Reviews in Oncology Hematology* 42: 105–121.

- Cocker J, Morton J, Warren N, Wheller JP, Garrod AN (2006). Biomonitoring for chromium and arsenic treatment plant workers exposed to CCA wood preservatives. *Annals of Occupational Hygiene* 50: 517–525.
- Esson ML, Schrier RW (2002). Diagnosis and treatment of acute tubular necrosis. *Annals of Internal Medicine* 137: 744–753.
- Hamula C, Wang Z, Zhang H, Kwon E, Li XF, Gabos S, Le XC (2006). Chromium on the hands of children after playing in playgrounds built from chromated copper arsenate (CCA)-treated wood. *Environmental Health Perspectives* 114: 460–465.
- Kiernan JA (1990). *Histological & Histochemical methods*, 2nd ed. Pergamon Press, Oxford, 433 pp.
- Kim E, Na KJ (1991). Nephrotoxicity of sodium dichromate depending on the route of administration. *Archives of Toxicology* 65: 537–541.
- Kitchin KT (2001). Review: Recent advances in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. *Toxicology and Applied Pharmacology* 172: 249–261.
- Kitchin KT, Ahmad S (2003). Oxidative stress as possible mode of action for arsenic carcinogenic. *Toxicology Letters* 137: 3–13.
- Madden EF, Fowler BA (2000). Mechanisms of nephrotoxicity from metal combinations: a review. *Drug and Chemical Toxicology* 23:1–12.
- Matos RC, Teixeira I, Morais S, Pereira ML, Pedrosa de Jesus J (2005). Chromated Copper Arsenate toxicity in mice models: preliminary studies. In: CICECO, II Jornadas CICECO. Departamento de Química da Universidade de Aveiro, Aveiro, p 80.
- Matos RC (2008). Efeitos do crómio-cobre-arsenato (CCA) em ratinhos: estudos morfológicos e analíticos. Dissertação de Mestrado em Toxicologia. Universidade de Aveiro, Aveiro, 66 pp.
- Matos RC, Vieira C, Morais S, Pereira ML, Pedrosa de Jesus J (2009). Nephrotoxicity of CCA-treated wood: a comparative study with As₂O₅ and CrO₃ on mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 27: 259-263.
- Matos RC, Vieira C, Morais S, Pereira ML, Pedrosa de Jesus J (em impressão). Nephrotoxicity effects of the wood preservative chromium copper arsenate on mice: histopathological and quantitative approaches. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* (doi:10.1016/j.jtemb.2009.03.008).
- Morais S, Pereira MC (2000). Application of stripping voltammetry and microelectrodes in vitro biocompatibility and in vivo toxicity tests of AISI 316 L corrosion products. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 14: 48 – 54.
- Na KJ, Jeong SY, Lim CH (1992). The role of glutathione in the acute nephrotoxicity of sodium dichromate. *Archives of Toxicology* 66: 646–651.
- Nygren O, Nilsson CA, Lindahl R (1992). Occupational exposure to chromium, copper and arsenic during work with impregnated wood in joinery shops. *Annals of Occupational Hygiene* 36: 509–517.
- Pereira MC, Pereira ML, Sousa JP (1999). Individual study of chromium in the stainless steel implants degradation: An experimental study in mice. *Journal of Biomedical Materials Research* 40: 40–47.
- Read D (2003). Report on copper, chromium and arsenic (CCA) treated timber. Environmental Risk Management Authority – New Zealand, 68 pp.
- Ruegg CE (1997). The Renal Proximal Tubule: Factors Influencing Toxicity and Ischemic Injury. In: RC Goldstein (ed.) *Comprehensive toxicology*, Vol. 7 - Renal Toxicology. Pergamon, New York, pp.245 – 257.
- Shalat SL, Solo-Gabriele HM, Fleming LE, Buckley BT, Black K., Jimenez M, Shibata T, Durbin M, Graygo J, Stephan W, Van De Bogart G (2006). A pilot study of children's exposure to CCA-treated wood from playground equipment. *Science of the Total Environment* 367: 80–88.
- Shibata T, Solo-Gabriele HM, Fleming LE, Cai Y, Townsend TG (2007). A mass balance approach for evaluating leachable arsenic and chromium from an inservice CCA-treated wood structure. *The Science of the Total Environment* 372: 624–635.
- Solo-Gabriele HM, Hemond HF (2005). Children's exposure to arsenic from CCA-treated wooden decks and playground structures. *Risk Analysis* 25: 1–5.