

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ANÁLISES CLÍNICAS

TESE DE DOUTORADO

***AVALIAÇÃO DE MUTAGENICIDADE, CITOTOXICIDADE E
EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS A APOPTOSE,
BAK, BCL-2 E P53 FOSFORILADO, EM CÉLULAS TRATADAS
COM FULIGEM E PARTICULADO TOTAL DE QUEIMA DE
CANA-DE-AÇÚCAR***

DOUTORANDA: Mariana Cristina Caloni Peron

ORIENTADORA: Christiane Pienna Soares

2006

LISTA DE ABREVIACÕES

ACN – acetonitrila
CV – Coeficiente de variação
DCM – diclorometano
DNA – ácido desoxirribonucleico
DMSO – dimetilssulfóxido
ED/XRE – energia dispersiva por fluorescência de raio X
FITIC – isotiocianato de fluoresceína
Flu – fluorescência
GC/MS – cromatografia gasosa/ espectometria de massa
HPAs – hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HPLC – high performance liquid chromatography (cromatografia líquida de alta eficiência)
IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry
KDa – quilodalton
m - metro
mg - miligrama
mL - mililitro
MeOH – metanol
Min - minuto
MN – micronúcleo
MTT – 3-(4,5 – dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H – tetrazolium bromide
NaCl – cloreto de sódio
NCEs- eritrócitos normocromáticos
nm – nanômetro
PBS – tampão salina fosfato
PCEs – eritrócitos policromáticos
PTS – particulado total
 R^2 – coeficiente de correlação
ROFA – *Residual Oil Fly Ash*

ROFA/PE - *Residual Oil Fly Ash*, isolado de um precipitador eletrostático

ROFA/HU - *Residual Oil Fly Ash*, isolado do incinerador do Hospital das Clínicas de São Paulo

RQCA – Material particulado de queima de cana-de-açúcar

SFB – soro fetal bovino

Trad MCN – teste do micronúcleo em *Tradescantia pallida*

% - porcentagem

λ_{ex} – comprimento de onda de excitação

λ_{em} – comprimento de onda de emissão

μL – microlitro

$^{\circ}\text{C}$ – graus Célsius

ÍNDICE

___	Revisão de Literatura e Introdução	
	Poluição Atmosférica	09
	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs).....	10
	Queima de Cana-de-Açúcar (RQCA).....	11
	<i>Residual Oil Fly Ash</i>	13
	Poluição Atmosférica e Mutagenicidade.....	14
	Teste do Micronúcleo (MN).....	15
	Teste do Micronúcleo em Planta.....	18
	Citotoxicidade e Apoptose.....	20
___	Justificativa.....	24
___	Objetivos	27
___	Materiais e Métodos	
	Caracterização das partículas da biomassa de cana-de-açúcar e ROFA.....	29
	Coleta da fuligem depositada e ROFA.....	30
	Coleta do material particulado total através do filtro (PTS).....	30
	Análise cromatográfica dos extratos.....	31
	Animais.....	34
	Coleta e processamento do material biológico.....	35
	Coleta e exposição da <i>Tradescantia pallida</i>	36
	Cultura de células.....	37
	Ensaio de MTT.....	38
	Citometria de fluxo (bak, bcl-2 e p53 fosforilado).....	39
	Análise Estatística.....	40
___	Resultados.....	42
___	Discussão.....	61
___	Conclusões.....	68
___	Referências Bibliográficas.....	70
___	Anexo Artigo 1.....	90
	Artigo 2.....	116

ABSTRACT

Ethanol obtained from sugar cane has been considered an alternative fuel. However, in developing countries, the handily harvesting is usually done after to sugar cane burning which is responsible for seasonal emission of air pollutants. The genotoxicity of sugar cane burning residues (SCBRs) and particle surrogates of residual oil fly ash (ROFA) were observed in micronuclei (MN) assay in mouse peripheral blood and bone marrow cells as well as in the pollen mother cells of *Tradescantia pallida* (TRAC-MCN). The micronucleus frequency in peripheral blood was higher 48 hr after administration of the samples and the highest micronucleus frequency was observed in animals receiving 0.03 mg/ml SCBR. The total suspended particulate (TSP) was sampled in harvesting and non-harvesting sugar cane periods, PHAs was extracted and particulate was resuspended. The study also verified cytotoxicity and genotoxicity of cells treated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and suspension, in harvesting and non-harvesting particulated biomass. Residues burning and total suspended particulated (TSP) induced high frequency of MN in mouse red cells and in the TRAD-MCN bioassay. In contrast, MN frequency in bone marrow cells did not show effect at the 24 hr and 48 hr and no time-dose interaction. Cell death and apoptosis signal was verified by MTT assay and flow cytometry of Bak, Bcl-2 and p53 phosphorylated expression were performed in lung carcinoma cell line (A549). Higher frequency of MN was observed in harvesting TSP than non-harvesting and the cell death was higher in cells treated with PHAs in both particulates. Bcl-2 overexpression of p53 phosphorylated low expression was verified in the cells treated with PHAs in harvesting and non-harvesting in 24 and 48 hours after treatment. We can conclude that PHAs presenting in harvesting time, which represents burning sugar cane biomass and non-harvesting time (fuel fossil combustion) are cytotoxic and genotoxic.

Public politics should be discussed to found alternatives which could decrease air pollution emissions.

O etanol obtido da cana-de-açúcar tem sido considerado um combustível alternativo. Entretanto, em países em desenvolvimento, a colheita de cana é realizada manualmente depois da queima, sendo responsável pela emissão sazonal de poluentes atmosféricos. A mutagenicidade dos resíduos de queima de cana (RQCA) e as partículas presentes na ROFA (*residual oil fly ash*) foram observados nos ensaios de micronúcleo em células sanguíneas de camundongos e de células mãe de grão de pólen de *Tradescantia pallida* (TRAC-MCN). A frequência de micronúcleo foi maior em sangue periférico em 48h pós-tratamento e a mais alta frequência foi observada em animais que receberam 0.03 mg/ml de RQCA. O particulado total (TSP) foi coletado no período de safra (queima de cana) e entressafra (combustão de combustível fóssil), os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) extraídos e o particulado. O estudo também verificou a citotoxicidade, apoptose e genotoxicidade nas células tratadas com extrato orgânico contendo grande quantidade de HPAs e suspensão na biomassa do período de safra e entressafra. TSP induziu alta frequência de MN em células sanguíneas de camundongo e no ensaio TRAC-MCN. Por outro lado, a frequência de MN, em células da medula óssea, não demonstrou efeito em 24 e 48 h após o tratamento e sem efeito dose-resposta. A morte celular e sinais de apoptose foram verificados pelo ensaio de MTT e por expressão de Bak, Bcl-2 e p53 fosforilado (por citometria de fluxo) em linhagens celulares de carcinoma pulmonar (A549). Uma alta frequência de MN foi observada no TSP do período de safra que na entressafra e a porcentagem de células mortas foi maior em células tratadas com extrato orgânico contendo grande quantidade de HPAs e particulado. Elevada expressão de Bcl-2 e baixa expressão de p53 fosforilado foi verificado em células tratadas com extrato orgânico contendo grande quantidade de HPAs no período de safra e entressafra e em 24 e 48h pós-tratamento. É possível concluir que os HPAs presentes no período de safra e entressafra

são genotóxicos e citotóxicos. Políticas públicas deveriam ser discutidas para se buscar alternativas que diminuam a emissão desse poluente.

Poluição Atmosférica

A poluição do ar tem sido foco, por séculos, de diversas discussões sobre seu impacto na saúde humana. A população das cidades da antigüidade usava madeira como fonte de energia e o uso do carvão contribuiu para a Revolução Industrial, constituindo-se a base da nossa atual sociedade tecnológica. Infelizmente, em associação íntima com os benefícios advindos dos avanços tecnológicos, convivemos com uma proporcional degradação do meio ambiente (BLIMBESCOMBE, 1999; WARK et al., 1998).

Atualmente o ar nas grandes cidades é comumente contaminado por uma variedade de poluentes originados de fontes fixas e móveis, principalmente por queima de combustível fóssil. O mais importante poluente emitido no ar é o material particulado com composição variada, incluindo metais pesados e gases, como carbono, nitrogênio, óxido sulfúrico e hidrocarbonetos. Esses particulados emitidos têm ação genotóxica sobre os organismos vivos, contribuindo usualmente para mutagenicidade celular (SCARPATO et al., 1993). Associações entre concentrações de partículas e os efeitos na saúde humana têm sido bastante pesquisadas e presume-se que a mutagênese presente nas células possa contribuir para o desenvolvimento do câncer (CURY et al., 2000; SOARES et al., 2003). Essas moléculas de vários tamanhos são inaladas e alcançam diferentes regiões do trato respiratório e algumas doenças respiratórias e pulmonares estão associadas, e podem ser agravadas, por inalação de material particulado ou gases poluentes do meio ambiente (BUSCHINI, et al., 2001; DOCKERY et al., 1994; KLEEGERGER et al., 1998 e SCHWARTZ et al., 1993).

Embora a percepção sobre os malefícios da poluição atmosférica seja observada desde o século XIII, a elaboração de leis que minimizem o seu impacto ao meio ambiente

somente aconteceu em anos recentes (considerando a história da humanidade), quando o problema passou a ser documentado.

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

Dentre as moléculas consideradas mutagênicas e/ou carcinogênicas, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) ocupam lugar de destaque nos estudos ambientais e biológicos.

Os HPAs constituem uma família de compostos caracterizada por possuírem dois ou mais anéis aromáticos condensados. Essas substâncias, bem como seus derivados nitrados e oxigenados, têm ampla distribuição e são encontrados como constituintes de misturas complexas em todos os compartimentos ambientais (WHO, 1998; PEREIRA NETTO et al., 2000). Os HPAs podem ser encontrados em plantas terrestres e aquáticas, solos, sedimentos, águas naturais e marinhas e, particularmente, na atmosfera (TAO et al., 2004).

Os HPAs representam uma classe importante de poluentes ambientais, que são conhecidos por sua ação mutagênica e/ou carcinogênica, cujas lesões são resultantes das ligações com o DNA. As principais fontes desses compostos nocivos são provenientes da emissão de material particulado da queima de plantações agrícolas ou da madeira queimada em fogão a lenha, combustão do carvão, incêndio de florestas e motores de veículos (LEWTAS et al., 1992). A partir dos estudos de Miller e Miller (1971), houve a expansão do conhecimento sobre o metabolismo dos HPAs, estabelecendo-se que esses compostos não são ativos na forma em que são ingeridos ou inalados, tornando-se reativos apenas após serem convertidos enzimaticamente, por meio de reações específicas do metabolismo.

Queima da cana-de-açúcar (RQCA)

A queima da cana-de-açúcar tem sido considerada como um poluente atmosférico das regiões canavieiras de São Paulo. Trata-se de uma prática antiga, realizada no passado por agricultores primitivos, a fim de agilizar e facilitar o trabalho de corte e desponte manual da cana na época da colheita. Na colheita de cana verde (não queimada), as folhas são muito densas, aumentando os riscos de acidentes entre os trabalhadores e estes ficam também suscetíveis a ataques de abelhas, cobras, aranhas e escorpiões. A prática agrícola da queima é um procedimento ainda utilizado nos dias atuais, principalmente em regiões de grande desnivelamento de solo, onde a colheita mecânica não é utilizada pelo risco de tombamento das máquinas (GONÇALVES, 2000; MAGALHÃES e BRAUNBECK, 2001). Em Araraquara, a queima ocorre anualmente no período de safra, e os produtos de combustão ficam dispersos no ar atmosférico sob a forma de fuligem e gases. Segundo UNEP et al. 1995; os resíduos de cana-de-açúcar representam 11% da produção mundial de resíduos agrícolas, cuja queima produz substancial liberação de CO₂ e, durante o processo de combustão, são liberados também outros gases. Os gases N₂O e NO_x são gerados na fase de combustão com a chama, sendo que e os gases CO e CH₄ são formados sob condições de queima com predomínio de fumaça. Ainda, a alta emissão de gases CO_x, NO_x e SO_x é responsável pela poluição atmosférica e a diminuição da qualidade do ar na região (ALMEIDA-FILHO, 1995).

Em função das pressões sociais e do entendimento que o produto de queima de cana, quando inalado, causa transtornos à saúde dos indivíduos expostos, em 06 de agosto de 1997, foi regulamentado o decreto n.º 42.056 que institui o Plano de Eliminação de Queima (PEQ). Esse plano surgiu de pressões sociais alusivas às condições desfavoráveis

da qualidade do ar com a prática de queima de cana, instituindo a legal obrigatoriedade da coleta mecanizada. Entretanto, tal medida provocou enorme insatisfação entre os produtores de cana-de-açúcar do estado de São Paulo, culminando na aprovação de novo projeto de lei em 02 de maio de 2002. Esta nova lei possui proposições mais tolerantes em relação às áreas de restrição à queima e garantiu a dilatação do prazo para implementação da colheita mecanizada para 15 anos (GONÇALVES, 2000).

Em face à insatisfação de determinados segmentos da sociedade e o não cumprimento da lei pelos produtores sucro-alcooleiros, proliferam-se ações judiciais contra a prática da queima da cana no estado de São Paulo (GONÇALVES, 2000). Questões de ordem sócio-econômica são os principais argumentos para a manutenção da queima de cana em Araraquara, embora a cidade seja classificada como área adequada à mecanização, pois os canaviais estão distribuídos em terrenos planos. Em contrapartida, a adoção da colheita mecanizável poderá alterar todo sistema de produção da cana-de-açúcar, tradicionalmente conhecida pelo grande número de empregos gerados no período de safras. Estima-se que somente para as áreas potencialmente mecanizáveis, o número de desempregados somaria cerca de 90.000, apenas no estado de São Paulo, caso a prática de queima fosse substituída pela mecanização da cana crua (ORPLANA, 1996; SILVA, 1997). Outro problema, com a implantação da colheita mecanizada é o desempenho do maquinário, possibilitando menor quantidade de cana colhida quando comparada à obtida após a queima. Dessa forma, o baixo volume do material recolhido na colheita mecanizada de cana verde não garante boa produtividade, deixando os produtores pouco estimulados (MAGALHÃES e BRAUNBECKER, 2001). Diante do exposto, a prática de queima de cana é ainda uma realidade, bastando observar a deposição de fuligem por toda a cidade de Araraquara e regiões adjacentes.

Diversos trabalhos têm apontado efeitos nocivos dos poluentes atmosféricos sobre a saúde dos indivíduos expostos, principalmente sobre o trato respiratório, o qual sofre ação direta desses efeitos da poluição atmosférica (ARBEX, 2000; BERALDI, 1999; FERREIRA, 1999; MAZZINI, 2002; e MORETI, 1998). A relação entre o aumento da concentração atmosférica de material particulado e a necessidade de terapia inalatória foi observada. Os indivíduos submetidos à exposição à fuligem de queima de cana-de-açúcar procuravam com maior frequência hospitais e postos de saúde para terapia inalatória (ARBEX et al., 2000). Estudos anteriores de nosso laboratório demonstraram a relação entre processos inflamatórios agudos, com aumento de bactérias e leveduras, em esfregaços citológicos corados do lavado nasal de indivíduos expostos à fuligem da queima de cana-de-açúcar em Araraquara (BERALDI, 1999; FERREIRA, 1999; MAZZINI, 2002; MORETI, 1998 e TELLAROLLI et al., 2003).

Residual Oil Fly Ash (ROFA)

Um outro poluente é a ROFA (Residual Oil Fly Ash), um material particulado rico em metais e outras substâncias, as quais são oriundas de diferentes processos de combustão, podendo ser encontradas em caldeiras de siderúrgicas ou incineradores. Esse material é freqüentemente utilizado como controle positivo para estudos de genotoxicidade, uma vez que a sua composição rica em metais pesados é, em geral, altamente mutagênica aos organismos vivos expostos, comparadas a outras fontes de poluição (CHEN et al., 2003). Estudos prévios demonstraram que a ROFA ocasiona danos pulmonares agudos, inflamação e fibrose em roedores expostos (DREHER et al., 1997; JASKOT et al., 1996). O potencial mecanismo pelo qual a ROFA induz esses efeitos nocivos pode estar envolvido

com o desenvolvimento de uma sobrecarga oxidativa, gerada pelos metais pesados existentes nesse poluente e pela perda das defesas antioxidantes de células e tecidos alvos (HAUSER et al., 1998; JIANG et al., 1999).

Poluição Atmosférica e Mutagenicidade

O material particulado, oriundo de poluentes atmosféricos, contém um grande número de substâncias genotóxicas capazes de induzir efeitos deletérios no homem por via inalatória (BRUNEKREEF et al., 2002). Centenas de componentes têm sido identificados no material orgânico veiculado no ar atmosférico, o que dificulta a avaliação do efeito individual mutagênico ou carcinogênico dos elementos no ser humano. Entre as partículas dispersas no ar, as menores e aquelas que conseguem atingir os pulmões são geralmente as mais mutagênicas (CERNÁ et al., 1999).

Dependendo do sítio de deposição dos poluentes inalados e da solubilidade dessas partículas, as células do trato respiratório ficam diretamente expostas por tempo significativo. Desta forma, os agentes mutagênicos, contidos nestas partículas permanecem aderidos às células epiteliais, favorecendo sua ação genotóxica sobre as mesmas (ARBEX et al., 2004). Quando inaladas, as maiores partículas mutagênicas podem ser literalmente engolidas e, devido à sua propriedade de solubilidade, são posteriormente absorvidas pelo intestino e alcançam a circulação sistêmica. Esse risco poderá ser iminente na dependência da susceptibilidade do tecido alvo (TOKIWA e OHNISHI, 1986).

Vários ensaios biológicos com animais de laboratório têm sido realizados e muitos desses estudos sugerem o potencial mutagênico e/ou carcinogênico do ar atmosférico urbano (BUSCHINI et al., 2001; MEDEIROS JR et al., 2004; SEATON et al., 1995 e

SWENBERG e BEAUCHAMP, 1997). Agentes mutagênicos ou pró-mutagênicos podem ser ativados ou desativados pelo metabolismo de animais expostos. A forma ativada pode ligar-se ao DNA ou a outras macromoléculas em órgãos alvos, causando alterações genéticas (ONG et al., 1985). Estudos prévios têm demonstrado que uma ampla extensão de íons metais pesados, incluindo cromo, ferro, cobre e níquel, são sabidamente mutagênicos (CHEN and THILLY, 1994; REID et al., 1994). A maioria destes íons não forma aductos com o DNA, e seus efeitos mutagênicos são provavelmente similares àqueles ocasionados pela presença de espécies reativas de oxigênio, ocasionando danos genômicos e mitocondriais (BORM, 1997; HEBERT e LUIKER, 1996 e MENZIES et al., 2001). O biomonitoramento de população humana exposta a altos níveis de poluentes urbanos revela risco genotóxico, com aumento na incidência de danos cromossômicos (BOLOGNESI et al., 1997; HEMMINKI et al., 1994). Entretanto, até o momento, são escassos os estudos avaliando efeitos genotóxicos do material particulado da queima de cana-de-açúcar (RQCA) e de ROFA, em especial, utilizando a técnica de micronúcleo (MN).

Teste do Micronúcleo (MN)

O teste do micronúcleo (MN) foi utilizado pela primeira vez em plantas por EVANS et al. (1959) e, posteriormente, em medula óssea de ratos, sendo idealizado como um método citogenético quantitativo para avaliar a frequência de danos cromossômicos “in vivo” em células nucleadas (HEDDLE, 1973; SCHMIDT et al., 1975; VANPARYS et al., 1992). Este teste permite a correlação entre a formação de MN, na medula óssea ou em eritrócitos periféricos, e os danos genéticos nas células expostas ao agente genotóxico (RODGERS e BAKER, 2000).

O micronúcleo é literalmente um núcleo pequeno, considerado um produto de quebra do DNA genômico de células eucarióticas. Durante a divisão celular, o material genético é duplicado e igualmente distribuído entre as duas células filhas. As radiações e as substâncias químicas podem ocasionar quebras ou dano cromossômicos, afetando a distribuição do material genético entre as células filhas. Partes ou fragmentos de cromossomos resultantes desse dano podem ser distribuídos a qualquer uma das células filhas. Não sendo incorporados ao novo núcleo, estes podem se apresentar sob a forma de micronúcleo claramente observável à microscopia óptica comum.

Heddle et al. (1991) afirmaram que os micronúcleos são originados de fragmentos acêntricos de cromossomos ou danos cromossômicos os quais são ocasionados por: a) perda mitótica de fragmento acêntrico; b) ação mecânica ocasionando quebra cromossômica; c) danos cromossômicos ocasionados por falha no filamento mitótico durante a anáfase ou d) apoptose.

Davies et al. (1998) postularam que no momento da identificação da frequência de micronúcleos de células nucleadas, alguns critérios devem ser seguidos: a) ser morfolologicamente idênticos, porém menor do que o núcleo da célula e com refração similar; b) ter diâmetro entre 1/3 a 1/6 do tamanho do núcleo; c) ter a forma ovalada ou arredondada. A frequência de MN depende do tipo de células avaliadas, por exemplo, em células epiteliais da mucosa oral e vaginal de seres humanos, estima-se que possa ocorrer de 0 a 1 MN por 2000 células analisadas (GÁTTAS et al., 1992; RAMIRES et al., 1999). Em contrapartida, a quantidade espontânea de micronúcleos em células de medula óssea é um evento raro, com frequência de 1 a 3 MN/1000 células em homens, 0 a 6 MN/1000 células em mulheres (BOLOGNESI et al., 1997; FENECH, 1998; TOMETSKO et al., 1995).

Devido a sua simplicidade, confiabilidade e sensibilidade, o teste tem sido adequado para a avaliação de mutagenicidade de compostos químicos oriundos do meio ambiente, os quais podem exercer atividade clastogênica (capacidade de indução de quebra cromossômica), aneugênica (capacidade de alterar o fuso mitótico resultando na perda de cromossomo), ou ambas (TOROUS, et al., 1998). Assim, o teste do MNs é recomendado pelo OECD (Organization for Economic CO-Operation & Economic Development) como requerimento para testar a genotoxicidade de novos produtos químicos (VANPARYS, et al., 1992). A presença de MN em células vegetais, medula óssea ou em eritrócitos periféricos é indicativo de danos genéticos nas células expostas a poluentes (BATALHA et al., 1999; RODGES e BAKER, 2000).

De acordo com MAVOURNIN et al. (1990), o período mínimo de aparecimento de MN é de 6 h, tempo em que deve transcorrer a absorção do agente mutagênico no camundongo, sua metabolização no estágio final do ciclo celular, a eliminação do núcleo do eritroblasto e o aparecimento dos micronúcleos nos eritrócitos da medula óssea, incluindo o atraso que pode ocorrer no ciclo de divisão. Cerca de 12-24 h depois do tratamento com o agente mutagênico os eritrócitos presentes na medula óssea correspondem aos descendentes das células que foram expostas antes da divisão celular (HAYASHI et al., 2000).

Inúmeros estudos toxigenéticos baseiam-se em avaliar danos cromossômicos em eritroblastos de camundongos e ratos, podendo ser facilmente visualizados em eritrócitos policromáticos (células jovens). Contudo, Schlegel e Macgregor (1982) posteriormente demonstram que o pico de incidência de micronúcleos em eritrócitos normocromáticos em sangue periférico (eritrócitos maduros, anucleados) são similares aos da medula óssea. Estes resultados trouxeram avanços para os estudos relacionados à

mutagenicidade, pois além de não haver necessidade do sacrifício dos animais de laboratório, pode servir como técnica de biomonitoramento em seres humanos (HAYASHI et al., 2000).

Teste do MN em Plantas

As plantas são reconhecidas como excelentes indicadoras de efeitos genotóxicos induzidos por compostos químicos do meio ambiente, sendo aplicáveis na avaliação de mutagênese ocasionada por fatores ambientais. Os testes são altamente confiáveis com alta sensibilidade para o monitoramento da mutagenicidade de compostos químicos, incluindo o material particulado de poluição atmosférica (SUMITA et al., 2003). Estudos prévios sobre a atividade mutagênica de compostos químicos e agentes físicos utilizaram várias espécies e clones do gênero *Tradescantia*. Essa planta é, em geral, eleita para estudos de mutagenicidade por apresentar uma série de características genéticas favoráveis, como por exemplo, apenas seis pares de cromossomos grandes e facilmente observáveis, bem como a presença de células passíveis de observação em quase todas as partes da planta, da raiz ao tubo polínico (MA e GRANT, 1982).

A *Tradescantia*, família Commelinaceae, geralmente chamada de erva-da-fortuna, é uma planta herbácea que se encontra amplamente distribuída em todo o mundo, crescendo em campos de regiões subtropicais ou em estufas. É uma planta pequena (algumas espécies têm menos que 50 cm de altura), sendo um modelo favorável para estudos citogenéticos, pois tem a capacidade de sustentar seu estado reprodutivo e aumentar o brotamento e as flores para suplementar a falta de luz durante os dias curtos de inverno (MA, 1981). No estado de São Paulo, a *Tradescantia pallida* (Rosa) cv. purpurea é largamente distribuída

em jardins de ornamentação, margens de estrada e ruas, devido a sua natural resistência e fácil propagação (BATALHA et al.; 1999). Esta mesma planta também pode ser encontrada em jardins de parques públicos e ruas de Araraquara. Pelo menos quatro características são selecionadas como indicadores em bioensaios de avaliação de toxicidade genética. Dois desses ensaios, o da mitose em ponta de raiz e o do tubo polínico, permitem avaliar as frequências de aberrações cromossômicas (MA, 1982). Um terceiro ensaio, o da mutação para célula cor-de-rosa do pelo estaminal (Trad-SHM) é um teste de mutação gênica em células mitóticas, que se baseia na expressão fenotípica de um gene recessivo para a cor da flor em plantas heterozigotas (UNDERBRINK et al., 1973). O quarto ensaio é um teste citogenético que se baseia na formação de micronúcleos (Trad-MCN) que resultam da quebra cromossômica nas células meióticas geradoras do pólen (MA, 1979).

Alguns sistemas indicadores têm definido o teste de MN em plantas como teste de mutagênese de tipo II (ENNEVER et al.; 1998), ou seja, que apresentam alta sensibilidade e baixa especificidade. Os bioensaios que empregam sistemas vegetais são consideradas testes do tipo II, com especial frequência para ensaios do micronúcleo e de pêlo estaminal em *Tradescantia*, bem como o ensaio do grão de pólen ceroso em milho (ENNEVER et al.; 1998). A abundante informação básica sobre a genética e o desenvolvimento de *Tradescantia* oferece uma sólida estrutura de suporte para o seu uso como bioindicador para ensaios de toxicidade genética ambiental (MA e GRANT, 1982). Micronúcleos nas células-mãe dos grãos de pólen são facilmente observáveis, permitindo um baixo grau de incerteza nas avaliações. Adicionalmente, os ensaios com *Tradescantia* têm se mostrado valiosos nos estudos de agentes químicos e físicos e outros agentes genotóxicos, como por exemplo, as radiações, sendo importantes na avaliação de riscos da exposição (SHIMA e ICHIKAWA, 1995).

Estudos prévios demonstram que o bioensaio Trad-MCN pode ser uma ferramenta útil na avaliação de danos genômicos de células expostas a poluentes atmosféricos (ALVES et al, 2003). O número de MN em plantas é diretamente proporcional a altas concentrações de poluentes urbanos, demonstrando que o teste Trad-MCN pode avaliar o potencial mutagênico de poluentes atmosféricos (GUIMARÃES et al, 2000). Entretanto, até o presente não existem estudos utilizando a análise de MN em *Tradescantia pallida* e material particulado oriundo de queima de cana-de-açúcar e ROFA.

Citotoxicidade e Apoptose

A avaliação dos elementos traços da fuligem de queima de cana-de-açúcar indicam considerável quantidade de metais pesados e de transição (PERON et al, submetido em Junho de 2005). Estudos prévios demonstram que os metais induzem mutagenicidade e poderiam contribuir para a carcinogênese (SUMITA et al., 2003, MORISHITA et al., 2004). A exposição celular aumentada a certos metais (Cr, Cu) pode induzir dano ao DNA, enquanto a exposição à Zn e Cd pode inibir a apoptose, sugerindo um aumento na sobrevivência de células geneticamente mutadas e alto risco de câncer nas populações expostas (CHUKLOVIN et al., 2001). Ainda, a presença de diversos compostos, incluindo metais e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos presentes na poluição atmosférica, induz toxicidade nas células expostas, resultando em aumento de apoptose dependente das concentrações utilizadas (ZAMPERLINI, et al., 2000; HETLAND et al, 2004).

O evento de morte celular pode ocorrer por necrose e apoptose, que podem ser diferenciado pela morfologia e vias bioquímicas celulares (COTRAN, et al., 2000). A necrose é uma forma metabolicamente passiva de morte e ocorre quando a célula não pode

manter a homeostase. Há em seguida, a liberação de componentes intracelulares e resposta inflamatória, as quais promovem o intumescimento celular, digestão aleatória do DNA, cariólise, perda da integridade da membrana, e por fim lise celular (SARASTE 2000, PULKKI 2000; MELLO et al., 2001). Em contrapartida, a apoptose é uma forma energeticamente ativa de morte celular, caracterizada por alterações no citoesqueleto, com contração celular, sem perda de integridade da membrana e sem resposta inflamatória (LAVIN, 1993).

A apoptose é ativada por vias normais ou por vários estímulos (COTRAN et al., 2000) e sua ativação por compostos químicos pode ocorrer por via extrínseca e intrínseca. Os sinais pró-apoptóticos convergem para uma única via central, por meio da ativação de caspases sinalizadoras que, por ação proteolítica, atuam sobre caspases efetoras, clivando proteínas celulares vitais e levando a morte celular (AUBERT 2001; BLAHO 2001). A via intrínseca é a mais comum de apoptose, sendo ativada pela própria célula como uma resposta ao estresse gerado pelo dano, envolvendo a liberação do citocromo c, que é um cofator essencial para ativação das caspases e é regulada pela família das proteínas Bcl-2 que ativa a cascata de caspases (SÁNCHEZ-ALONSO et al, 2004). Bcl-2 é uma proteína de 26 KDa, produto de um proto-oncogene localizado no cromossomo 18, que faz parte da família de proteínas bcl-2, a qual possui cerca de vinte membros identificados até o momento, sendo que cada uma delas apresenta duas ou mais isoformas. Todas essas proteínas estão associadas à face interna da membrana plasmática, retículo endoplasmático e mitocôndrias (HOCKENBERY et al., 1990). O mecanismo de apoptose é regulado pela expressão de proteínas com função antagônica, denominadas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas. As proteínas bax, bak, bcl-Xs, bad, bid têm função pró-apoptótica, enquanto as

proteínas bcl-2, bcl-Xl, Bcl-w, Mcl-1, PARP-1 (poli-ADP-ribose polymerase) têm função anti-apoptótica (KORSMEYER, 1999).

Até o presente, nenhum estudo foi realizado anteriormente para avaliar apoptose e necrose, bem como, a expressão quantitativa de apoptose da via intrínseca, em linhagem celular de pneumócitos humana (A549), expostas aos extratos aquoso e orgânico (DCM : MeOH) extraídos da queima de cana-de-açúcar.

JUSTIFICATIVA

A cana-de-açúcar era predominantemente produzida no Nordeste, havendo no Brasil duas colheitas anuais: uma no Norte-Nordeste e outra no centro-Sul. Na década de 70, com a crise do petróleo, o Brasil, iniciou o Programa Proálcool (desenvolvimento do álcool, extraído da cana-de-açúcar como combustível alternativo). Tal programa que recebeu grande incentivo, com a produção de 4 milhões de carros movidos a álcool, tendo o declínio nos anos 1990 e com maior incentivo no governo. A necessidade de ampliar a produção de cana-de-açúcar para atender o programa Proálcool, iniciou o deslocamento paulatino da produção na direção Centro-Sul. A cultura de cana expandindo-se por todos os estados brasileiros, principalmente em São Paulo, Pernambuco e Alagoas. No estado de São Paulo, para atender a demanda de produção de álcool, houve o aumento de produção de cana-de-açúcar seguida de expansão e modernização das usinas, aumento da área plantada, agilização da colheita e o transporte do produto.

Ocorre em todo Centro-Sul do Brasil, a prática conhecida como queima da cana, no período de safra (maio a outubro) no qual o ar atmosférico recebe material particulado que se deposita sobre os carros e casas. Embora haja legalmente a proibição da queima de cana em distâncias inferiores a um quilômetro do perímetro urbano, esta ainda é uma realidade em Araraquara. A questão é: distâncias superiores ou limítrofes garantiriam a ausência ou menor disseminação dos poluentes pelo vento aos centros urbanos? E se disseminados, tais poluentes ocasionariam realmente distúrbios de saúde nos indivíduos expostos? Acredita-se que os produtos de combustão do álcool sejam comprovadamente menos tóxicos que os emitidos pela combustão da gasolina. Porém, deve-se ponderar que o uso do álcool como combustível menos poluente pode representar uma melhor condição atmosférica nos grandes centros urbanos e um decréscimo da higidez dos locais de colheita de cana-de-açúcar. Isto poderia significar cerca de 1 milhão de trabalhadores incapacitados no Brasil

com o processo de queima da cana. Além disso, estes poluentes são transportados, por deslocamento das massas de ar, a locais distantes da produção, influenciando assim regiões remotas.

Ainda são escassos os trabalhos que avaliam o efeito da queima de cana, entretanto existem evidências de seus efeitos nocivos, demonstrados por estudos que encontraram relação direta entre o número de intercorrências respiratórias e aumento da terapia inalatória durante o período de safra. A emissão de gases tóxicos durante a queima e sob a ação dos raios ultravioleta, resulta na liberação de grandes quantidades de ozônio, cuja toxicidade potencializa os efeitos perniciosos desse poluente. Ainda, a presença de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e uma variedade de compostos químicos na biomassa de queima de cana-de-açúcar aponta para a possibilidade de mutagênese e/ou carcinogênese nos indivíduos expostos.

A ação mutagênica do material particulado de queima de cana-de-açúcar alerta para seu potencial efeito carcinogênico, considerando que os danos de DNA e a instabilidade genômica são capazes de induzir transformação maligna. A caracterização de ação mutagênica da biomassa de queima retoma a preocupação com medidas de biomonitoramento e políticas para regular os níveis de emissão, ou alternativas para evitá-la. Dessa forma, o presente estudo poderá contribuir com informações importantes sobre a mutagenicidade dos poluentes oriundos da queima de cana. Uma vez que a associação entre queima de cana e mutagenicidade em modelos experimentais se torne consistente, faz-se necessário caracterizar a variabilidade de efeitos entre os indivíduos de um mesmo nicho, buscando-se marcadores de susceptibilidade. Com isso, abordagens preventivas e terapêuticas serão dirigidas de acordo com a particularidade individual dos indivíduos expostos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Verificar a mutagenicidade de material particulado oriundo da queima de cana-de-açúcar (RQCA), utilizando a metodologia de micronúcleo em células animais e vegetais.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Comparar o potencial mutagênico da fuligem depositada e o material particulado de incinerador e caldeira (ROFAS), utilizando o ensaio de micronúcleo em células de sangue periférico e de medula óssea de camundongos Balb-c, bem como, células mãe de grão de pólen de *T.pallida*.
- 2) Verificar a frequência de micronúcleos induzida por fuligem depositada e o material particulado de incinerador e caldeira (ROFAS), em função da concentração e do tempo de exposição a esses poluentes.
- 3) Avaliar a viabilidade celular e citotoxicidade do extrato de particulado total, contendo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, nos períodos de entressafra e colheita de cana-de-açúcar, em função da concentração e do tempo de exposição.
- 4) Avaliar a expressão quantitativa das proteínas pró-apoptóticas (Bak) e anti-apoptótica (Bcl-2) e de *checkpoint* p53 fosforilado, na célula A549 exposta ao extrato do particulado total, contendo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, em função da concentração e do tempo de exposição.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta da Fuligem Depositada e ROFA (*Residual Oil Fly Ash*)

O material particulado depositado da queima de cana-de-açúcar (RQCA) foi coletado em recipientes de plástico cilíndrico com 16 cm de diâmetro que foram instalados a 50 m do solo em um edifício localizado no centro da cidade de Araraquara. Os recipientes ficaram expostos durante todo o período de junho a novembro de 2003 sendo a fuligem recolhida a cada 24 horas. Estes recipientes continham aproximadamente 2 cm de água para evitar que a fuligem depositada fosse ressuspendida. Para o presente estudo foram também utilizados material particulado obtido, respectivamente, do precipitador eletrostático de uma usina siderúrgica, aqui denominada ROFA/PE e do incinerador do Hospital da Universidade de São Paulo (USP) movido a óleo combustível, denominado ROFA/HU.

Coleta do Material Particulado Atmosférico Total – através de filtro (PTS)

Para a coleta do material particulado do ar atmosférico através do filtro de fibra de vidro (Energética) com 5 cm de diâmetro, o equipamento portátil HANDI_VOL foi instalado em ponto estratégico no centro da cidade de Araraquara na sacada de um edifício a 50m do solo (Figura 1) longe de outros edifícios e com altura superior a das árvores (Figura 2) e aproximadamente 8 a 10 quilômetros dos canaviais (Figura 3), durante o período de janeiro a novembro de 2005 sendo recolhido 1 filtro a cada 24 horas.



Figura 1 – Imagem obtida por satélite do centro da cidade de Araraquara, a seta aponta o edifício onde o aparelho para coleta do material particulado ficou instalado.



Figura 2 – Aparelho portátil HANDI-VOL instalado na sacada do edifício localizado no centro da cidade.



Figura 3 - Imagem obtida por satélite de Araraquara e os canaviais que circundam a cidade, a seta aponta o local onde os filtros foram coletados.

Os filtros foram pesados antes e depois da amostragem para a determinação da massa do particulado que foi aspirada. O volume de ar amostrado, corrigido pelas condições padrão (25°C, 760 mmHg), foi determinado a partir da vazão medida e do tempo de amostragem. A concentração do material particulado em suspensão no ar ambiente foi obtida, dividindo-se a massa de partículas coletadas pelo volume de ar amostrado expressa em microgramas por metro cúbico ($\mu\text{g}/\text{m}^3$). O equipamento HANDI-VOL é capaz de medir a concentração de partículas na faixa de 2 a $750 \mu\text{g}/\text{m}^3$.

Os filtros foram processados de duas formas diferentes, com intuito de verificar o potencial mutagênico deste material extraído em solução salina e diclorometano (DCM): metanol (MeOH) (4:1).

Para extração em solução salina $\frac{1}{4}$ de cada filtro foi cortado em pedaços pequenos e colocados em um Erlenmeyer com 50ml de solução salina 0,85% de NaCl. Em seguida o Erlenmeyer foi colocado em banho de ultrassom (Unique, modelo T50220) por 30 minutos. Os pedaços de filtro foram removidos e a suspensão obtida foi diluída para as exposições.

Para extração em diclorometano (DCM): metanol (MeOH) (4:1) os $\frac{3}{4}$ restante dos filtros utilizados para extração em solução salina foram também cortados em pedaços pequenos e colocados em um Erlenmeyer com 50ml DCM : MeOH 4:1 (RÉ-POPPI; SANTIAGO-SILVA,2002). O Erlenmeyer foi colocado no banho de ultrassom por 30 minutos e posteriormente foi realizada a filtração em filtro de seringa 0,45 μ m (Corning). O filtrado foi concentrado em rotaevaporador à 40°C até volume aproximado de 5 ml, sendo posteriormente evaporado até secura sob fluxo leve de nitrogênio. O resíduo obtido foi ressuspendido em dimetilssufóxido (DMSO) e diluído para a exposição.

Caracterização das partículas da biomassa (depositado) de cana-de-açúcar e ROFA

A composição das partículas coletadas foi determinada por análise de ativação de nêutrons. Esta técnica foi realizada no IPEN (Instituto de Pesquisa Energética e Nuclear - USP de São Paulo) e consiste basicamente em preparar as soluções diluídas simples ou multi-elementares, utilizando as soluções padrão certificadas de Spex Certiprep. As alíquotas destas soluções padrão foram pipetadas sobre tiras de papel de filtro Whatman n.º40. Após a secagem à temperatura ambiente, em um dessecador, estas tiras de papel

foram colocadas em invólucros de polietileno. As massas dos elementos nestes padrões variaram de 0,6 a 1000 microgramas.

O procedimento de análise por ativação consistiu em irradiar cerca de 100 mg da amostra pesados em invólucro de polietileno, juntamente com os padrões sintéticos no reator IEA-R1 do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) por 8 horas e sob fluxo de nêutrons térmicos de $4 \times 10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. As medições das atividades gama foram realizadas após 4 dias de decaimento, usando um detector de Ge hiperpuro Modelo GX2020 acoplado a um processador integrado de sinais, Modelo 1510, ambos da Canberra. A resolução do sistema utilizado foi de 0,99 keV para o pico de 121,97 keV do ^{57}Co e de 1,89 keV para o pico de 1332,97 keV do ^{60}Co . Os espectros gama obtidos foram processados, utilizando o programa de computação VISPECT2, o qual foi desenvolvido no próprio laboratório. Os radioisótopos formados foram identificados pela meia vida e energia dos raios gama e as concentrações dos elementos foram calculadas pelo método comparativo (De SOETE et al., 1972). Os resultados foram calculados na base seca do material. A percentagem de perda de peso obtida na secagem da RQCA e ROFA por cerca de 15 horas a 85°C foi de 4,5%.

Análise cromatográfica dos extratos orgânicos

- **HPLC/Fluorescência**

Foi utilizado o equipamento HPLC *Pro Star* com injetor automático (*Model 400*) e detector de fluorescência (*Model 360*) da Varian (Walnut Creek, USA). As curvas de calibração foram construídas após a injeção da mistura dos 13 HPAs estudados. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do sistema analítico utilizado podem ser vistos na

Tabela 1. Estes limites foram calculados segundo o preconizado pela IUPAC (CURRIE, 1999). As curvas analíticas para todos os HPAs apresentaram $R^2 > 0,99$ e CV do fator de resposta menor que 10%.

Tabela 1: Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para o sistema HPLC/Flu (Andrade,2000)

HPA	LD (pg)	LQ (pg)
Fenantreno	16,2	54
Antraceno	0,94	3,1
Fluoranteno	58,7	196
Pireno	4,41	14,7
Benzo[a]antraceno	5,67	18,9
Criseno	33,3	111
Benzo[e]pireno	3,43	11,4
Benzo[e]acefenantrileno	3,63	12,1
Benzo[k]fluoranteno	0,56	1,87
Benzo[a]pireno	10,2	34
Dibenzo[a,h]antraceno	120	400
Benzo[g,h,i]perileno	107	357
Indeno[1,2,3-cd]pireno	33,2	111

Foram obtidas as equações das retas, nas quais se interpolou as áreas dos picos obtidos nos cromatogramas dos extratos do material particulado ressuspensos em volume adequado de solvente. As condições cromatográficas utilizadas para determinação analítica dos HPAs foram as seguintes (ANDRADE, 2000):

Coluna: Supelcosil LC-PAH (C18) (25 cm X 4,6 mm, 5 μ m) da Supelco (Milwaukee, USA).

Eluente: Acetonitrila (ACN) e água

Gradiente: 40% ACN $\xrightarrow{5}$ 40% ACN $\xrightarrow{25}$ 90% ACN $\xrightarrow{15}$ 100%

ACN $\xrightarrow{2}$ 100%ACN

Vazão: 1,5 mL .min⁻¹

Volume de injeção: 30 μ L

λ_{ex} 240 nm (Todos os HPAs, exceto o indeno [1,2,3- cd]pireno que utiliza λ_{ex} 300nm)

λ_{em} 398 nm (Todos os HPAs, exceto o indeno [1,2,3- cd]pireno que utiliza λ_{em} 466nm)

- **GC/MS**

Para a confirmação da presença de HPAs nos extratos foi utilizado o equipamento GC (3800) com injetor automático (8200 cx) acoplado a um espectrômetro de massas (Saturn 2000) da Varian, considerando que a sensibilidade do GC/MS é muito menor que a sensibilidade do HPLC/Fluorescência para quantificação dos HPAs (ESCRIVÁ et al., 1994). O resíduo foi ressuspenso em volume adequado de acetonitrila (ACN) e o extrato foi injetado nas seguintes condições (ZAMPERLINI et al., 1997):

Coluna: CP Sil 8 CB (30 m X 0,25 mm, 25 μ m) (5% difenil e 95% dimetil polisiloxano) (Chrompack-Varian)

Gás de arraste: Hélio

Vazão: 1,0 mL. min⁻¹

Rampa de aquecimento do forno: 90 °C (1min) $\xrightarrow{10}$ 120 °C $\xrightarrow{4}$ 310 °C (20 min)

Temperatura do *trap*: 210 °C

Volume de injeção: 1µL

Animais

No presente estudo foram utilizados 120 camundongos machos do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - USP, tratados com ração (NUVITAL) e água estéril, mantidos em gaiolas com maravalha também estéril. Esses animais foram separados em doze grupos: dois grupos controle negativo, dois grupos controle positivo e oito grupos teste. No grupo controle negativo foi injetado 0,2mL de salina estéril por via intraperitoneal e nos grupos controle positivo foi injetado 0,2 mL de ciclofosfamida em concentração de 25mg/Kg (CSGMT, 1995; MACGREGOR et al., 1983). Nos grupos testes foram injetados 0,2ml de material particulado RQCA de 0,3 mg/ml e 0,03 mg/ml de salina e material particulado de ROFA/HU e ROFA/PE na concentração de 3,0 mg/ml de salina, todos materiais depositados.

Cada grupo de animais (n= 12) recebeu as soluções por via intraperitoneal, sendo a metade deles sacrificados em 24 h após a injeção e a outra metade após 48 h, segundo protocolo modificado de MAVOURNIN et al., (1990).

Coleta e processamento do material biológico

- **Teste de MN em Eritrócitos do Sangue Periférico**

Sangue periférico (10 µl) de cada camundongo foi coletado de por punção caudal e em seguida foram confeccionados os esfregaços de cada animal. Esses esfregaços foram fixados em metanol absoluto (Merck) por 10 minutos e hidrolisados em ácido clorídrico (HCl- Merck) 1N por mais 10 minutos. Após esse procedimento, os mesmos foram corados

pelas técnicas de Feulgen e Fast Green (Merck) e os micronúcleos foram avaliados por microscopia óptica comum.

As lâminas foram codificadas e avaliadas em teste cego com objetiva de imersão. A frequência de micronúcleos foi obtida através da quantificação de 3.000 eritrócitos por lâmina, em cada animal, nos seis grupos avaliados.

- **Teste de MN em Eritrócitos de Medula Óssea**

Os animais dos seis grupos foram sacrificados após 24 e 48 horas pós-tratamento e tiveram o fêmur retirado, a epífise proximal cortada e a medula óssea removida segundo protocolo modificado por ZAMBRANO et al., (1982). A medula óssea foi lavada com soro fetal bovino, centrifugada a 1000 rpm, por 5 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento ressuspensionado. Uma gota do sedimento foi transferida para uma lâmina, o esfregaço confeccionado por distensão e, corado pelo método de Giemsa. Os esfregaços foram observados em microscópio óptico comum e o número de micronúcleos foi estabelecido em 1.000 eritrócitos por lâmina, em cada animal, nos seis grupos avaliados.

Coleta e exposição da *Tradescantia pallida*

As plantas foram coletadas dos jardins da Faculdade de Medicina da Universidade São Paulo – USP e os talos contendo as inflorescências jovens foram coletados 24 horas antes do início do tratamento. Nesse período, os talos permaneceram em Beckers, contendo água deionizada sob constante aeração com ar filtrado para um período de adaptação. Todas as plantas que murcharam foram eliminadas nesse momento, e somente os talos túrgidos e com inflorescências em expansão foram tratados. As exposições foram realizadas, com o

material particulado diluído em solução nutriente de Hoagland triplamente diluída (DOWS e HELLMERS, 1975). Como controle negativo foram utilizados talos mantidos em solução salina e talos tratados com formol 10.000 ppm foram utilizados como controle positivo. Para os grupos teste, as concentrações foram similares às aquelas utilizadas em eritrócitos de camundongos. O tempo de exposição foi de 8 horas, segundo o protocolo proposto por MA (1988). Após o tratamento, as inflorescências foram removidas dos talos, fixadas em solução de ácido acético/etanol por 24 horas e então preservadas em etanol 70%. Num primeiro momento foram testados os materiais depositados, coletados pelo depósito da fuligem em baldes. Na continuidade do estudo novos testes foram realizados, agora expondo os talos ao material extraído do filtro com DCM:MeOH e com salina.

- **Teste de MN em Inflorescência de *Tradescantia pallida***

Para contagem de micronúcleos, os botões jovens abertos foram removidos das inflorescências, e as anteras maceradas com solução corante aceto-carmim. Somente lâminas contendo tétrades intactas, com um máximo de 20% de células rompidas, foram avaliadas. A contagem foi realizada em aumento de 400X, e a frequência de micronúcleos foi obtida após a quantificação de um grupo aleatório de 300 tétrades/ planta nos diferentes tratamentos, e posterior análise estatística (MA, 1979; MA, 1981).

Cultura de células

Para os ensaios biológicos foi utilizada a linhagem de célula epitelial respiratórias-pneumócitos tipo I (A549), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meio Ham's F12, acrescido de 100 µL de penicilina e estreptomicina,

bicarbonato de sódio e 10% de soro fetal bovino (Cultilab). As células foram cultivadas em garrafas e mantidas a 5% de CO₂ e a temperatura de 37 °C até a formação de monocamada celular, depois as células foram submetidas à tripsinização. Para isso foram lavadas com 1ml de solução ATV de tripsina (diluição 1:250, Instituto Adolfo-Lutz de São Paulo), que foi descartada e as linhagens submetidas à nova tripsinização com 1 mL de ATV até que houvesse o desprendimento do fundo das garrafas. As células foram homogeneizadas com 4 a 5 mL de meio acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) para a neutralização da tripsina. O volume da suspensão celular obtido em uma garrafa foi transferido para outras duas garrafas, de modo a obter quantidade celular adequada para os experimentos. As células foram tratadas com os 3 mg e 0,3 mg/mL de RQCA filtrado. Como controle positivo, todas as linhagens celulares foram tratadas com doxorubicina na concentração de 15 µg/mL. Como controle negativo, as linhagens não foram expostas aos poluentes propostos no presente estudo. E como controle de veículo. As células foram tratadas com meio acrescido de DMSO 3%.

- **Viabilidade Celular**

Os materiais particulados de RQCA filtrado foram submetidos a ensaios preliminares para estabelecimento de curva dose resposta na indução de morte celular avaliada pelo teste de viabilidade (GABLER, et al, 2002). O ensaio de viabilidade celular foi realizado utilizando método de coloração supravital Azul de Trypan, após o tratamento das linhagens celulares e dos controles nos tempos de 12, 24 e 48 horas de exposição. O número de células mortas (coradas em azul) foi quantificado em Câmara de Neubauer e expressa em porcentagem de morte celular.

2.5. Ensaio de MTT

A citotoxicidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT, que mede a habilidade das células vivas de reduzirem 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) a sais de formazana de cor violeta após o tratamento. As células foram cultivadas em placas de 96-well plates, a 2.5×10^4 células/well e cultivado com Ham's F12 contendo 10% de soro fetal bovino (SFP) até a aderência das células (24 h). As células foram então tratadas com os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) isolados do particulado total do período de safra e entressafra em diferentes concentrações (0,3 e 3,0 mg/mL) e tempos de tratamento (12, 24 e 48 h) em meio sem soro. O meio livre de soro foi removido e as células foram lavadas uma vez com PBS. Em seguida, as células foram incubadas com 10 µL de MTT por 3 h, a 37°C, o meio foi removido e os cristais de formazana foram solubilizados com dimetilssulfóxido (DMSO), 3%. O ensaio de MTT foi realizado em triplicata e a absorbância medida a 540nm no leitor de placas Bio-Tek Powerwave X (BioTek Instruments, Inc.,USA). Cada tratamento (0.3 e 3.0mg/mL) e tempo de tratamento (12, 24 and 48 h) foram acompanhados de um controle positivo (doxorubicina 15 µg/ml), controle negativo (células não-tratadas) e controle de veículo (DMSO 3%). A viabilidade celular, em cada tratamento, foi calculada a partir da fórmula matemática abaixo:

$$\text{Células mortas (\%)} = \frac{\text{Absorbância do Controle Negativo} - \text{Absorbância do Testes}}{\text{Absorbância do Controle Negativo}} \times 100$$

Citometria de Fluxo (Bak, Bcl-2 e p53 fosforilado)

A expressão quantitativa (Bak, Bcl-2 e p53 fosforilado) foi avaliada por citometria de fluxo, estabelecida através da intensidade de fluorescência verde, utilizando o equipamento FACScalibur (Becton Dickinson, USA). As células A549 (2.5×10^4 cell/1.0mL/well) foi cultivada em placas de 24 wells, em meio de cultura Ham's F12 com 10% de SFB, por 24 h. As células foram tratadas com duas diferentes concentrações de extrato orgânico contendo grande quantidade de HPAs (0,3 e 3,0mg/mL), isolados de particulado total no período de safra e entressafra e nos tempos de 12, 24 e 48 h. Após o tratamento, o meio de cultura foi substituído por um meio novo e as células foram incubadas por mais 24 horas. Em seguida, as células foram tripsinizadas, transferidas para microtubos estéreis e incubadas com saponina 0,5% em PBS, por 30 min, a temperatura ambiente. Depois da incubação, as células foram lavadas por 3 vezes em PBS e centrifugadas a 10 000 rpm, 4 °C (p53 fosforilado) ou a temperatura ambiente (Bak e Bcl-2), por 15 min. As células foram incubadas com anticorpo monoclonal anti-Bcl-2 (diluído para 1:200, DAKO, Glostrup, Denmark), anti-Bak (diluído para 1:200 DAKO), e p53 fosforilado (diluído para 1:3000, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), a 4 °C, *overnight*. As células foram lavadas cuidadosamente por várias vezes com PBS e centrifugadas a 10 000 rpm, 4 °C (p53 fosforilado) ou a temperatura ambiente (Bak e Bcl-2), por 15 min. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo secundário conjugado com FITC (diluído para 1:60, SIGMA), por 1 h, a temperatura ambiente. A seguir, as células foram lavadas 3 vezes em PBS e fixadas em paraformaldeído 1% in PBS. Como controle positivo, as células foram tratadas com 15µg/mL de doxorubicina (Bak e Bcl-2) ou 10 µg/mL de metotrexato (p53). Como controle negativo, as células não foram tratadas e como controle

de veículo, as células foram tratadas com DMSO 3%. Todos os controles foram realizados para cada tratamento (0,3 e 3,0mg/mL) e tempo (12, 24 e 48 h).

Análise estatística

A avaliação estatística foi realizada através da análise da frequência absoluta de MN em eritrócitos de sangue periférico, medula óssea e células mãe do grão de pólen de *Tradescantia pallida*. Foi utilizado o teste de Student-Newman-Keuls para análise *pos-hoc*, em nível de significância de 5%, utilizando o programa estatístico SPSS v10.0. Os resultados da frequência de MN em células de *Tradescantia pallida* tratadas com material particulado total contendo grande quantidade de HPA , foram analisados utilizando-se o software InStat Mac 2.01 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). Para avaliação da proporção da expressão imunocitoquímica para Bak, Bcl-2 e p53 foi utilizado o teste z entre os grupos de células expostas e não expostas a RQCA utilizando o programa Sigmastat.

A composição de elementos traço contidos no material particulado de RQCA, ROFA/HU e ROFA/PE depositado estão representados pelos valores médios e desvio padrão e demonstrados na tabela 2. Comparando-se os elementos encontrados entre os particulados, é possível observar que o particulado de RQCA possui alta quantidade de Ti, Mn, Na, Zn, enquanto a ROFA/HU apresenta maior quantidade de La, Zn, Ce, Nd e a ROFA/PE de Br, Rb, Zn e Cr. Ainda, os elementos Ti, Mn e V foram observados apenas no particulado de RQCA e, por sua vez, Zn, Rb e La foram detectados em todos os particulados analisados no presente estudo. Estudos anteriores foram realizados substâncias contendo estes elementos para testar a o potencial carcinogênico ou a toxicidade em diferentes modelos experimentais (HEBERT et al., 1996; ROTH, ZECHLINSKI e MARTINO-ROTH, 2002). Material particulado, contendo alto teor metal, é reconhecidamente agentes causadores de danos oxidativos do DNA, resultando na mutagenicidade e/ou carcinogênese de células e organismos expostos (KIM et al, 2004). Ainda, particulados oriundos de produtos de combustão contribuem para a dispersão de V, S, e Se associados a alta mortalidade dos indivíduos expostos (GRAHAME e HIDY, 2004).

Tabela 2 - Concentrações de elementos traço obtidas pelo método de análise instrumental por ativação com nêutrons.

Elements	Samples			Detection Limit Values
	SCBR (n=3)*	ROFA/UH (n=1)	ROFA/EP (n=1)	
As, $\mu\text{g kg}^{-1}$	601 ± 27	9.3 ± 1.0	61.0 ± 1.0	5.2
Br, $\mu\text{g g}^{-1}$	6.6 ± 0.7	8.7 ± 0.6	1482 ± 19	0.020
Ca (%)	6.9 ± 0.3	0.59 ± 0.04	5.4 ± 0.2	0.077
Cl, (%)	0.34 ± 0.05	ND	ND	0.005
Co, $\mu\text{g kg}^{-1}$	2039 ± 196	122.9 ± 3.1	9.96 ± 0.25	2.1
Cr, $\mu\text{g g}^{-1}$	8.1 ± 0.5	32.4 ± 0.4	107.7 ± 1.4	0.014
Cs, $\mu\text{g kg}^{-1}$	846 ± 24	0.58 ± 0.04	9.96 ± 0.25	0.28
Fe (%)	8.7 ± 0.6	3.28 ± 0.07	44.6 ± 0.1	0.0016
K (%)	5.6 ± 0.1	ND	ND	0.04
La, $\mu\text{g g}^{-1}$	33 ± 1	972 ± 12	10.3 ± 0.1	0.04
Mg, (%)	2.2 ± 0.2	ND	ND	0.12
Mn, $\mu\text{g g}^{-1}$	1728 ± 123	ND	ND	0.7
Mo, $\mu\text{g g}^{-1}$	2.6 ± 0.4	ND	ND	1.5
Na, $\mu\text{g g}^{-1}$	365 ± 46	NA	NA	0.10
Rb, $\mu\text{g g}^{-1}$	57 ± 1	11.4 ± 1.1	719.7 ± 1.0	2.7
Sb, $\mu\text{g kg}^{-1}$	305 ± 112	39.8 ± 0.7	2.27 ± 0.09	1.0
Sc, $\mu\text{g kg}^{-1}$	2487 ± 192	1.111 ± 0.007	1.91 ± 0.01	0.33
Se, $\mu\text{g kg}^{-1}$	540 ± 65	20.5 ± 0.2	154.4 ± 0.8	15.7
Ti, $\mu\text{g g}^{-1}$	2144 ± 6	ND	ND	50
V, $\mu\text{g g}^{-1}$	29 ± 3	ND	ND	14
Zn, $\mu\text{g g}^{-1}$	101 ± 5	115.7 ± 1.5	491.9 ± 3.1	3.1
Hf, $\mu\text{g g}^{-1}$	NA	1.64 ± 0.03	0.62 ± 0.07	0.10
Th, $\mu\text{g g}^{-1}$	NA	3.07 ± 0.03	1.50 ± 0.06	0.09
U, $\mu\text{g g}^{-1}$	NA	ND	2.28 ± 0.14	0.30
Ce, $\mu\text{g g}^{-1}$	NA	51.1 ± 0.4	16.3 ± 0.3	0.35
Nd, $\mu\text{g g}^{-1}$	NA	33.1 ± 2.9	9.3 ± 1.6	4.5
Sm, $\mu\text{g g}^{-1}$	NA	2.69 ± 0.08	2.30 ± 0.07	0.008

ND -Não detectado nas condições de análise.

NA – Não analisado.

(*) – As incertezas das análises foram calculadas considerando erros nas medidas das taxas de contagens da amostra e corrosão.

Os resultados da frequência de micronúcleos em sangue periférico de camundongos entre os diferentes grupos e nos diferentes tempos de tratamento estão demonstrados na tabela 3. Os micronúcleos são observados nos eritrócitos normocromáticos corados pelo método de Feulgen - Fast Green (figura 4A). Efeito significativo ($p < 0,001$) foi observado entre os diferentes tempos de tratamento e o tempo de tratamento associado à interação entre os grupos ($p = 0,01$). Para os três grupos a frequência de micronúcleos foi maior após 48 horas de administração das partículas tóxicas. Embora os resíduos de queima *indoor* estejam associados ao desenvolvimento do câncer de pulmão (SMITH e LIU, 1993) e laringe (CLIFFORD, 1972), pouco se conhece sobre os efeitos desses particulados em ambientes cujo nível de poluentes é resultante de queimas esporádicas. A maioria do conhecimento sobre o risco carcinogênico e potencial mutagênico da poluição atmosférica foram desenvolvidos a partir de estudos de emissão de combustíveis fósseis (BUSCHINI et al., 2001; BURGAZ et al., 2002 e CARVALHO-OLIVEIRA et al., 2004). Interessantemente, a maior frequência de MN em sangue periférico foi de camundongos tratados com RQCA de menor concentração (0,03 mg/ml). A partir desse resultado poderíamos sugerir que em menor concentração as partículas de RQCA apresentariam menor agregação, tornando a resposta imune celular do animal incapaz de retirar o particulado, aumentando o impacto mutagênico desse poluente (ARBEX et al., 2004). De fato, partículas ultrafinas são capazes de se organizar em pequenos grupamentos, resultando na deposição do particulado nos pulmões de ratos expostos (KAPP et al., 2002).

Tabela 3: Média ($\pm$ desvio padrão) da frequência de MN em células de sangue periférico

Tempo de Tratamento	Tratamentos	Frequência de MN $\pm$ DP	Células analisadas
Tempo 0	Controle Negativo	0.111 $\pm$ 0.010	9000 ^a
	Controle Positivo	0.500 $\pm$ 0.024	10 000
	RQCA 0.3	0.400 $\pm$ 0.163	10 000
	RQCA 0.03	0.444 $\pm$ 0.176	9 000 ^a
	ROFA PE	0.250 $\pm$ 0.250	8000 ^b
	ROFA HU	0.222 $\pm$ 0.147	9000 ^a
24 hr	Controle Negativo	0.222 $\pm$ 0.222	9000 ^a
	Controle Positivo	1.400 $\pm$ 0.427	10 000
	RQCA 0.3	1.625 $\pm$ 0.625	8000 ^b
	RQCA 0.03	0.889 $\pm$ 0.351	9000 ^a
	ROFA PE	1.000 $\pm$ 0.327	8000 ^b
	ROFA HU	0.888 $\pm$ 0.260	9000 ^a
48 hr	Controle Negativo	0.600 $\pm$ 0.221	10 000
	Controle Positivo	1.700 $\pm$ 0.700	10 000
	RQCA 0.3	1.400 $\pm$ 0.636	10 000
	RQCA 0.03	3.500 $\pm$ 0.108	10 000
	ROFA PE	1.556 $\pm$ 0.280	9 000 ^a
	ROFA HU	2.111 $\pm$ 0.735	9 000 ^a

.RQCA = Resíduo de queima de cana-de-açúcar; ROFA/HU = Resíduo do incinerador do Hospital das Clínicas – SP; ROFA/PE = Resíduo do precipitador eletrostático. Tempo de exposição: $p < 0,001$; Tempo de exposição x Grupo: $p = 0,01$.

^a um animal do grupo morreu

^b dois animais do grupo morreram

A frequência de micronúcleos em células em eritrócitos policromáticos da medula óssea dos camundongos está demonstrada na tabela 4. Na figura 4B é possível observar o MN em eritrócito policromático de medula óssea corado pelo Giemsa. Não foi observado efeito dose-resposta ($p > 0,05$) e, esse comportamento, não é muito fácil de caracterizar visto que ambos os particulados, RQCA e ROFA possuem vários elementos químicos. Dessa forma, fica difícil concluir quais desses vários elementos químicos poderiam ser responsáveis pelos efeitos mutagênicos observados nesse estudo. Entretanto, a detecção de resultados positivos nos outros ensaios utilizando partículas de RQCA depositadas, sujeitas a procedimentos mínimos de extração, merece ser notificada, visto que esses poluentes poderiam representar um risco de desenvolvimento de câncer nas populações continuamente expostas.

Tabela 4: Média ($\pm$ desvio padrão) da frequência de MN (expressa em porcentagem) em células de medula óssea tratada com material particulado depositado.

Tempo de Tratamento	Tratamento	PCEs/ NCEs (%)	Média (MN/PCEs) $\pm$ DP	Células analisadas
24 hr (*)	Controle Negativo	0.49	0.222 $\pm$ 0.147	9000 ^a
	Controle Positivo	0.39	1.200 $\pm$ 0.327 *	10 000
	RQCA0.3	0.55	0.875 $\pm$ 0.441 *	8000 ^b
	RQCA 0.03	0.52	1.222 $\pm$ 0.434 *	9000 ^a
	ROFA PE	0.45	0.750 $\pm$ 0.250 *	8000 ^b
	ROFA HU	0.47	0.875 $\pm$ 0.330 *	9000 ^a
48 hr (**)	Controle Negativo	0.83	0.600 $\pm$ 0.221	10 000
	Controle Positivo	0.39	1.500 $\pm$ 0.477 **	10 000
	RQCA0.3	0.51	0.900 $\pm$ 0.433 **	10 000
	RQCA 0.03	0.53	2.400 $\pm$ 0.686 **	10 000
	ROFA PE	0.55	1.111 $\pm$ 0.261 **	9 000 ^a
	ROFA HU	0.46	1.444 $\pm$ 0.530 **	9 000 ^a

RQCA = Resíduo de queima de cana-de-açúcar; ROFA/HU = Resíduo do incinerador do Hospital das Clínicas – SP; ROFA/PE = Resíduo do precipitador eletrostático. Não houve diferença significativa entre o tempo de exposição e entre os grupos em relação tempo. (*) e (**) $p < 0,0001$, salina *versus* RQCA (0.3 e 0.03), ROFA/HU E ROFA/PE. ^a um animal do grupo morreu , ^b dois animais do grupo morreram

A frequência de micronúcleos observados em células mãe dos grãos de pólen de *Tradescantia pallida* está demonstrada na tabela 5. Nas tétrades selecionadas e coradas com aceto-carmim é possível observar vários micronúcleos (figura 4C) e em maior aumento na figura 4D. Foi observada diferença significativa de frequência de MN entre os grupos ($p <$

0,001) e na análise pelo teste Student-Newman-Keul post hoc essa diferença foi principalmente entre os grupos: salina e RQCA 3,0 mg/ml, RQCA 3,0 mg/ml e ROFA/HU e, finalmente, RQCA 0,3 e ambos os tipos de ROFA. Esses resultados demonstram que os particulados (RQCA e ROFA) possuem ação mutagênica também observado no ensaio de MN em *Tradescantia pallida* (TradMCN). No Brasil, o monitoramento da mutagenicidade de vários agentes pelo método TradMCN tem sido utilizado com sucesso (SUMITA et al., 2003). Comparativamente, o bioensaio com Trad MCN poderia ser mais fácil de ser realizado, visto que os modelos animais exigem grande quantidade, maior tempo de tratamento, estratégia de manipulação e sacrifício dos camundongos e maior número de MN/animal/esfregaço devem ser contados para a validação do teste (CSGMT, 1995)

Tabela 5: Frequência de MN ($\pm$ desvio padrão) observada em células mãe do grão de pólen de *Tradescantia pallida*.

Tratamentos	Média $\pm$ DP	N
Controle Negativo	0.14 $\pm$ 0.06	13
Controle Positivo	4.70 $\pm$ 1.05*	10
RQCA 0.3	2.18 $\pm$ 0.35*	13
RQCA 0.03	5.53 $\pm$ 1.04*	15
ROFA PE	4.90 $\pm$ 1.07*	10
ROFA HU	3.43 $\pm$ 0.70*	11

RQCA = Resíduo de queima de cana-de-açúcar; ROFA/HU = Resíduo do incinerador do Hospital das Clínicas – SP; ROFA/PE = Resíduo do precipitador eletrostático. (*) $p < 0,001$.

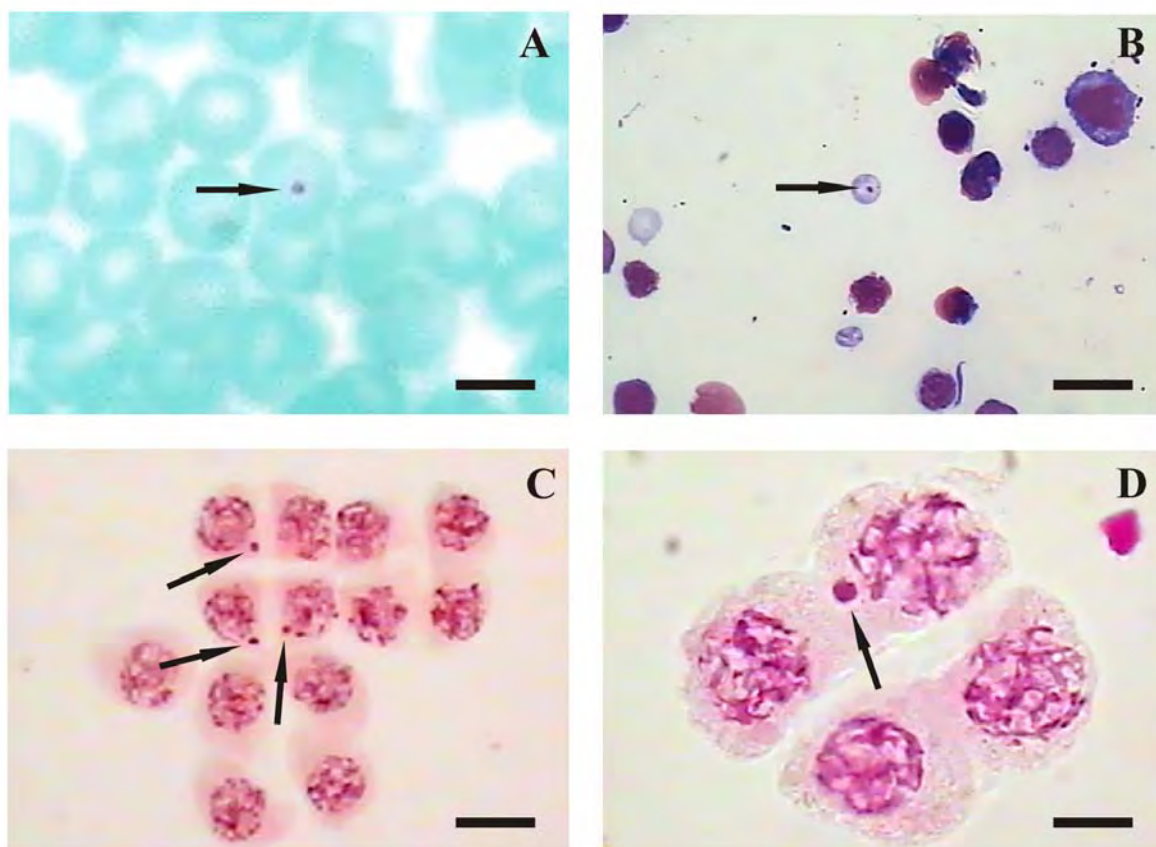


Figura 4 – Micronúcleos observados em células sanguíneas de camundongo e de células mãe de grão de pólen de *Tradescantia pallida*. A) Micronúcleo (seta) em eritrócitos de sangue periférico de camundongo tratado com material particulado de RQCA 0,3 mg/ml (Barra de escala 33 μ m); B) Micronúcleo (seta) em células de medula óssea de camundongo tratado com material particulado de RQCA 0,3 mg/ml (Barra de escala 100 μ m); C) Tétrade de inflorescência de *Tradescantia pallida* tratada com material particulado de RQCA 0,3 mg/ml contendo 3 micronúcleos (setas) em 400X (Barra de escala 4 μ m); D) Tétrade de inflorescência de *Tradescantia pallida* tratada com material particulado de ROFA/HU 3,0 mg/ml, apresentando micronúcleo (seta) em 1000X (Barra de escala 0,1 μ m).

Através dos ensaios realizados, pode-se observar que a RQCA exibiu propriedades mutagênicas na mesma ordem de magnitude que as ROFAs avaliadas no presente estudo. A

avaliação do potencial carcinogênico dos resíduos da queima de cana-de-açúcar é de extrema importância para os países que possuem regularmente essa prática agrícola.

Entretanto a maioria do conhecimento sobre os efeitos nocivos da poluição atmosférica foi obtida de estudos com combustíveis fósseis (Medeiros et al., 2004).

A partir desse resultado de que a RQCA é, ao menos, tão genotóxica quanto os particulados derivados de combustíveis fósseis, para melhor avaliar o efeito mutagênico desse poluente na população exposta, foram realizadas mais análises da amostra de poluente de Araraquara, porém agora com o material filtrado do ar. A Figura 5 apresenta os cromatogramas obtidos nas análises por HPLC/Flu dos extratos das amostras de material particulado atmosférico nas épocas de queima e não queima de cana-de-açúcar. A identidade dos analitos foi confirmada pela análise por GC/MS. Os analitos encontrados na queima são característicos de processos de combustão tanto de material vegetal quanto de combustível automotivo. Perfil semelhante para os HPAs presentes no material particulado atmosférico foi encontrado em outros trabalhos desenvolvidos no IQ/UNESP (Zamperlini, 1997; Zamperlini, 2000; Godoi, 2004, Andrade, 2004). É possível avaliar a grande influência da época da coleta no perfil de HPAs encontrado, uma vez que os HPAs que ocorrem na amostra de não queima são característicos apenas de queima de combustíveis automotivos “leves” como a gasolina (Andrade, 2004).

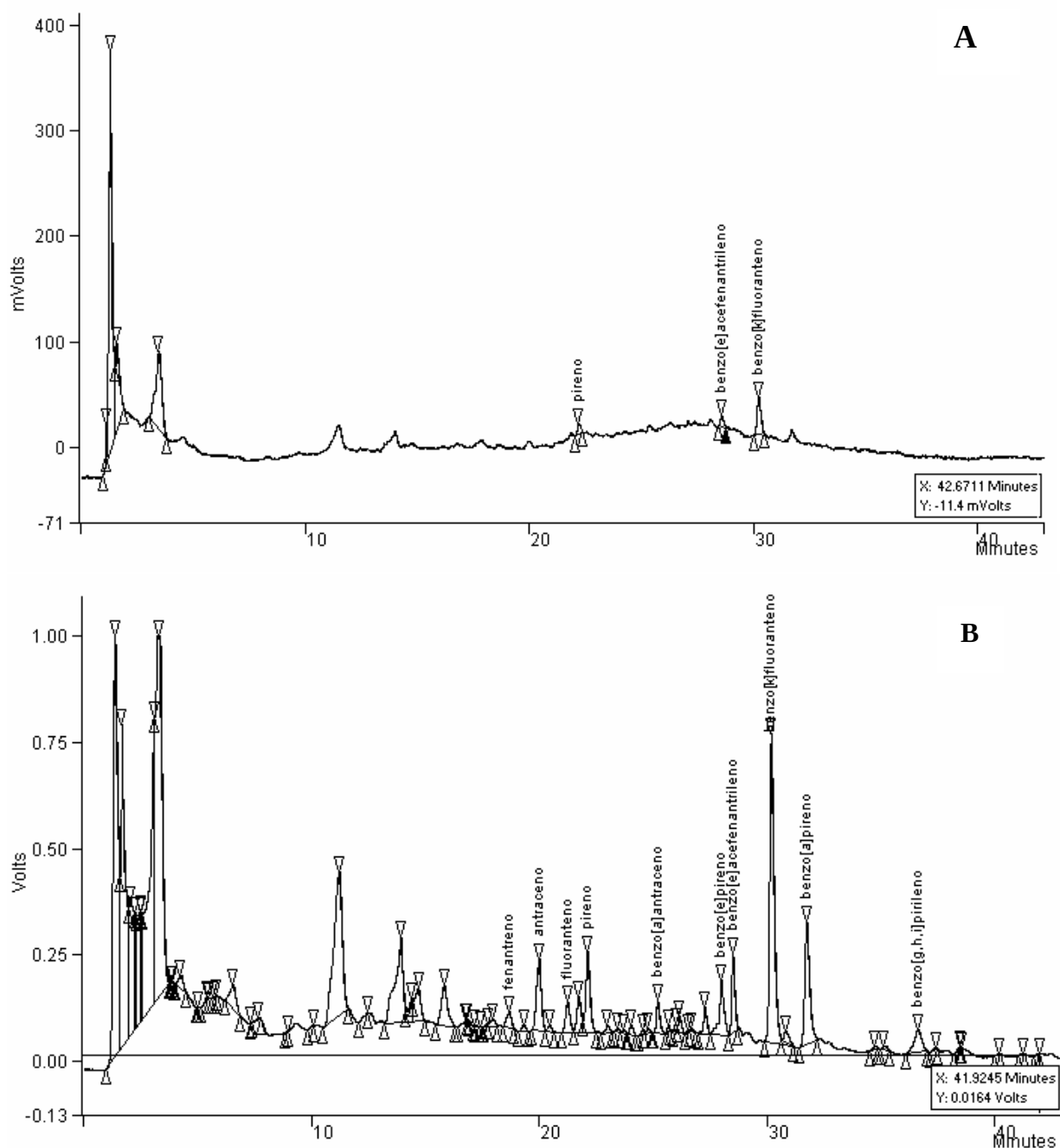


Figura 5: Cromatogramas obtidos nas análises por HPLC/Flu dos extratos das amostras de material particulado atmosférico nas épocas de entressafra (A) e de safra (B) de cana-de-açúcar.

As concentrações de HPA encontradas no material particulado estão apresentadas na Tabela 6. Nota-se que para os três HPAs encontrados nas duas épocas de coleta (pireno, benzo(e)acenenantrileno e benzo(k)fluoranteno), as concentrações são no mínimo 10 vezes superiores na época da safra quando comparado com a entressafra.

Tabela 6: Concentração média ($\mu\text{g g}^{-1}$) de HPAs no material particulado atmosférico

HPA	Concentração (ng g^{-1})*	
	Entressafra	Safra
Fenantreno	ND	0,53
Antraceno	ND	4,11
Fluoranteno	ND	1,29
Pireno	0,10	1,34
Benzo[a]antraceno	ND	0,52
Criseno	ND	NQ
Benzo[e]pireno	ND	0,72
Benzo[e]acefenantrileno	0,079	0,74
Benzo[k]fluoranteno	0,28	3,30
Benzo[a]pireno	NQ	3,24
Dibenzo[a,h]antraceno	ND	NQ
Benzo[g,h,i]perileno	ND	0,27
Indeno[1,2,3-cd]pireno	ND	ND

* determinação feita em extrato obtido do material particulado contido em 5 filtros, coletados em dias distintos

ND = não detectado, abaixo do limite de detecção (LD), veja tabela 1

NQ = não quantificado, abaixo do limite de quantificação (LQ), veja tabela 1

Os resultados da determinação das concentrações de elementos traço de PTS, feitas através da espectrometria de fluorescência de raios-X são apresentados na tabela 7 e 8. No período de safra, onde ocorre a emissão dos particulados de queima de cana-de-açúcar, houve um aumento de todos os elementos traço, com exceção do Sr, no período de safra (Tabela 7 e Tabela 8), demonstrado pelo diminuição de reflectância e análise de variância diferente entre as amostras de safra e entressafra. Esse aumento indicaria, que durante o período de safra pela emissão de particulados de queima de cana-de-açúcar, a atmosfera apresenta modificação de sua composição. A presença desses elementos estão possivelmente associado a bioaerossois, de componentes bioinorgânicos (S), solo(Al, Si, Fé,Ca) componentes derivados dos fluídos de folhas de planta (Cu, Pb, Zn) (GODOI et al., 2004 a). No período de entressafra (Tabela 7), possivelmente associado ao maior teor de emissão de poluentes provenientes da queima de combustíveis fósseis e outros, observa-se um aumento Al, Si, K, Cu, Zn, Sr, Zr, Ba e Pb. Esses elementos foram diferentes dos elementos traços observados nos particulados de veículos automotivos de São Paulo (BATALHA, et al., 1999).

Tabela 7 – Análise descritiva dos resultados (média, desvio padrão e erro padrão das médias) para determinação comparativa dos elementos traço por fluorescência de raio-X em (%) e porcentagem de elementos *carbon black* determinado por reflectância (%) em particulado total ressuspensionado (PTS).

		N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
Reflectância	Entressafra	24	27.8792	3.91763	0.79968
	Safra	24	11.3833	1.50323	0.30685
Al	Entressafra	24	0.00200	0.001103	0.000225
	Safra	24	0.00113	0.000338	0.000069
Si	Entressafra	24	0.00367	0.000482	0.000098
	Safra	24	0.00200	0.00000	0.00000
S	Entressafra	24	7.93163	2.933136	0.598724
	Safra	24	13.27563	2.766955	0.564802
K	Entressafra	24	0.00367	0.000482	0.000098
	Safra	24	0.00200	0.00000	0.00000
Ca	Entressafra	24	0.00625	0.004683	0.000956
	Safra	24	0.18538	0.264475	0.053986
Fe	Entressafra	24	12.99217	2.502561	0.510833
	Safra	24	46.55863	6.988752	1.426573
Cu	Entressafra	24	4.13604	1.573624	0.321215
	Safra	24	3.09729	1.361492	0.277913
Zn	Entressafra	24	0.00367	0.000482	0.000098
	Safra	24	0.00200	0.00000	0.00000
Sr	Entressafra	24	0.00950	0.013075	0.002669
	Safra	24	0.00800	0.012998	0.002653
Zr	Entressafra	24	0.00367	0.000482	0.000098
	Safra	24	0.00200	0.00000	0.00000
Ba	Entressafra	24	0.00367	0.000482	0.000098
	Safra	24	0.00200	0.00000	0.00000
Pb	Entressafra	24	0.73008	0.382086	0.077993
	Safra	24	0.36246	0.171378	0.034982

Tabela 8 – Análise estatística dos resultados da determinação comparativa dos elementos traço por análise espectrométrica por fluorescência de raio-X (ED-XRF) em (%) e porcentagem de elementos *carbon black* determinado por reflectância (%) em particulado total resuspendido.(PTS)

			Teste de Levene para igualdade de variância		Teste T para igualdade de médias						
			F	Sig.	t	df	Sig. (2 caudas)	Diferença da média	Diferença do erro padrão	95% de diferença do intervalo de confiança	
										abaixo	acima
Reflectância	Variância assumida como igual		14.667	0.000	19.259	46	0.000	16.9583	0.85653	14.771772	18.21994
	Variância assumida como diferente				19.259	29.629	0.000	16.9583	0.85653	14.74564	18.24602
Al	Variância assumida como igual		16.276	0.000	3.715	46	0.001	0.000875	0.000236	0.000401	0.001349
	Variância assumida como diferente				3.715	27.275	0.001	0.000875	0.000236	0.000392	0.001358
Si	Variância assumida como igual		184.000	0.000	16.956	46	0.000	0.001667	0.000098	0.001469	0.001865
	Variância assumida como diferente				16.956	23.000	0.000	0.001667	0.000098	0.001463	0.001870
S	Variância assumida como igual		0.479	0.492	-6.493	46	0.000	-5.344000	0.823087	-7.000788	-3.687212
	Variância assumida como diferente				-6.493	45.844	0.000	-5.344000	0.823087	-7.000940	-3.687060
K	Variância assumida como igual		184.000	0.000	16.956	46	0.000	0.001667	0.000098	0.001469	0.001865
	Variância assumida como diferente				16.956	23.000	0.000	0.001667	0.000098	0.001468	0.001870
Ca	Variância assumida como igual		13.627	0.001	-3.317	46	0.002	-0.179125	0.053994	-0.287809	-0.070441
	Variância assumida como diferente				-3.317	23.014	0.003	-0.179125	0.053994	-0.290816	-0.067434
Fe	Variância assumida como igual		22.709	0.000	-22.152	46	0.000	-33.566458	1.515.276	-36.6166	-30.5164
	Variância assumida como diferente				-22.152	28.803	0.000	-33.566458	1.515.276	-36.6665	-30.4664
Cu	Variância assumida como igual		0.072	0.790	2.446	46	0.018	1.038750	0.424753	0.183768	1.893732
	Variância assumida como diferente				2.446	45.068	0.018	1.038750	0.424753	0.183290	1.894210
Zn	Variância assumida como igual		184.000	0.000	16.956	46	0.000	0.001667	0.000098	0.001469	0.001865
	Variância assumida como diferente				16.956	23.000	0.000	0.001667	0.000098	0.001463	0.001870
Sr	Variância assumida como igual		0.002	0.963	0.399	46	0.692	0.001500	0.003763	-0.006075	0.009075
	Variância assumida como diferente				0.399	45.998	0.692	0.001500	0.003763	-0.006075	0.009075
Zr	Variância assumida como igual		184.000	0.000	16.956	46	0.000	0.001667	0.000098	0.001469	0.001865
	Variância assumida como diferente				16.956	23.000	0.000	0.001667	0.000098	0.001463	0.001870
Ba	Variância assumida como igual		184.000	0.000	16.956	46	0.000	0.001667	0.000098	0.001469	0.001865
	Variância assumida como diferente				16.956	23.000	0.000	0.001667	0.000098	0.001463	0.001870
Pb	Variância assumida como igual		9.950	0.003	4.301	46	0.000	0.367625	0.085479	0.195564	0.539686
	Variância assumida como diferente				4.301	31.894	0.000	0.367625	0.085479	0.193487	0.541763

Na figura 6 podemos observar uma maior frequência de micronúcleos no período de safra em relação ao período de entressafra em ambos os tratamentos.

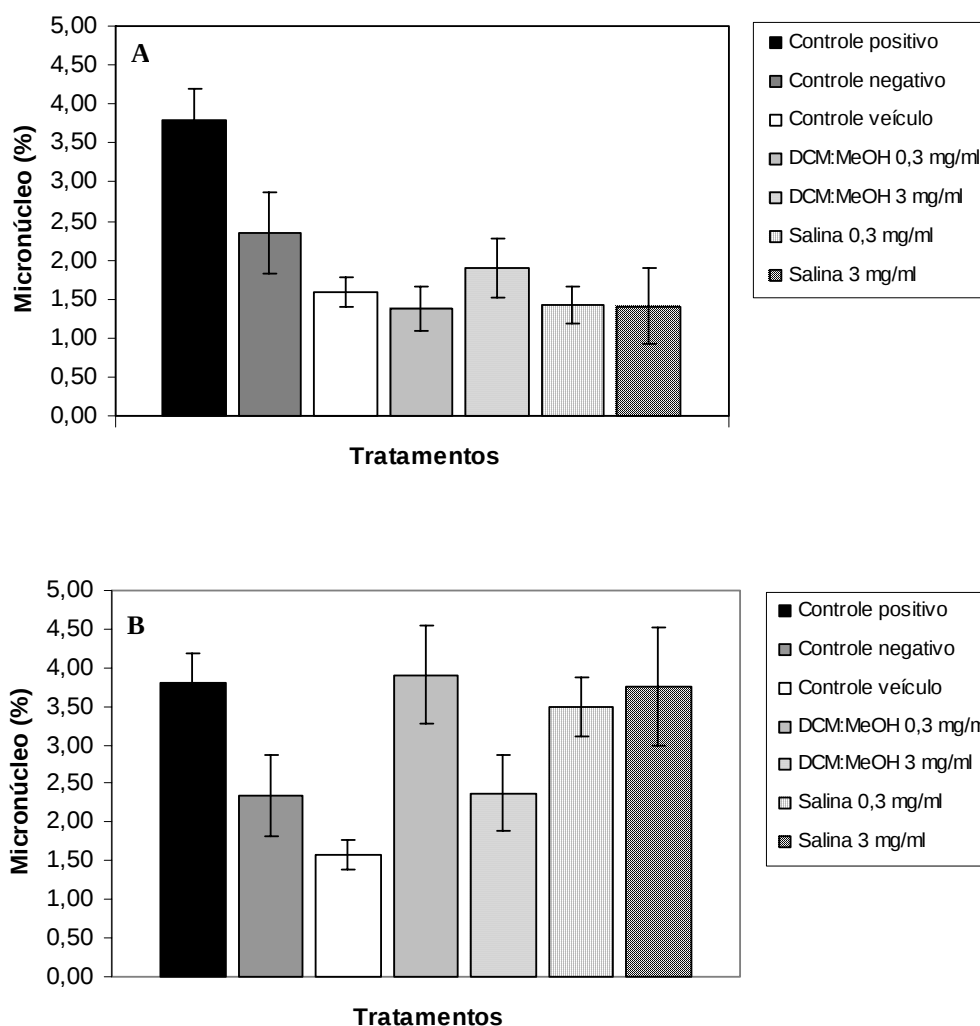


Figura 6 - Frequência de micronúcleo (%) em células mãe do grão de pollen de *Tradescantia pallida* tratadas com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (extrato orgânico contendo grande quantidade de HPAs) nas concentrações de 0.3 e 3.0 mg/mL, bem como extratos solubilizados em salina (0.3 and 3.0 mg/mL). A) Não Queima B) Queima. One Way ANOVA ($p < 0.0001$) com pos-teste de Tukey para múltiplas comparações entre queima e não queima; $p < 0.001$ - Controle Negativo *versus* controle de veículo *versus* DCM:MeOH 0.3mg/mL *versus* Salina 0.3mg/mL *versus* Salina 3.0mg/mL; $p < 0.05$ - DCM:MeOH 3.0mg/mL queima e não queima.

Na figura 7 podemos verificar um aumento na porcentagem de morte celular em relação ao tempo de exposição em ambos os tratamentos (extraídos em DCM:MeOH e em salina), independente das concentrações. A morte celular é progressivamente maior durante em relação ao tempo de tratamento, apresentando, entretanto, similar porcentagem de morte celular em relação as diferentes concentrações.

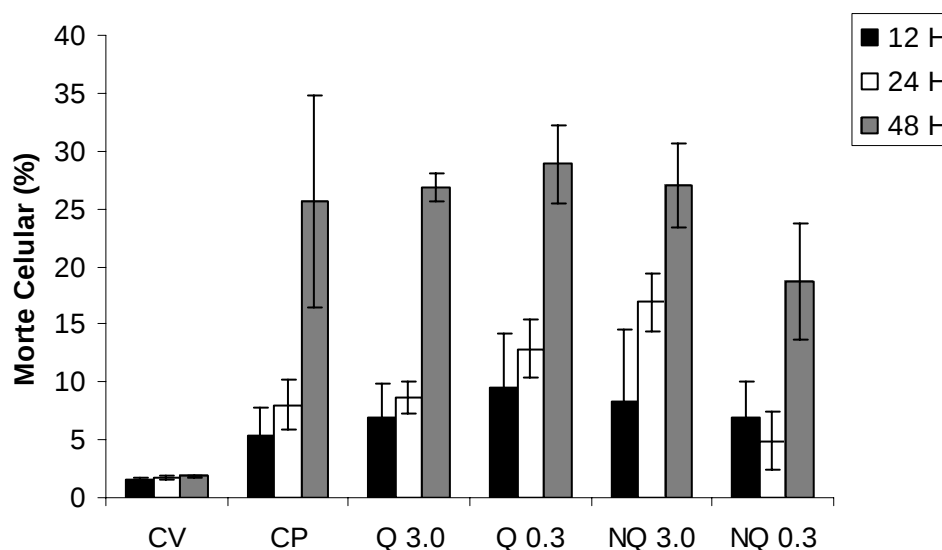


Figura 7 – Porcentagem de morte celular (colunas) e erro padrão (barras) depois do tratamento *in vitro* com biomassa oriunda de queima de cana-de-açúcar; (CV) controle de veículo, (CP), controle positivo, (Q) queima, (NQ) não queima.

Os sinais de apoptose de via intrínseca avaliados no presente estudo e representada pela expressão de Bak e Bcl-2, bem como a avaliação da ativação de p53 (Figura 8B), indica que quanto o menor o tempo de tratamento, a expressão de Bcl-2 foi maior, a diminuição da expressão acontece com o maior tempo de tratamento. Quando se compara a expressão de bcl-2 em 12 horas das células tratadas com diferentes concentrações de extratos da biomassa de queima (Q 0,3 e Q 3,0) e não queima (NQ 0,3 e NQ 3,0) e o controle positivo, observou-se que Q 0,3, Q 3,0 e NQ 3,0 (respectivamente, $P=0,113$; $P=0,060$; $P=0,696$) tiveram expressão similar. Esses resultados possivelmente indicam que esses particulados tem ao menos a mesma atividade do controle sabidamente indutor de apoptose. Em contrapartida, em 24h e 48h, foi observado diferença de expressão de Bcl-2 entre o controle positivo e todas as concentrações de extrato do particulado de queima ($P = 0,001$) e não queima ($P = 0,001$). Aparentemente, esses resultados poderiam indicar que em tempos maiores de tratamento, independente da concentração e do tratamento com os diferentes extratos de particulado no período de queima e não queima, os sinais anti-apoptóticos mediados por bcl-2 estariam diminuídos.

A expressão de Bak nas células tratadas com os extratos do particulados de queima e não queima apresentam diferença, principalmente em relação ao tempo de tratamento (Figura 8A). Essa expressão está aumentada em progressivamente nos tempos de 12, 24 e 48h para as células na queima 0,3 mg/ml que acontece progressivamente em relação ao tempo, enquanto em queima 3,0 mg/ml observou-se um aumento expressivo em 24 horas sugerindo que com o aumento da concentração o sinal de morte se evidencia mais rapidamente. Entretanto, nos diferentes tempos de tratamento com queima 0,3 mg/mL, a expressão de Bak é similar àquela encontrado no controle positivo somente em 48h ($P=1,000$), o que indicaria sinal apoptótico ao menos semelhante a doxorrubicina (controle

positivo). Quando a concentração de queima foi 3,0 mg/ml, observou-se aumento de Bak similar ao controle positivo em 12h ($P = 0,164$) e menor expressão nos tempos de 24h e 48h de tratamento (ambos, $P = 0,001$). Dessa forma, o aumento da concentração de queima aparentemente resulta no maior sinal apoptótico mediado por Bak. Quando a expressão de Bak é avaliada com o tratamento de extrato de não queima nas diferentes concentrações e tempo, é possível observar que essa expressão é similar ao controle positivo na concentração de 3,0mg/mL e em 12h e 48h (respectivamente, $P = 0,555$ e $P = 0,911$). Em contrapartida, na concentração de não queima de 0,3 mg/mL, não foi encontrada uma expressão similar ao controle positivo em todos os tempos de tratamento ($P = 0,001$). Dessa forma, esses resultados poderiam indicar que somente a maior concentração de não queima teria o mesmo comportamento de queima na mesma concentração somente no tempo de 12h ($P = 0,505$).

A avaliação da expressão de p53 fosforilado demonstrou que a ativação de p53 responsável por sinal nuclear de apoptose foi o diferente do controle positivo em todos os tratamentos, independente da concentração, e no tempo de 12h ($P = 0,001$). Em 24h, somente não queima 0,3mg/mL é similar ao controle positivo ($P = 0,188$) e em 48h, somente queima 0,3mg/mL é similar ao controle positivo ($P = 0,362$). Assim, os sinais de p53 ativado para apoptose foi observado em tempos superiores a 24h e nas concentrações menores, possivelmente indicando que esse sinal é disparado em principalmente em função do tempo de tratamento e que os componentes de combustão de fósseis induzem sinais de apoptose p53 mediado da mesma forma que o particulado de queima.

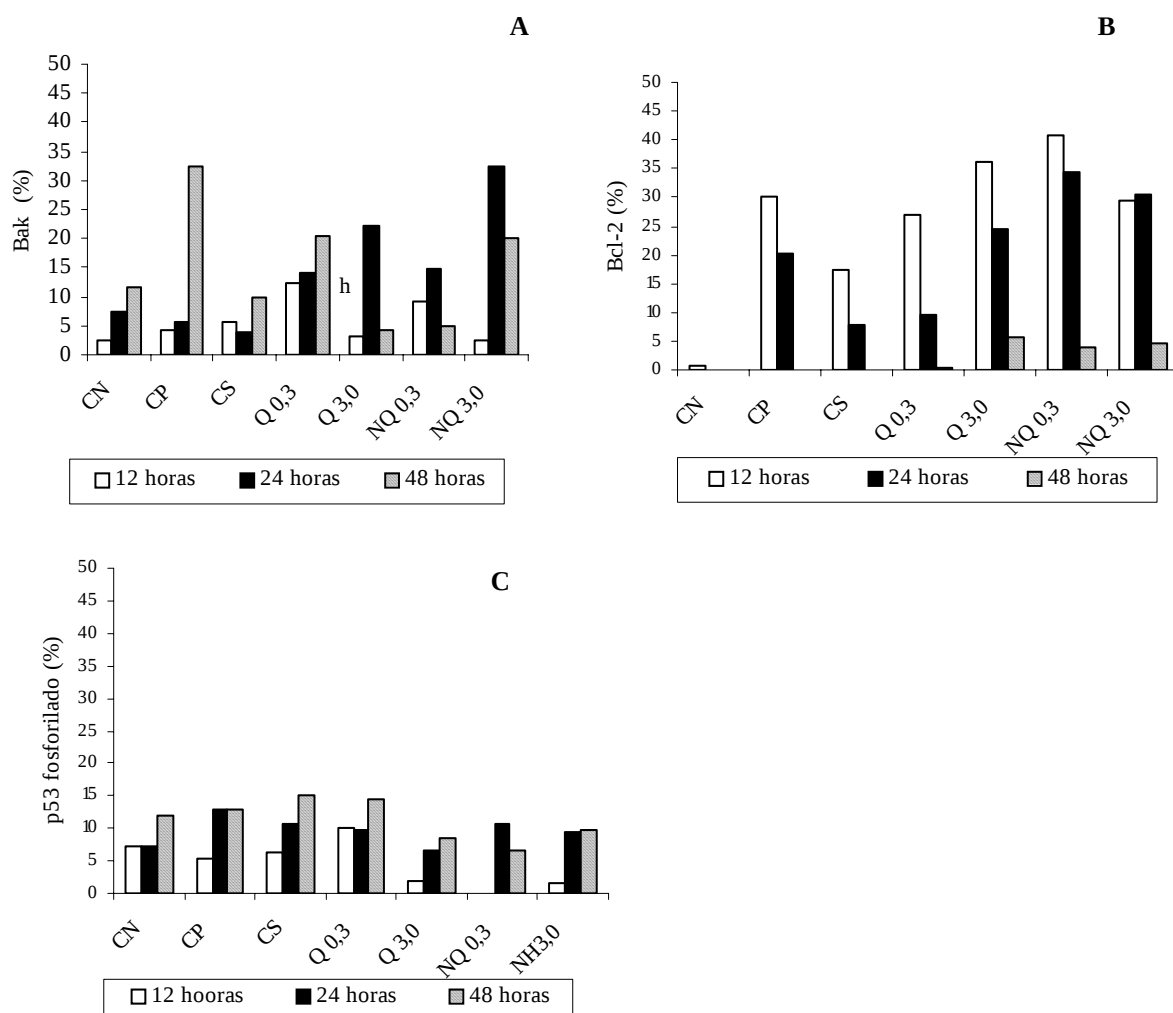


Figura 8 – Sinalização celular de apoptose em células A549 tratadas com hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) no período de queima (Q) e não queima (NQ), obtida pelo método de citometria de fluxo. A), B) e C) expressão das proteínas Bak, Bcl-2 e p53 fosforilado. Controle Negativo (CN) = células sem tratamento; Controle Positivo (CP) = células tratadas com doxirrubicina (15 μ g/mL) e Controle de Veículo (CS) = células tratadas com DMSO 3%.

A queima de cana é uma prática comumente empregada na agricultura de países em desenvolvimento. Mesmo em seguimentos organizados da área rural, tal como a produção de cana-de-açúcar no Brasil, a queima é usualmente utilizada, por facilitar a colheita manual, visto que é inviável aos trabalhadores manipularem a cana sem a queima prévia. A colheita manual é um processo que garante emprego a centena de brasileiros e a utilização de colheita mecanizada é em parte evitada em função dos problemas sociais.

Por não alcançar altas temperaturas, durante a queima de cana ocorre a combustão incompleta, a qual gera vários compostos orgânicos, incluindo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e aldeídos (CHEN et al., 2003). Assim sendo, estudos sobre o potencial mutagênico de particulados oriundos da queima de cana são necessários para determinar o risco das populações expostas. Embora a queima de biomassa *indoor* tenha sido associada com o desenvolvimento de câncer do pulmão (SMITH and LIU, 1993) e câncer de laringe (CLIFFORD, 1972), pouco se conhece sobre os efeitos da queima *outdoor*, provavelmente porque o nível ambiental desses poluentes depende da geração de incêndios esporádicos, uma característica que interfere nos estudos em larga-escala por longos períodos. Ainda, a maioria do conhecimento sobre o risco do câncer e o potencial mutagênico de poluentes particulados ambientais é resultante de estudos de emissões de combustíveis fósseis (BUSCHINI et al., 2001; BURGAZ et al., 2002).

Entretanto, considerando que a prática de queima regular de biomassa é comum em países que se cultiva a cana-de-açúcar, é importante avaliar o potencial do particulado de queima depositado para induzir danos no DNA. O presente estudo comparou a mutagenicidade do particulado de queima de cana depositado (RQCA) com aquele produzido por combustíveis fósseis, que foi previamente avaliado em sua composição tóxica e citotóxica (MEDEIROS JR et al., 2004). Os resultados indicaram que a

mutagenicidade de RQCA é similar aos das amostras de ROFA (*Residual Oil Fly Ash*). Esses efeitos foram observados independentemente nos dois ensaios utilizando camundongos e *Tradescantia*. De forma interessante, não foi observado um efeito dose-resposta claro em RQCA. A razão para esse resultado não é fácil determinar, uma vez que ambos os poluentes testados – ROFA e RQCA – são compostos por várias espécies químicas, tornando quase impossível tirar conclusões sobre qual componente seria responsável pelos efeitos observados e quais são os perfis de dose-resposta individuais. Entretanto, partículas brutas de RQCA que estão sujeitas a procedimentos mínimos de extração foram mutagênicas em plantas e camundongos, indicando que as partículas podem representar um risco em potencial para a saúde de populações continuamente expostas.

No presente estudo, a maior frequência de micronúcleo foi observada nas menores concentrações de RQCA (0,03 mg/ml) no ensaio de TRAD-MCN e nas células do sangue periférico e medula de camundongos, especialmente no tempo de 48h. Esses danos cromossômicos que estão sendo detectados é uma causa da morte celular, espera-se que os níveis significativos dos micronúcleos encontrados estejam somente em níveis tóxicos ou próximo-tóxicos (HEDDLE, 1973). A toxicidade produzida pela concentração mais elevada de RQCA poderia ter reduzido a frequência de micronúcleo produzida por esta dose.

A resposta relativamente baixa em medula óssea 24 horas após o tratamento também pode ter sido consequência da absorção limitada das suspensões com particulado uma vez que os tratamentos não resultaram em citotoxicidade, conforme avaliado pela frequência de PCEs em animais tratados e não tratados. A maioria dos ensaios de mutagenicidade são conduzidos com os agentes do teste na solução e a resposta atrasada em medula poderia ser devido ao tempo, e as necessidades de absorção e metabolização dos constituintes do particulado. Embora tais ensaios não sejam realizados freqüentemente, a

mutagenicidade das suspensões com particulado foram avaliadas previamente usando os ensaios de micronúcleo e de Ames (BORM, 1997; CARVALHO-OLIVEIRA et al., 2005). Estudo prévio demonstrou que tamanhos diferentes das fibras do asbesto influenciam na mobilidade e o mutagenicidade de agentes particulados (VARGA et al., 1996).

A composição dos elementos da amostra de RQCA indicou níveis relativamente elevados de Ti, Mn e V, que pode ter contribuído para a frequência de micronúcleo medido nos testes. Em contraste, ROFA/HU e ROFA/PE tiveram concentrações não detectadas destes elementos. Estudos prévios demonstraram diferenças significativas dos elementos traço na poluição urbana das regiões com tráfego automotivo mais intenso em comparação com amostras de regiões não poluídas (SUMITA et al., 2003). Assim, a avaliação de elementos traço parece ser útil para caracterizar quais elementos contribuem para a mutagenicidade. É possível que os metais presentes em RQCA possam induzir a fragmentação do DNA, que poderiam ser envolvidos em processos carcinogênicos ou mutagênicos. Os compostos que contêm o Ti, Mn, e o V foram associados com genotoxicidade e carcinogenicidade (KARTZER et al., 2003; MORISHITA et al., 2004; WEVER et al., 1997). Foi sugerido que os níveis elevados de material particulado contendo metal promovem a carcinogênese devido à indução de dano oxidativo no DNA (KIM et al., 2003). Além de contribuir à dispersão de V, de S, e de Se, a combustão de carvão é associada com a mortalidade elevada em indivíduos expostos (GRAHAME e HIDY, 2004).

A indução dos danos oxidativos pelos particulados também pode ter contribuído para a dose-resposta negativa para RQCA nos testes de mutagenicidade. Provavelmente, uma das concentrações mais baixas de suspensão de biomassa pôde conter poucos agregados das partículas. Os níveis mais baixos de agregação puderam resultar em uma resposta imune provocada por macrófagos, tendo por resultado uma indução mais eficiente

dos danos do DNA (ARBEX et al., 2004). Além disso, as partículas ultrafinas podem dar forma a conjuntos pequenos com formas arredondadas, que resulta no meio de deposição mais rápido como ocorre nos pulmões dos ratos, especialmente quando as partículas contêm compostos de Ti (KAPP et al., 2004).

Surpreendentemente, as frequências de micronúcleo no tempo da amostragem do tempo-zero eram mais elevadas para os grupos do teste do que o controle negativo (Tabela III). Aparentemente, uma absorção parcial e rápida da biomassa particulada ocorreu, explicando diferenças entre o teste e o controle positivo contra grupos de controle negativos bem como uma frequência mais elevada de micronúcleos. Em resumo, os resultados do estudo atual indicam que RQCA são ao menos tão genotóxicos como o combustível fóssil que originou os outros particulados usados neste estudo. Considerando estes resultados, seria importante a condução de estudos epidemiológicos nos locais onde a população geral e os trabalhadores estão expostos continuamente a RQCA.

Um número de elementos traços compostos essencialmente de metais (por exemplo zinco manganês, cobre e cromo) são conhecidos pelo seu potencial tóxico, dependente dos seus níveis, e que causam efeitos adversos a saúde de indivíduos expostos (CHUKHLOVIN et al., 2001). Em particular, a excessiva exposição a metais pesados *in vitro* e *in vivo*, causa distintos efeitos tóxicos, alterando a proliferação e sobrevivência celular (CHUKHLOVIN et al., 2001). Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e vários compostos, incluindo os elementos traço são encontrados na biomassa oriunda da queima de cana-de-açúcar, como encontrado no presente estudo (GODOI et al., 2004a; GODOI et al., 2004b; ZAMPERLINI et al., 2000). Em concordância com estes estudos, encontramos uma alta concentração de pireno, benzo(e)acefenantrileno e benzo[k]

fluoranteno, os quais são relacionados com a morte celular, apoptose e danos de DNA (PLISKOVA et al., 2005, ISKANDER et al., 2004, ARIF , SMITH and GUPTA, 1999) .

Como outros HPAs, certos metabólitos dos benzoantracenos são reconhecidos como potentes substâncias carcinogênicas e seus efeitos parecem ocorrer por ligação covalente dessas espécies com grupos nucleofílicos das bases do DNA, conhecido como aductos (ARIF , SMITH and GUPTA, 1999). Biomarcadores da resposta, as aberrações cromossômicas e micronúcleos, são amplamente utilizados em ensaios de mutagenicidade. O ensaio de micronúcleo e a frequência de trocas entre cromátides irmãs em leucócitos do sangue periférico são também adequados como biomarcador de exposição aos HPAs (BRANDT and WATSON, 2003). No presente estudo verificamos uma associação positiva entre a alta frequência de micronúcleos em células mãe de grão de pólen de *Tradescantia pallida* tratadas em diferentes tempos e concentrações de extrato orgânico contendo grande quantidade de HPAs. O ensaio de micronúcleo em *T.pallida* é um método sensível para a avaliação de mutagênese e pode ser empregado em condições laboratoriais e de campo. Estudos prévios demonstraram que o dano de DNA pode ser monitorizado com sucesso utilizando o teste de micronúcleo em *Tradescantia pallida* (CARVALHO-OLIVEIRA et al., 2005). A alta frequência de micronúcleos observada na época da colheita de cana-de-açúcar representa a mutagenicidade potencial da biomassa oriunda da sua.

Estudos prévios demonstraram que a poluição atmosférica aumenta o risco de desenvolvimento do câncer pulmonar. Emissões de poluentes ricos em HPAs poderia ser considerado, por diferentes mecanismos, um importante risco para a carcinogênese do tecido pulmonar (VIENEIS e HUSGAFVEL-PURSIAINEN, 2005). Assim, a citotoxicidade e a morte celular poderiam causar processos inflamatórios, potencializando o dano celular. No presente estudo, encontramos maior frequência de morte celular em linhagem pulmonar

(A549) tratada com HPAs isolados do particulado total do período de safra e entressafra de cana-de-açúcar. Foi relatado que a presença de vários compostos, incluindo os metais e HPAs na poluição atmosférica induz toxicidade nas células expostas, resultando no aumento de apoptose dependente da concentração do poluente (HETLAND et al, 2004). No presente trabalho, o aumento da expressão da proteína Bcl-2, observado nas células tratadas com as maiores concentrações e nos tempos de 24 e 48h, indicando, especialmente no particulado do período de safra, que a queima de cana dispara sinais apoptóticos. Nossos resultados indicam uma baixa expressão de p53 fosforilado em todos os tratamentos e nos diferentes tempos, possivelmente indicando uma inibição da via de apoptose dependente de p53. A substância phitrina alfa, uma inibidora sintética da atividade de p53, aboliu a parada do ciclo celular em fase S e a apoptose induzida por HPAs (PLISKOVA et al., 2005). A modulação da morte celular programada (apoptose) por diferentes metais pesados parece, em parte, determinar a imunotoxicidade de linfócitos. Normalmente, um suficiente dano genômico mostra um aumento de apoptose dependente de p53, a qual previne a transformação e proliferação tumoral. Alguns metais pesados como o Cu (II) e Cr (VI) podem aumentar a apoptose *in vitro* de linfócitos. Por outro lado, a presença de Zinco e Cádmio poderia inibir a apoptose *in vitro*. A supressão de apoptose pode prevenir a eliminação natural de células alteradas geneticamente e promover efeitos carcinogênicos na população afetada. (Chukhlovina et al., 2001).

É possível concluir que há uma correlação entre a presença de HPAs no período de safra e entressafra e o aumento de citotoxicidade e sinais de apoptose, indicando que a biomassa de queima de cana-de-açúcar apresenta o potencial de risco à saúde da população exposta.

CONCLUSÕES

- 1) A partir deste estudo foi possível concluir que a RQCA proveniente de material depositado é tão mutagênica quanto os particulados derivados de combustíveis fósseis (ROFAS).
- 2) A maior mutagenicidade foi verificada em relação ao tempo de exposição em todos os bioensaios realizados independente da concentração ou do particulado (depositado e PTS).
- 3) A RQCA do particulado depositado exibiu propriedades mutagênicas similares em ambos os modelos, animais e vegetais.
- 4) A morte celular, medida pelos ensaios de viabilidade e citotoxicidade (MTT), foi maior em relação ao tempo e quase similar nas diferentes concentrações de particulados de safra e entressafra, possivelmente indicando a citotoxicidade de ambos os extratos dos PTS.
- 5) A expressão entre Bak e Bcl-2 foi inversamente proporcional, onde as células apresentaram aumento de Bak e diminuição de Bcl-2 em função, principalmente do tempo de tratamento. Esses resultados aparentemente sugerem que independente da concentração e dependente do tempo de tratamento sinais de apoptose da via intrínseca são disparados.
- 6) Poucas células demonstraram expressão de p53 ativado, embora um evidente aumento tempo resposta tenha sido observado no período de safra e entressafra, possivelmente indicando que não houve tempo/concentração suficientes para a sua ativação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA FILHO, A. J. Impacto ambiental da queima de cana-de-açúcar sobre a entomofauna. Tese (Doutorado) p.90. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1995.

ALVES, E.S., PEDROSO, A.N.V., DOMINGOS, M., GUIMARÃES, E.T., SALDIVA, P.H.N. Biomonitoramento indoor do potencial mutagênico do ar em laboratórios e herbário do Instituto de Botânica por meio do bioensaio Trad-MCN. **Hoehnea**, v.30, p. 89-94, 2003.

ANDRADE, S.J. – Investigação sobre a composição química e avaliação da atividade mutagênica do material particulado atmosférico sob a influência da queima de cana-de-açúcar. Tese (doutorado). IQ/UNESP, 2004, 103pp

ANDRADE, S.J. - Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em urina. Dissertação (mestrado). IQ/UNESP, 2000, 80pp

ARBEX, M.A; BOHM, G.M.; SALDIVA, P.H.N.; CONCEIÇÃO, G.M.S. Assessment of the effects of sugar cane plantation burning on daily counts of inhalation therapy. **J. Air & Waste. Manage. Assoc.**, v. 50, p. 1745-1749, 2000.

ARBEX, M.A., CANÇADO, J.E.D., PEREIRE, L.A.A., BRAGA, A.L.F., SALDIVA, P.H.N. Queima de biomassa e efeitos sobre a saúde. **J. Bras. Pneumol.**, v. 30, p. 158-175, 2004.

ARIF JM, SMITH WA, GUPTA RC. DNA adduct formation and persistence in rat tissues following exposure to the mammary carcinogen dibenzo[a,l]pyrene. **Carcinogenesis**. 20(6):1147-50, 1999.

AUBERT, M.; BLAHO, J. A. Modulation of apoptosis during herpes simplex virus infection in human cells. **Microb. Infect.**, v. 3, p. 859-866, 2001.

BATALHA, J.R.F.; GUIMARÃES, E.T.; LOBO, D.J.A.; LICHTENFELS, A.J.F.C.; DEUR, T.; CARVALHO, H.A.; ALVES, E.S.; DOMINGOS, M.; RODRIGUES, G.S.; SALDIVA, P.H.N. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the Tradescantia micronuclei assay. **Mutat. Res.**, v.426, p 229-232, 1999.

BERALDI, E.V.; Avaliação citológica do lavado nasal- Araraquara-SP. Monografia apresentada no curso de Especialização em Saúde Pública, Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, 1998.

BLIMBESCOMBE, P.. Air pollution and health history. In HOLGATE, S.T.; SAMET, J.M.; KOREN, H.S.; MAYNARD, R.L. (Ed) **Air pollution and health**. San Diego, Academic Press, 1999. cap.2, p 5-18.

BOLOGNESI, C.; ABBONDANDOLO, A.; BARALE, R.; CASALONE, R.; DALPRA, L.; DEFERRARI, M.; DEGRASSI, F.; FORNI, A.; LAMBERTI, L.; LANDO, C.; MIGLIORE, L.; PADOVANI, P.; PUNTONI, R.; SBRANA, L.; STELLA, M.; BONASSI, S. Age-related increase of baseline frequencies of sister chromatid exchange, chromosome

aberrations and micronuclei in human lymphocytes. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* v 6, p. 249-256, 1997.

BORM, P.J.A Toxicity and occupational health hazards of coal fly ash (CFA) A review of data and comparison to coal mine dust. PII: S0003-4878 00026-4, 1997.

BRUNEKREEF, B.; HOLGATE, S.T. Air pollution and health. **The Lancet**, v. 306, p. 1233-1242, 2002.

BUSCHINI, A.; CASSONI, F.; ANCESCHI, E.; PASINI, L.; POLI, P.; ROSSI, C. Urbain airborne particulate: genotoxicity evaluation of different size fractions by mutagenesis tests on microorganisms and comet assay. **Chemosfere**, v. 44, p 1723-1736, 2001.

BURGAZ, S.; DEMIRCIGIL, G.C.; KARAHALIL, B.; KARAKAYA, A.E. Chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes of traffic policemen and taxi drivers exposed to urban air pollution, **Chemosphere**, v 47, p. 57-64, 2002.

CARVALHO-OLIVEIRA, R.; POZO, R.M.K.; LOBO, D.J.A.; LICHTENFELS, A.J.F.C.; MARTINS-JUNIOR, H.A.; BUSTILHO, J.O.W.V.; SAIKI, M.; SATO, I.M.; SALDIVA, P.H.N. Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in São Paulo, Brazil. **Environ. Res.**, 98, 1-7.

.

CERNÁ, M.; PASTORKOVÁ, A.; VRBÍKOVÁ, V.; SMÍD, J.; ROSSNER, P. Mutagenicity monitoring of airborne particulate matter (PM10) in the Czech Republic. **Mutat. Res.**, v. 444, p. 373-386, 1999.

CHEN, S.J; HSIEH, L.T; CHIU, S.C. Characteristics of the PAH emissions from the incineration of livestock wastes with/without APCD. **Environ. International**, v. 28, p. 659-668, 2003.

CHEN, J.; and THILLY, W.G. Use of denaturing-gradient gel electrophoresis to study chromium-induced point mutations in human cells. **Environ. Health Perspect.**, v. 102, p. 227-229, 1994.

CHUKHLOVIN, A.B.; TOKALOV, S.V., YAGUNOV, A.S.; WESTENDORF, J.; REINCKE, H.; KARBE, L. In vitro suppression of thymocyte apoptosis by metal-rich complex environmental mixtures: potential role of zinc and cadmium excess. **The science of the Environm**, v. 281, p. 153-163, 2001.

CLIFFORD P. Carcinogens in the nose and throat Proceedings of the Royal Society of Medicine, v. 65, p. 682-686, 1972.

COTRAN, R. S.; VINAY KUMAR, M. V.; COLLINS, T. Patología celular I: lesão e morte da célula. In: COTRAN, R. S.; VINAY KUMAR, M. V.; COLLINS, T. Patologia estrutural da célula e funcional. **6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan, p. 1-26, 2000.**

CSGMT (The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test): Disponível em <http://vm.cfsan.fda.gov/~redbook/red-toct.html> Acesso em 22 de outubro de 2003.

CURY, P.M.; LICHTENFELS, A.J.F.C.; REYMÃO, M.S.F.; CONCEIÇÃO, G.M.S.; CAPELOZZI, V.L.; SALDIVA, P.H.N. Urban levels of air pollution modifies the progression of urethane-induced lung tumors in mice. *Pathol. Res. Prac.*, v. 196, p. 627-633, 2000.

DAVIES, H.W.; KENNEDY, S.M.; TESCHKE, K.; QUINTANA, P.J. Citogenetic analysis of South Asian berry pickers in British Columbia using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes. **Mutat. Res.** v. 416, p. 101-113, 1998.

DE SOETE, D.; GIBELS, R.; HOSTE, J. Neutron activation analysis, London, Wiley-Interscience, 1972.

DOCKERY, D.W.; POPE III, C.A.; Acute respiratory effects of particulate air pollution. **Annu Ver. Public Health**, v. 15, p 107-132, 1994.

DOWNS, R.J.; HELLMERS, H. Environment and the Experimental Control of Plant Growth. New York: Academic Press Inc., **Experimental Botany**, 206p, 1975.

DREHER, K.L.; JASKOT, R.H.; LECHMANN, J.R.; RICHARDS, J.H.; MCGEE, J.K.; GHIO, A.J.; COSTA, D.L. Soluble transition metals mediate residual oil fly ash induced acute lung injury. **J. Toxicol. Environ. Health**. v.50, p.285-305, 1997.

ENNEVER, F.K.; ANDREANO, G. ROSENKRANZ, H.S. The ability of plant genotoxicity assays to predict carcinogenicity. **Mutat. Res.**, v.205, p 99-105, 1998.

EVANS, H.J.; NEARLY, G.J.; WILLIAMSON, F.S. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma rays in *Vicia faba* roots and the effects of oxygen: Part II. Chromosome damage; the production of micronuclei. **Int. J. Rad. Biol.**, v. 1, p. 230-240, 1959.

FENNECH, M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes- a biomarker for DNA damage in human populations. **Mutat. Res.** v. 404, p. 155-165, 1998.

FERREIRA, N.C. Avaliação dos impactos de saúde da queima de cana-de-açúcar, na cidade de Araraquara: um estudo prospectivo de epidemiologia e de citologia nasal. Monografia apresentada ao Programa de Aprimoramento Profissional em Análises Clínicas, Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, 1999.

GABLER, B.; MOHRENFELS, C. W.; DREISS, A. K.; MARSHALL, J.; LOHMANN, C. Vitality of epithelial cells after alcohol exposure during laser-assisted subepithelial keratectomy flap preparation. **Journal of Cataract & Refractive Surger.** v.28, October 2002, p. 1841-1846.

GÁTTAS, G.J.F.; LONGATTO FILHO, A.; MAEDA, M.Y.S.; SANTOS, D.R.; ANDREA FILHO, A. Identificação de micronúcleos (MN) em células de colo uterino de pacientes assintomáticas: Correlação dos métodos de Papanicolaou e Feugen-Fast Green. **Folha Méd. Bras.** v. 104, p. 57-59, 1992.

GUIMARÃES, E. T., DOMINGOS, M., ALVES, E. S., CALDINI JR., N., LOBO, D. J. A., LICHTENFELS, A. J. F. C., SALDIVA, P. H. N. Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brazil) with the Tradescantia – micronucleous (Trad-MCN) assay. **Environ. Exp. Bot.**, v. 44, p. 1-8, 2000.

GODOI, A.F.L.; RAVINDRA, K.; GODOI, R.H.M.; ANDRADE, S.J.; SANTIAGO-SILVA, M.; VAN VAECK, L.; VAN GRIEKEN, R. Fast chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aerosol samples from sugar cane burning. **Journal of Chromatography A**, v. 1027, p. 49-53, 2004.

GONÇALVES, D.B. Fogo no canal: dilemas de uma nova legislação. Disponível em http://www.jornalcana.com.br/conteudo/noticia:asp?id_materia=53. Acesso em 05 de agosto de 2003.

GRAHAME, T.; HIDY, G. Using factor analysis to attribute health impacts to particulate pollution sources. **Inhal. Toxicol.** v. 16, p. 143-152, 2004.

HAYASHI, M.; MAC GREGOR, J.T.; GATEHOUSE, D.G.; ADLER, I.D., BLAKEY, D.H; DERTINGER, S.D.; KRISHNA, G.; MORITA, T.; RUSSO, A. SUTOU, S. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, Integration with toxicity testing and Automated scoring. **Environ. Mol. Mutagen**, 35, pp 234-252, 2000.

HAUSER, R.; ELREEDY, S.; RYAN, P.B.; CHRISTIANI, D.C. Urine vanadium concentrations in workers overhauling an oil-fired boiler. **Am. J. Ind. Med.** v. 33, p. 55-60, 1998.

HEBERT, D.N. and LUIKER, M.M. Genetic effects of contaminant exposure- towards an assessment of impacts on animal populations. **The Science of the Environment**. v. 191, p. 23-58, 1996.

HEDDLE, J.A A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. **Mutat. Res.**, v. 18, p. 187-1910, 1973.

HEDDLE, J.A.; CIMINO, M.C.; HAYASHI, M.; ROMAGNA, F.; SHEELBY, M.D.; TUCKER, J.D.; VANPARYS, P.H.; MACCGREGOR, J.T. Micronuclei as an index of cytogenic damage: Past, Present, and Future. **Environ. Mol. Mutag.**, v. 18, p. 277-291, 1991.

HETLAND, R.B.; CASSEE, F.R.; REFSNES, M.; SCHWARZE, P.E.; LAG, M.; BOERE, A.J.F., DYBING, E. Release of inflammatory cytokines, cell toxicity and apoptosis in

epithelial lung cells after exposure to ambient air particles of different size fractions.

Toxicol. In vitro, v. 18, p. 203-212, 2004.

HEMMINK, K.; ZHANG, L.F.; KRUGER, J.; AUTRUP, H.; TORNQVIST, M.; NORBECK, H.E. Exposure of bus and taxi drivers to urban air pollutants as measured by DNA and protein adducts. **Toxicol. Lett.** v. 72, p. 171-174, 1994.

HOCKENBERY, D.M. The Bcl-2 oncogene and apoptosis. **Semin Immunol**; cidade, v.4, p.413-420, 1990.

ISKANDER K, PAQUET M, BRAYTON C, JAISWAL AK. Deficiency of NRH:quinone oxidoreductase 2 increases susceptibility to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and benzo(a)pyrene-induced skin carcinogenesis. **Cancer Res.** 64(17):5925-8, 2004.

JASKOT, R.H.; COSTA, D.L.; KODAVANTI, U.P.; LEHMANN, J.R.; WINSETTI, D.; DREHER, K. Comparison of lung inflammation and airway reactivity in three strains of rats exposed to residual oil fly ash particles. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** v.151, A264 (abstract)

JIANG, N.; DREHER, K.L.; DYE, J.A.; LI, Y.; RICHARDS, J.H.; MARTIN L.D.; ADLER, K.B. Residual Oil Fly Ash Induces Cytotoxicity and mucin Secretion by Guinea Pig Tracheal Epithelial Cells via an Oxidant-Mediated Mechanism, **Toxicol. And Applied Pharmacol.**, v 163, p. 221-230, 2000.

KAPP, N.; KREYLING, W.; SCHULZ, H.; IM HOF, V.; GEHR, P.; SEMMELER, M.; GEISER, M. Electron energy loss spectroscopy for analysis of inhaled ultrafine particles in rat lungs. **Micros. Res. Tech.** v.63, p.298-305, 2004.

KARTZER, A.; BUCHHORN, G.H.; HOCKERTZ, S.; LOEHR, J.F 2003. In vitro toxicity and mutagenicity of CoCrMo and TiAl wear particles. **Toxicology**. 190, 145-154.

KIM, J.Y.; MUKHERJEE, S.; NGO, L.C.; CHRISTIANI, D.C. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in workers exposed to fine particulates. **Environ. Health Perspect.** v.112, p.666-674, 2004.

KLEEGERGER, S.R.; LEVITT, R.C.; ZHANG, L.Y., LONGPHERE, M.; HARKEMA, J.; JEDLICKA, A.; ELEFF, S.M.; DISILVESTRE, D.; HOLROYD, K.J. Linkage analysis of susceptibility to ozone-induced lung inflammation in inbred mice. **Nat. Genet.**, v. 17, p 475-478, 1997.

KORSMEYER, J.S. Bcl-2 gene family and the regulation of programmed cell death. **Cancer Res.**; cidade, v.59, p.1693-1700, 1999.

LAVIN, M.; WATTERS, D. **Programmed cell death**. Amsterdam: Harwood, p. 331,1993.

LEWTAS, J.; LEWIS, C.; ZWEIDINGER, R.; STEVENS, R.; CUPITT, L. Sources of genotoxicity and cancer risk in ambient air. *Pharmacogenetics*. V.2, n6, p. 288-296, 1992.

MA, T.H. Micronuclei induced by X-rays and chemical mutagens in meiotic pollen mother cells of *Tradescantia*. A promising test system, **Mutat Res.**, v. 64, 307-313, 1979.

MA, T.H. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube chromatid aberration test for in situ monitoring and mutagen screening. **Environl Health Perspectives**, v. 37, p 85-90, 1981.

MA, T.H. *Tradescantia* cytogenetic tests (root- tip mitosis, pollen mitosis, pollen mother-cell meiosis). A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program, **Mutat Res.**, 99, 293-302, 1982.

MA, T.H.; GRANT, W.F.; The *Tradescantias*- adventurous plant. **The Herbarist**. v. 48, p 36-44, 1982.

MA, T.H. *Comunicação Pessoal* - Outline of the *Tradescantia* micronucleus (Trad-MCN) bioassay. Course handout. International Program of Chemical Safety, World Health Organization, The United Nations, 1988.

MACGREGOR, J.T.; WEHR, C.M.; HENIKA, P.R.; SHELBY, M.D. The in vivo erythrocyte micronucleus test: measurement at steady state increases assay efficiency and permits integration with toxicity studies. **Fund. Appl. Toxicol.**, v. 14, p. 513-522, 1990.

MAGALHÃES, P.S.G; BRAUNBECKER, O.A. Colheita de cana-de-açúcar verde: energia renovável para uma agricultura sustentável. Disponível em: <http://www.portalrural.com.br/agroartigos/artigos.html> . Acesso em 06 de agosto de 2003.

MAVOURNIN, K.H.; BLAKEY, D.H.; CIMINO, M.C. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutat. Res.**, v. 239, p. 29-80, 1990.

MAZZINI, R.C. Análise do potencial efeito mutagênico queima de cana-de-açúcar em células da mucosa nasal pelo método de eletroforese em gel de agarose de uma única célula (ensaio do cometa). Monografia apresentada no Curso de Especialização em Análise Clínicas, Departamento de Análise Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, 2002.

MEDEIROS JUNIOR, N., RIVERO, D.H.R.F., KASAHARA, D.I., SAIKI, M., GODLESKI, J.J., KOUTRAKIS, P., CAPELOZZI, V.L., SALDIVA, P.H.N. and ANTONANGELO, L. Acute pulmonary and hematological effects of two types of particle surrogates are influenced by their elemental composition. **Environ. Res.**, v. 95, p. 62-70, 2004.

MELLO, M. L. S.; VIDAL, B. C.; MARIA, S. S. Morte celular. IN: CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. **A célula 2001**. São Paulo: Ed. Manole, cap 23, p.275-2812001.

MENZIES, F.M.; INCE, P.G.; SHAW, P.J. Mitochondrial involvement in amyotrophic lateral sclerosis. **Neurochemistry International**, v. 40, p. 543-551, 2002.

MILLER, E.; MILLER, J. The mutagenicity of chemical carcinogens: correlations, problems and interpretations. In: HOLLAENDER, A. (Ed). **Chemical Mutagen**. New York: Plenum, 1971, p. 83-119.

MORETI, E.C. Avaliação citológica do lavado nasal de indivíduos residentes na cidade de Araraquara, interior de São Paulo- Projeto Piloto. Monografia apresentada no Programa de Aprimoramento Profissional em Análises Clínicas, Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, 1998.

MORISHITA M, KEELER G, WAGNER J, MARIK F, TIMM E, DVONCH J, HARKEMA J. 2004. Pulmonary retention of particulate matter is associated with airway inflammation in allergic rats exposed to air pollution in urban Detroit. **Inhal Toxicology** 16:663-674.

ONG, T.; WHONG, W.Z.; XU, J.; BURCHELL, B.; GREEN, F.H.Y.; LEWIS, T. Genotoxicity studies of rodents exposed to coal dust and diesel emission particulates. **Environ. Res.**, v. 37, p. 399-409, 1985.

ORPLANA. Câmara Paulista do Seto Sucro-Alcooleiro. Queima da cana-de-açúcar: informações disponíveis. Piracicaba, 1996. 19p. (Boletim Técnico).

PEREIRA NETTO, A.D.; MOREIRA, J.C.; DIAS, A.E.X.O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L.F.V.; OLIVEIRA, A.S.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs): e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Química Nova**, v.23, n.6, p. 765-773, 2000.

PLISKOVA M, VONDRACEK J, VOJTESEK B, KOZUBIK A, MACHALA M. Deregulation of cell proliferation by polycyclic aromatic hydrocarbons in human breast carcinoma MCF-7 cells reflects both genotoxic and nongenotoxic events. **Toxicol Sci.** 83(2):246-56, 2005.

RAMIRES, A.; GÁTTAS, G.S.J.; CARVALHO, M.B. RAPOPORT, A.; SALDANHA, P.H. Clinical implications of micronuclei frequency as a biomonitor for alcoholic patients with oral carcinomas. In.: VARMA, A.K. **Oral Oncology** vol. VI Macmillan, p. 199-204, 1999.

REID, T.M.; FEIG, D.I. and LOEB, L.A. Mutagenesis by metal-induced oxygen radicals. **Environ. Health Perspect.**, v. 102, p. 57-61, 1994.

RÉ-POPPI, N. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e outras substâncias orgânicas na combustão de madeira para produção de carvão vegetal e em particulado atmosférico na cidade de Campo Grande/MS. 2000. 217f. Tese (doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

RODGERS, B.E.; BAKER, R.J. Frequencies of micronuclei in bank voles from zones of high radiation at Chornobil, Ukraine. **Environ. Toxicology and Chemistry**, v. 19, n6, p. 1644-1648, 2000.

SÁNCHEZ-ALONSO, J.A.; LÓPEZ-APARICIO, P.; RECIO, M. N.; PÉREZ-ALBARSANZ, M.A. Polychlorinated biphenyl mixtures (Araclors) induce apoptosis via Bcl-2, Bax and caspase-3 proteins in neuronal cell cultures. **Toxicol. Letters**, v. 153, p. 311-326, 2004.

SARASTE, A.; PULKKI, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. **Cardiovascular**, v.45, p.528-537, 2000.

SCARPATO, R.; DI MARINO, F.; STRANO, A.; CURTI, A.; CAMPAGNA, A.; LOPRIENO, N.; BARRAI, I.; BARALE, R. Two year's air mutagenesis monitoring in a Northwestern rural area of Italy with an industrial plant, **Mutat. Res.**, 319 (4) 293-301, 1993.

SCHELEGEL, R. & MACGREGOR, J.T The persistence of micronuclei in peripheral blood erythrocytes: detection of chronic chromosome breakage in mice. **Mutat. Res.**, v. 104, p. 367-369, 1982

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutat. Res.** v. 31, p. 9-15, 1975.

SHIMA, N.; ICHIKAWA, S. Mutagenic synergism detected between dimethyl sulfate and X-rays not found between N-methyl-N-nitrosourea and X-rays in the stamen hairs of *Tradescantia* clone BNL 4430. **Mutat. Res.**, v. 331, p 79-87, 1995.

SCHWARTZ, J. Particulate air pollution and chronic respiratory disease. **Environ. Res.**, v. 62, p 7-17, 1993.

SEATON, A.; MacNEE, W.; DONALDSON, K.; GODDEN, D. Particulate air pollution and acute health effects. **The Lancet**, v. 345, p. 176-178, 1995.

SILVA, G.M.A. Cana crua X cana queimada: restrições técnicas e implicações sociais e econômicas. In: SEMANA DA CANA DE PIRACICABA, 2, 1997, Piracicaba. Anais. Piracicaba: NEPAN, p. 55-57, 1997.

SMITH, K.R., LIU, Y. Indoor air pollution in developing countries. In: Samet J, ed. Epidemiology of lung cancer. Lung biology in health and disease. New Yourk, Marcel Dekker, 1993.

SOARES, S.R.C.; BUENO-GUIMARÃES, H.M.; FERREIRA, C.M.; RIVERO, D.H.R.F.; DE CASTRO, I.; GARCIA, M.L.B.; SALDIVA, P.H.N. Urban air pollution induces micronuclei in peripheral erythrocytes of mice in vivo. **Environ. Res.** v.92, p.191-196, 2003.

SUMITA, N.M.; MENDES, M.E.; MACCHIONE, M.; GUIMARÃES, E.T.; LICHTENFELS, A.J.F.C; LOBO, D.J.A.; SALDIVA, P.H.N. *Tradescantia pallida* cv. *purpurea* boom in the characterization of air pollution by accumulation of trace elements. **J. Air & Waste Manage. Assoc.**, v. 53, p. 574-579, 2003.

SWENBERG, J. A.; BEAUCHAMP JR., R.O. A review of the chronic toxicity, carcinogenicity, and possible mechanism of action of inorganic acid mists in animals. **Crit. Rev. In Toxicology**, v. 27, n3, p. 253-259, 1997

TAO, S.; CUI, Y.H.; XU, F. L.; LI, B.G.; CAO, J.; LIU, W.X.; SCHMITT, G.; WANG, X.J.; SHEN, W.R.; QING, B.P.; SUN, R. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soil and vegetables from Tianjin. **Science of the Total Environment**, v. 320, p. 11-24, 2004.

TELLAROLLI, D.M.; FERREIRA, N.C.; RADDI, M.S.G; SOARES, C.P. Avaliação citológica da mucosa nasal de portadores de *Staphylococcus aureus*. **RBAC**, v. 35 (3), p. 151-153, 2003.

TOKIWA, H.; OHNISHI, Y. Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment. **CRC Crit. Rev. Toxicol.**, v. 17, p. 23-60, 1986.

TOMETSKO, A.M.; DERTINGER, S.D.; TOROUS, D.K. Analysis of micronucleated cells by flow cytometry. 4- Kinetic analysis of cytogenetic damage in blood. **Mutat. Res.**, v. 334, p. 9-18, 1995.

TOROUS, D.K.; DERTINGER, S.D.; HALL, N.E.; TOMETSKO, C.R. An automated method for discriminating Aneugen vs. Clastogen- induced micronuclei. **Environ. Mol. Mutag.**, v.31, p. 340-344, 1998.

UNDERBRINK, A.G.; SCHAIRER, L.A.; SPARROW, A.H. Tradescantia stamen hairs: a radiobiological test system applicable to chemical mutagenesis. In: Hollaender, A, (Ed). Chemical Mutagens- Principles and Methods for Their Detection. New York: Plenum Press, p 171-207, 1973.

UNITED NATIONS ENVIROMENTAL PROGRAME (UNEP). IPCC Special Report on Land use change and forestry. 1995. Disponível em: http://www.grida.no/climate/ipcc/land_use/index.htm. Acesso em 05 de agosto de 2003.

VANPARYS, P.; DEKNUDT, G.; VERMEIREN, F.; SYSMANS, M.; MARSBOOM, R. Sampling times in micronucleus testing. **Mutat. Res.**, v. 282, p. 191-196, 1992.

VARGA C, HORVÁTH G, TIMBRELL V. 1996. In vitro studies on genotoxicity and cogenotoxicity of ingested UICC anthophyllite asbestos. **Cancer Letters** 105:181-185.

VIENEIS P, HUSGAFVEL-PURSIINEN K. Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. **Carcinogenesis** 26(11): pp.1846–1855, 2005

WARK, K.; WARNER, C.F.; DAVIS, W.T. Air pollution its origin and control. 3 ed. Menlo Park, Califórnia, Addison-Wesley, 573p, 1998.

WEVER DJ, VELDHUIZEN AG, SANDERS MM, SCHAKENRAAD JM, VAN HORN JR. 1997. Cytotoxic, allergic and genotoxic activity of a nickel-titanium alloy. **Biomaterials** 18:1115-1120.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Selected non-heterocyclic PAHs. Geneva, 1998. (International Programme on Chemical Safety (IPCS): **Environmental Criteria**, 202).

ZAMBRANO, M.A.; TARGA, H.J.; RABELLO-GAY, M.N. Physiological saline solutions as a useful tool in micronucleus and metaphase slide preparations. **Stain Tech.**, v. 57, p 48-49, 1982.

ZAMPERLINI, G.C.m.; SILVA, M.R.S.; VILEGAS, W. Identification of polycyclic aromatic hydrocarbons in sugar cane soot by gas chromatography mass spectrometry. **Chromatographia**, v.46, p.655-663,1997.

ZAMPERLINI, G.C., SANTIAGO-SILVA, M., VILEGAS, W.,. Solid-phase extraction of sugar cane soot extract for analysis by gas chromatography with flame ionisation and mass spectrometric detection. **J. Chromatogr. A.** 889, 281-286, 2000.



Particles derived from biomass burning induce micronuclei in plant and mice bioassays

Journal:	<i>Environmental and Molecular Mutagenesis</i>
Manuscript ID:	EMM-06-0023
Wiley - Manuscript type:	Original Research Article
Date Submitted by the Author:	07-Apr-2006
Complete List of Authors:	Peron, Mariana; School of Pharmaceutical Sciences(UNESP), Clinical Analysis Soares, Christiane; School of Pharmaceutical Sciences(UNESP), Clinical Analysis Bueno-Guimarães, Heloisa; School of Medicine, University of São Paulo (USP), Department of Pathology Rivero, Dolores; School of Medicine, University of São Paulo (USP), Department of Pathology Lichtenfels, Ana Jlia; School of Medicine, University of São Paulo (USP), Department of Pathology Lobo, Debora-Je; School of Medicine, University of São Paulo (USP), Department of Pathology Giocondo, Msa; School of Pharmaceutical Sciences(UNESP), Clinical Analysis Saiki, Mitiko; Institute of Energy and Nuclear Research of São Paulo, Laboratory of Neutron Activation Analysis Saldiva, Paulo Hilrio; School of Medicine, University of São Paulo (USP), Department of Pathology
Key Words:	Micronuclei, Tradescantia pallida., blood cells, pollution

Particles derived from biomass burning induce micronuclei in plant and mouse bioassays

Short running title: Sugar cane biomass burning and micronuclei

Mariana C.C. Peron ¹, Heloisa M. Bueno-Guimarães ², Dolores H.R.F. Rivero², Ana Júlia F.C. Lichtenfels ², Debora-Jã A. Lobo ², Maísa P.Giocondo ¹, Mariangela Macchione ², Mitiko Saiki ³, Paulo Hilário N. Saldiva ², Christiane P. Soares ^{1*}

¹ Laboratory of Clinical Cytology, Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, UNESP, São Paulo State University. R. Expedicionários do Brasil, 1621, CEP 14 801 902, Araraquara, São Paulo, Brazil.

² Laboratory of Experimental Air pollution, Faculty of Medicine, Department of Pathology, School of Medicine, University of São Paulo (USP), Av. Dr Arnaldo, 455, SP, CEP 01246-903, São Paulo, Brazil.

³ Neutron Activation Analysis Laboratory, Av. Professor Lineu Prestes 2242, CEP 05508-000, São Paulo, SP, Brazil.

***Corresponding author:**

Christiane Pienna Soares

School of Pharmaceutical Sciences, UNESP, São Paulo State University, R. Expedicionários do Brasil, 1621, CEP 14 801 902, Araraquara, São Paulo, Brazil.

fax: +55-16- 3301-6547; Email address: soarescp@hotmail.com (C.P. Soares).

Abstract

The genotoxic potential of sugar cane burning residues (SCBRs at 0.3 and 0.03 mg/ml) and particle surrogates of residual oil fly ash (ROFA 0.3 mg/ml) were evaluated in assays measuring micronuclei (MN) in mouse bone marrow and peripheral red blood cells and in the pollen mother cells of *Tradescantia pallida*. Both test compounds induced MN in mouse red cells and in the plant bioassay. The micronucleus frequency in peripheral blood was higher 48 hr after administration of the samples and the highest micronucleus frequency was observed in animals receiving 0.03 mg/ml SCBR. Micronucleus induction in bone marrow cells showed no effect of time at the 24 hr and 48 hr sampling times and no time-dose interaction (repeated measures ANOVA). In conclusion, SCBR was at least as genotoxic as the fossil fuel derived particles. The results suggest that epidemiological studies should be conducted at sites where large population groups are continuously exposed to SCBRs.

Keywords: pollution, micronuclei, blood cells, *Tradescantia pallida*.

Introduction

Biomass is a major source of domestic energy for half of the world's population; 90% of the rural regions in developing countries utilize energy derived from wood, coal, animal excrement, and agricultural residues (WHO, 2000). The emissions generated during biomass burning produce high levels of indoor air pollution and are believed to be responsible for deleterious health effects in exposed populations (Arbex et al., 2000; Buschini et al., 2001; Riedl and Diaz-Sanches, 2005). Ethanol, which is produced in Brazil from sugar cane, is widely used as automotive fuel. The production of sugar cane in Brazil involves the burning of sugar cane plantations before harvesting, and this represents a seasonal source of environment biomass burning emissions (Arbex et al., 2004). A recent study detected polycyclic aromatic hydrocarbons in residues of sugar cane burning (SCBRs), indicating that SCBRs are potentially mutagenic (Zamperlini et al., 2000). Considering that petroleum resources will become scarce and ethanol can be an alternative fuel, we anticipate that burning sugar cane biomass could become a world problem in the future.

The induction of micronuclei (MN) in dividing cells is used as a biomarker to characterize the mutagenic potential of complex substances. MN are cytoplasmic chromatin-containing bodies that are formed when acentric chromosome fragments or whole chromosomes lag during anaphase and fail to become incorporated into daughter cell nuclei during cell division (CSGMT, 1995; Soares et al., 2003; Russo et al., 2004). Thus, the genetic damage that results in chromosome breaks, structurally abnormal chromosomes, and spindle abnormalities leads to micronucleus formation and the incidence of MN in animal or plant cells could serve as biomarker of genotoxicity caused by air pollutants (Alves et al., 2003; Medeiros-Jr et al., 2004; Carvalho-Oliveira et al., 2005). Although the

measurement of MN in blood cells of mice is commonly used for hazard identification, the evaluation of MN in pollen mother cells of *Tradescantia pallida* (TRAD-MCN) has been described as an efficient and inexpensive bioassay for monitoring the genotoxic effects of air pollutants (Carvalho-Oliveira et al., 2005). *T. pallida* potentially can accumulate DNA damage via in situ exposure, which could be useful for air pollution biomonitoring and outdoor pollution control (Sumita et al., 2003).

In the present study, we evaluated the mutagenicity of SCBR in animals and plants by measuring analyzing the frequency of MN in mouse peripheral erythrocytes and bone marrow cells, as well as in pollen mother cells of *Tradescantia pallida*. In addition, the mutagenicity of SCBR was compared with that of particles derived from industrial processes powered by fossil fuels.

Materials and Methods

Test particles

SCBRs were collected over a period of 24 hr by dry deposition in several plastic receptacles with an area of 177 cm² and filled with 1.5 L of water. The receptacles were placed close to where sugar cane burning was occurring, as described by Arbex et al. (2000). The openings of the receptacles were protected to avoid contamination by leaves and large insects. The contents of the receptacles were centrifuged at 256 x *g* for 10 min, and the pellet was stored at room temperature.

Two samples of particles representative of fossil fuel burning were assayed for comparison. The particles were generated by the combustion of different types of residual oil fly ash (ROFA). One of them was collected from the solid waste incinerator of the University Hospital of the University of São Paulo (ROFA/UH), which is powered by combustibles; the other was collected by an electrostatic precipitator installed in one of the chimneys of a large steel plant in Brazil (ROFA/EP).

Characterization of particles

Suspensions of test particles were produced by ultrasonication in saline, at concentrations of 0.03 and 0.3 mg/ml for the SCBR, and at 0.3 mg/ml for the ROFA/UH and ROFA/EP. The elemental composition of the SCBR samples was determined by neutron activation analysis. The evaluation of the ROFA/UH and ROFA/EP samples was previously reported by Medeiros et al. (2004). Basically, the procedure involved short irradiations of 1 min for the determination of Cl, K, Mg, Mn, Na, Ti, and V, using a pneumatic transfer system under a thermal neutron flux of $1.4 \times 10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Longer irradiations of 16 hr under a thermal neutron flux of about $10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ were performed

for determinations of As, Ba, Br, Ca, Ce, Co, Cr, Cs, Fe, Hf, K, La, Mn, Mo, Na, Nd, Rb, Sb, Sc, Se, Sm, Th, U, V, and Zn. After appropriate decay times, the irradiated samples and standards were measured using a hyperpure Ge detector Model GX2020 coupled to Model 1510 integrated signal processor (both from Canberra, Australia). Counting times from 200 to 50,000 sec were used, depending on the half-lives or activities of the radioisotopes measured in three independent assays. The radioisotopes were identified according to their half-lives and γ -ray energies. The concentrations of the elements were calculated using a comparative method (Saiki et al., 1997).

Exposure protocol

Mice:

The experimental protocol was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation (protocol number 10/2003) and was conducted in accordance with national guidelines for animal protection. The gender and the number of animals per group, the treatment schedule, dose levels, and the administration of the test compounds were performed as recommended by Hayashi et al. (2000). Male 8-10-week-old Balb/c mice, obtained from the School of Medicine, University of São Paulo, Brazil, were divided into five groups of 20 animals each. The animals received 0.2 ml of the following substances by intraperitoneal injection: (1) saline; (2) 0.3 mg/ml ROFA/EP; (3) 0.3 mg/ml ROFA/UH; (4) 0.03 mg/ml SCBR; or (5) 0.3 mg/ml SCBR. The groups were further divided into 2 subgroups of 10 animals each; one group was sampled at 24 hr (n=12) and the other at 48 hr (n=12) after injection. Blood and bone marrow were sampled after deep anesthesia with tiopenthal.

Plants:

The *Tradescantia* micronucleus assay (TRAD-MCN) was performed in early tetrads of *Tradescantia pallida* (Ma, 1979; Batalha et al., 1999; Carvalho-Oliveira et al., 2005). The assay contained a positive control (formaldehyde 1000 ppm), a negative control (Hoagland solution), and test groups treated with SCBR, ROFA/EP or ROFA/UH. Individual groups contained 15 plants, each having a single inflorescence. The plants were obtained from the School of Medicine's gardens and kept in the laboratory for 24 hr in Hoagland's solution before treatment. After this period, cuttings were transferred to Becker jars containing the same concentrations of the test compounds used for treating mice, and maintained for 8 hr at room temperature. After the treatment, the plants were allowed to recover for 24 hr in Hoagland's solution. Young inflorescences were collected and fixed in 1:3 acetic acid/ethanol, as described below.

Micronucleus assays

Mice:

Blood was collected from the caudal aorta and smeared on glass slides, fixed with absolute methanol for 10 min, dried in air, and stained with Feulgen and Fast Green. Bone marrow cells were obtained from the femur immediately following sacrifice. The cellular suspension was centrifuged at $169 \times g$ for 10 min, the pellet homogenized, and smears prepared and stained with Giemsa staining solution (Hayashi et al., 2000).

All the slides from peripheral blood and bone marrow were randomized and coded for scoring. The slides were analyzed at a magnification of 1000x. For each animal, 3000 peripheral blood erythrocytes and 1000 bone marrow polychromatic erythrocytes (PCEs) were examined in order to evaluate the presence of MN. All slides were scored by one person to avoid interobserver variability, as recommended by Davies et al. (1998).

Plants:

Fifteen plants, each with a single inflorescence, were evaluated for each group. The inflorescences were dissected and young anthers squashed in a solution of acetocarmine stain on a glass slide as described by Ma (1981). MN were counted on coded slides. Only preparations containing early tetrads were considered and the number of MN in 300 tetrads from each of the fifteen plants from each group was counted at 400x magnification. The results were expressed as the percentage of tetrads containing MN (frequency of MN).

Statistical analysis

Data analysis was performed by repeated measures One-Way ANOVA, using either the mean frequency of MN in each assay (mean of data from 10 mice or 15 plants), or the square root of the mean, as the dependent variable in the models. The Student-Newman-Keuls test was employed for post-hoc analysis. The level of significance was set at 5%. Statistical analysis was conducted with the aid of SPSS v10.0 statistical software (SPSS, Chicago, IL).

Results

Table I presents elemental concentrations obtained from the analysis of the SCBR, ROFA/UH, and ROFA/EP samples, and the detection limit values obtained according to the criteria Currie (1968). The data for ROFA/UH and ROFA/EP were previously reported (Medeiros et al., 2004) and are shown in the table for comparison with the elemental composition of SCBR. Neutron activation analysis was appropriate for characterizing this type of matrix due to its ability to analyze several elements using small samples, the quality of the results, and the low detection limits. The precision of the results determined for the SCBR is illustrated by standard deviations of less than 10% for most of elements. The accuracy of the analysis also was evaluated by analyzing NIST 1633b Coal Fly Ash and IAEA Soil-7 standards. The results that were obtained agreed with certified values (data not presented).

Results obtained in these analyses demonstrated differences between the elemental composition of the different combustion particle samples. The SCBR sample had 10- to 100-times higher concentrations of As, Co, Cs, Mn, Ti, and V than were found in ROFA/UH or ROFA/EP. In contrast, ROFA/EP had 5- to 50-times higher Br, Cr, Fe, Rb and Zn than, respectively, SCBR or ROFA/UH. Otherwise, the highest concentrations of lanthanide elements were found in ROFA/UH, followed by ROFA/EP and then SCBR.

Table II shows the means ($\pm$ standard deviations) of the micronucleus frequency in circulating red blood cells. Significant effects of time ($p < 0.001$) and a time $\times$ group interaction ($p = 0.01$) were detected (repeated measures ANOVA). The frequency of MN produced by the test samples generally was higher at the 48 hr than at the 24 hr sampling time. The highest micronucleus frequency was observed in the animals receiving 0.03

mg/ml SCBR. Post-hoc analysis indicated that all the test agent treatments resulted in significantly increased frequencies of MN, but there were no significant differences between the micronucleus frequencies in the different treatment groups.

Table III presents descriptive statistics for the micronucleus scoring in bone marrow cells and the percentage of polychromatic erythrocytes (PCEs) and normochromatic erythrocytes (NCEs) determined by counting 1000 bone marrow cells/animal/group. No significant effects of time or time x group were observed for bone marrow cells (repeated measures ANOVA). Greater differences between the % PCE frequencies were observed between saline group and all other groups (SCBR, ROFA/UH and ROFA/EP) for the 48-hr than the 24-hr samples (repeated measures ANOVA, $p < 0.0001$), indicating all particulates induced some bone marrow cytotoxicity. No significant differences were observed between negative control and the other groups for the 24-hr sampling.

Table IV shows descriptive statistics for the micronucleus frequencies measured in TRAD-MCN assay. Significant differences were detected among the groups ($p < 0.001$). Student-Newman-Keuls post hoc analysis identified 3 groups, with some overlap among them: saline and 0.3 mg/ml SCBR; 0.3 mg/ml SCBR and ROFA/UH; and, finally, 0.03 mg/ml SCBR and both types of ROFA.

Discussion

Biomass burning is still commonly employed for agricultural purposes in developing countries. Even in organized rural settings, such as is the case with sugar cane production in Brazil, burning is commonly used. This procedure provides jobs for thousands of Brazilians, and is used instead of mechanized processes, in part, to avoid social problems.

Since the burning procedure does not result in high temperatures, there is incomplete combustion of the biomass, which results in the generation of several organic compounds, including polycyclic aromatic hydrocarbons and aldehydes (Chen, Hsieh, Chiu, 2003). Studies on the evaluation of the genotoxic potential of SCBRs are important to assess the potential risk of human exposure. Although indoor biomass burning has been associated with the development of lung cancer (Smith and Liu, 1993) and laryngeal cancer (Clifford, 1972), there is no information about the effects of outdoor biomass burning, probably because the levels of such pollution in the environment depend upon the generation of sporadic fires, a requirement that is not conducive to conducting large-scale population studies over extended periods of time. Indeed, most of the knowledge about the cancer risk and mutagenic potential of air pollution comes from studies with fossil fuel derived emissions (Bernstein et al., 2004; Buschini et al., 2001; Burgaz et al., 2002). The purpose of the present study was to compare the mutagenicity of SCBR with particles produced by fossil fuel combustion that have previously been evaluated for chemical composition and toxicity (Medeiros et al., 2004).

The results indicated that the mutagenicity of SCBR is similar to that of the ROFA samples. These effects were detected independently in two different assays employing mice

and *Tradescantia*. Interestingly, no clear dose-responses were observed for the SCBR; it rather showed in a *positive-negative* pattern. This is difficult to determine, since both test agents – ROFA and SCBR – are composed by several chemicals, making it almost impossible to draw conclusions about which components are responsible for the observed effects and what are their individual dose-response profiles. However, raw SCBR particles that were subjected to minimal extraction procedures were mutagenic to mice and plants, indicating that the test particles may impose a potential healthy risk in populations under continuous exposure.

In the present study, mutagenic effects was observed for the lower concentration of SCBR (0.03 mg/ml) than the higher concentration in the TRAD-MCN assay, as well as in peripheral blood and bone marrow cells of mice, particularly at the 48 hr sampling time. Since the chromosomal damage being detected itself is a cause of cellular death, it is expected that significant levels of aberrations and MN only will be found at toxic or near-toxic levels (Heddle, 1973). After treatments in mice or rats, bone marrow should be collected no latter than 24 hr after treatment, while peripheral blood should be collected no later than 40 hr after treatment (Hayashi et al, 2000; Soares et al, 2003). Toxicity induced by the highest concentration of SCBR could reduce the frequency of MN.

The relatively low bone marrow response at 24 hr also might be due to limited absorption of the particulate suspensions since the treatments did not result in cytotoxicity, at least as measured by the frequency of PCEs in treated and untreated animals. Most genotoxicity assays are conducted with test agents in solution and the delayed bone marrow response could be due to the time the particulate needs for absorption and metabolism. Although such assays have not be conducted frequently, particulate suspensions were evaluated previously for mutagenicity using the MN and Ames assays (Borm, 1997;

Carvalho-Oliveira et al., 2005). A previous study has shown that the different sizes of asbestos fibers greatly influence the mobility and genotoxicity of particulate agents (Varga et al., 1996).

The components of the SCBR sample indicated relatively high levels of Ti, Mn, and V, which might have contributed to the MN measured in the assays. In contrast, ROFA/UH and ROFA/EP had undetectable concentrations of these elements. Previous studies demonstrated significant differences in trace elements in urban pollution from regions with heavier diesel-powered truck traffic in comparison with samples from clean regions (Sumita et al., 2003). Thus, the evaluation of trace elements seems to be useful for characterizing the elements effectively contributing to genotoxicity. It is possible that the metals present in SCBR might be able to induce high levels of DNA breakage, which could be involved in carcinogenic or mutagenic processes. Compounds containing Ti, Mn, and V were associated with genotoxicity and carcinogenicity (Katzner et al., 2003; Morishita et al., 2004; Wever et al., 1997). High levels of metal-containing particulate matter are believed to promote carcinogenesis because of their ability to cause oxidative DNA injury (Kim et al., 2003). In addition, coal combustion contributes to the dispersion of V, S, and Se, and it is associated to high mortality in exposed individuals (Grahame and Hidy, 2004).

Induction of oxidative damage by particulates may also have contributed to the negative dose-response for SCBR in mutagenicity assays. We hypothesize that lower concentrations of biomass suspensions might contain fewer aggregates of particles. The lower levels of aggregation might result in a weaker immune response triggered by macrophages, resulting in a more efficient induction of DNA damage (Arbex et al., 2004). Moreover, ultrafine particles are able to form small clusters with rounded shapes, which

might result in faster deposition, as occurs in rat lungs, especially when the particles contain Ti compounds (Kapp et al., 2004).

Surprisingly, MN frequencies observed in erythrocytes at the time-zero sampling time were higher for the test groups than the negative control (Table II). Increased influx could reflect and increase vascular permeability after intraperitoneal injection of particulates fluorescein-labeled and they were fast drained by lymphatic system, with higher drainage rate and tracer disappearance from the peritoneum (Nagy, 1992). Apparently, a partial and fast absorption of particulate biomass occurred, explaining differences among test and positive control *versus* negative control groups as well as a higher micronuclei frequency.

In conclusion, the results of the present study indicate that SCBRs presented genotoxic effects, as much as the fossil fuel derived particles assayed in this study. Considering this information is relevant in the sense that epidemiological studies should be conducted with human populations exposed to SCBRs.

Acknowledgments

The authors are thankful to CNPq and FAPESP for financial support.

Funding Sources:

- Laboratory of Clinical Cytology and Cellular Biology, Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo State (UNESP).
- Laboratory of Experimental Air pollution, Faculty of Medicine, Department of Pathology, School of Medicine, University of São Paulo (USP).
- CNPq and FAPESP, for scientific Brazilian Foundations Research.

References

Alves ES, Pedroso ANV, Domingos M, Guimarães ET, Saldiva PHN. 2003. Biomonitoramento indoor do potencial mutagênico do ar em laboratórios e herbário do Instituto de Botânica por meio do bioensaio Trad-MCN. *Hoehnea*, 30:89-94.

Arbex MA, Bohm GM, Saldiva PHN, Conceição GMS, Pope III AC, Braga ALF. 2000. Assessment of the effects of sugar cane plantation burning on daily counts of inhalation therapy. *J Air & Waste Manage Assoc* 50:1745-1749.

Arbex MA, Cançado JED, Pereira LAA, Braga ALF, Saldiva PHN. 2004. Queima de biomassa e efeitos sobre a saúde. *J Bras Pneumol* 30:158-175.

Batalha JRF, Guimarães ET, Lobo DJA, Lichtenfels AJFC, Deur T, Carvalho HA, Alves ES, Domingos M, Rodrigues GS, Saldiva PHN. 1999. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the *Tradescantia* micronuclei assay. *Mutat Res* 426:229-232.

Bernstein JA, Alexis N, Barnes C, Bernstein L, Nel A, Peden D, Diaz-Sanches D, Tarlo SM, Williams PB. 2004. Health effects of air pollution. *J Allergy Clin Immunol* 114:1116-1123.

Borm PJA. 1997. Toxicity and occupational health hazards of coal fly ash (CFA). A review of data and comparison to coal mine dust. *Ann.Occup.Hyg.* 41: 659-676.

Burgaz S, Demircigil GC, Karahalil B, Karakaya AE. 2002. Chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes of traffic policemen and taxi drivers exposed to urban air pollution. *Chemosphere* 47:57-64.

Buschini A, Cassoni F, Anceschi E, Pasini L, Poli P, Rossi C. 2001. Urban airborne particulate: genotoxicity evaluation of different size fractions by mutagenesis test on microorganisms and comet assay. *Chemosphere* 44:1723-1736.

Carvalho-Oliveira R, Pozo RMK, Lobo DJA, Lichtenfels AJFC, Martins-Junior H A, Bustilho JOWV, Saiki M, Sato IM, Saldiva PHN. 2005. Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in São Paulo, Brazil *Environ Res* 98:1-7.

Chen S-J H L-T, Chiu S-C. 2003. Characteristics of the PAH emissions from the incineration of livestock wastes with/without APCD. *Environ Int* 28:659-668.

Clifford P. 1972. Carcinogens in the nose and throat. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 65:682-686.

Davies HW, Kennedy SM, Teschke K, Quintana PJE. 1998. Cytogenetic analysis of south Asian berry pickers in British Columbia using the micronucleus assay in peripheral lymphocytes. *Mutat Res* 416:101-113.

Grahame T, Hidy G. 2004. Using factor analysis to attribute health impacts to particulate pollution sources. *Inhal Toxicol* 16:143-152.

Hayashi M, MacGregor JT, Gatehouse DG, Adler ID, Blakey DH, Dertinger SD, Krishna G, Morita T, Russo A and Sutou S. 2000. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing and automated scoring. *Environ Mol Mutagen* 35:234-252.

Heddle JA. 1973. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage. *Mutat Res* 18:187-191.

Kapp N, Kreyling W, Schulz H, Im Hof V, Gehr P, Semmler M, Geiser M. 2004. Electron energy loss spectroscopy for analysis of inhaled ultrafine particles in rat lungs. *Microsc Res Tech* 63:298-305.

Kartzer A, Buchhorn GH, Hockertz S, Loehr JF. 2003. In vitro toxicity and mutagenicity of CoCrMo and TiAl wear particles. *Toxicology* 190:145-154.

Kim JY, Mukherjee S, Ngo LC, Christiani DC. 2003. Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage in workers exposed to fine particulates. *Environ Health Perspect* 112:666-674.

Ma TH. 1979. Micronuclei induced by X-rays and chemical mutagens in meiotic pollen mother cells of *Tradescantia*. A promising test system. *Mutat Res* 64:307-313.

Ma, TH. 1981. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube aberration test for in situ monitoring and mutagen screening. *Environ Health Perspect* 37:85-90.

Medeiros Junior N, Rivero DHF, Kasahara DI, Saiki M, Godleski JJ, Koutrakis P, Capelozzi VL, Saldiva PHN and Antonangelo L. 2004. Acute pulmonary and hematological effects of two types of particle surrogates are influenced by their elemental composition. *Environ Res* 95:62-70.

Morishita M, Keeler G, Wagner J, Marsik F, Timm E, Dvonch J, Harkema J. 2004. Pulmonary retention of particulate matter is associated with airway inflammation in allergic rats exposed to air pollution in urban Detroit. *Inhal Toxicology* 16:663-674.

Nagy JA. 1992. Lymphatic and nonlymphatic pathway of peritoneal absorption in mice: physiology versus pathology. *Blood Purif* 10:148-162.

Riedl M, Diaz-Sanches D. 2005. Biology of diesel exhausts effects on respiratory function. *J Allergy Clin Immunol* 115:221-228.

Russo C, Rocco L, Morescalchi MA, Stingo V. 2004. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicol and Environ Safety* 57:168-174.

Saiki M, Vasconcellos MBA, Marcelli MP. 1997. Determinations of trace elements in lichens by instrumental neutron activation analysis. J Radioanal Nucl Chem 217:111-115.

Smith KR, Liu Y. 1993. Indoor air pollution in developing countries. In: Samet J, ed. Epidemiology of lung cancer. Lung biology in health and disease. New York, Marcel Dekker. p. 358-359

Soares SRC, Bueno-Guimarães HM, Ferreira CM, Rivero DHRF, De Castro I, Garcia MLB, Saldiva PHN. 2003. Urban air pollution induces micronuclei in peripheral erythrocytes of mice in vivo. Environ Res 92:191-196.

Sumita NM, Mendes ME, Macchione M, Guimarães ET, Lichtenfels AJFC, Lobo DJA, Saldiva PHN. 2003. *Tradescantia pallida* cv. *purpurea* boom in the characterization of air pollution by accumulation of trace elements. J Air & Waste Manage Assoc. 53:574-579.

The Collaborative Group for the Micronucleus Test (CSGMT) (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan). 1995. Protocol recommended for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. Mutagenesis 10:153-159.

Varga C, Horváth G, Timbrell V. 1996. In vitro studies on genotoxicity and cogenotoxicity of ingested UICC anthophyllite asbestos. Cancer Letters 105:181-185.

Zamperlini GC, Santiago-Silva M, Vilegas W. 2000. Solid-phase extraction of sugar cane soot extract for analysis by gas chromatography with flame ionisation and mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 889:281-286.

Wever DJ, Veldhuizen AG, Sanders MM, Schakenraad JM, Van Horn JR. 1997. Cytotoxic, allergic and genotoxic activity of a nickel-titanium alloy. *Biomaterials* 18:1115-1120.

WHO Information, VEGETATION FIRES, 2000 Fact Sheet, n° 254.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs254/en/>.

Table I. Concentrations of chemical element in combustion particle samples determined by neutron activation analysis. (Fe, Ca, Cl, K and Mg concentrations are given as percentages).

Elements	Samples			Detection Limit Values
	SCBR (n=3)*	ROFA/UH (n=1)	ROFA/EP (n=1)	
As, $\mu\text{g kg}^{-1}$	601 ± 27	9.3 ± 1.0	61.0 ± 1.0	5.2
Br, $\mu\text{g g}^{-1}$	6.6 ± 0.7	8.7 ± 0.6	1482 ± 19	0.020
Ca (%)	6.9 ± 0.3	0.59 ± 0.04	5.4 ± 0.2	0.077
Cl, (%)	0.34 ± 0.05	ND	ND	0.005
Co, $\mu\text{g kg}^{-1}$	2039 ± 196	122.9 ± 3.1	9.96 ± 0.25	2.1
Cr, $\mu\text{g g}^{-1}$	8.1 ± 0.5	32.4 ± 0.4	107.7 ± 1.4	0.014
Cs, $\mu\text{g kg}^{-1}$	846 ± 24	0.58 ± 0.04	9.96 ± 0.25	0.28
Fe (%)	8.7 ± 0.6	3.28 ± 0.07	44.6 ± 0.1	0.0016
K (%)	5.6 ± 0.1	ND	ND	0.04
La, $\mu\text{g g}^{-1}$	33 ± 1	972 ± 12	10.3 ± 0.1	0.04
Mg, (%)	2.2 ± 0.2	ND	ND	0.12
Mn, $\mu\text{g g}^{-1}$	1728 ± 123	ND	ND	0.7
Mo, $\mu\text{g g}^{-1}$	2.6 ± 0.4	ND	ND	1.5
Na, $\mu\text{g g}^{-1}$	365 ± 46	NA	NA	0.10
Rb, $\mu\text{g g}^{-1}$	57 ± 1	11.4 ± 1.1	719.7 ± 1.0	2.7
Sb, $\mu\text{g kg}^{-1}$	305 ± 112	39.8 ± 0.7	2.27 ± 0.09	1.0
Sc, $\mu\text{g kg}^{-1}$	2487 ± 192	1.111 ± 0.007	1.91 ± 0.01	0.33
Se, $\mu\text{g kg}^{-1}$	540 ± 65	20.5 ± 0.2	154.4 ± 0.8	15.7
Ti, $\mu\text{g g}^{-1}$	2144 ± 6	ND	ND	50
V, $\mu\text{g g}^{-1}$	29 ± 3	ND	ND	14
Zn, $\mu\text{g g}^{-1}$	101 ± 5	115.7 ± 1.5	491.9 ± 3.1	3.1
Hf, $\mu\text{g g}^{-1}$	NA	1.64 ± 0.03	0.62 ± 0.07	0.10
Th, $\mu\text{g g}^{-1}$	NA	3.07 ± 0.03	1.50 ± 0.06	0.09
U, $\mu\text{g g}^{-1}$	NA	ND	2.28 ± 0.14	0.30
Ce, $\mu\text{g g}^{-1}$	NA	51.1 ± 0.4	16.3 ± 0.3	0.35
Nd, $\mu\text{g g}^{-1}$	NA	33.1 ± 2.9	9.3 ± 1.6	4.5
Sm, $\mu\text{g g}^{-1}$	NA	2.69 ± 0.08	2.30 ± 0.07	0.008

SCBR (sugar cane burning residues), ROFA/UH (residual oil fly ash from University Hospital of the University of São Paulo), and ROFA/EP (residual oil fly ash collected from an electrostatic precipitator). ND =Not detected under analysis conditions. NA = not analyzed. Number n indicates number of determinations and in the case of n=1 the uncertainty of the result was evaluated considering statistical counting errors of standard and sample.

Table II: Mean ($\pm$ standard deviation) frequencies of micronucleus (expressed as percentage micronucleated cells) in peripheral blood cells erythrocytes of mice treated with combustion particles. One thousand cells were analyzed per animal.

Sampling time	Treatment	Frequency of MN $\pm$ SD	Number of analyzed cells
Time 0	Negative Control	0.111 $\pm$ 0.010	9000 ^a
	Positive Control	0.500 $\pm$ 0.024	10 000
	SCBR 0.3	0.400 $\pm$ 0.163	10 000
	SCBR 0.03	0.444 $\pm$ 0.176	9 000 ^a
	ROFA EP	0.250 $\pm$ 0.250	8000 ^b
	ROFA UH	0.222 $\pm$ 0.147	9000 ^a
24 hr	Negative Control	0.222 $\pm$ 0.222	9000 ^a
	Positive Control	1.400 $\pm$ 0.427	10 000
	SCBR 0.3	1.625 $\pm$ 0.625	8000 ^b
	SCBR 0.03	0.889 $\pm$ 0.351	9000 ^a
	ROFA EP	1.000 $\pm$ 0.327	8000 ^b
	ROFA UH	0.888 $\pm$ 0.260	9000 ^a
48 hr	Negative Control	0.600 $\pm$ 0.221	10 000
	Positive Control	1.700 $\pm$ 0.700	10 000
	SCBR 0.3	1.400 $\pm$ 0.636	10 000
	SCBR 0.03	3.500 $\pm$ 0.108	10 000
	ROFA EP	1.556 $\pm$ 0.280	9 000 ^a
	ROFA UH	2.111 $\pm$ 0.735	9 000 ^a

SCBR (sugar cane burning residues), ROFA/UH (residual oil fly ash from University Hospital of the University of São Paulo), and ROFA/EP (residual oil fly ash collected from an electrostatic precipitator). Positive control (Cyclophosphamide), Negative control (saline). n = number of cells assayed (1000 cells/mouse). Significant effects of treatment time ($p < 0.001$); treatment time *versus* group: $p = 0.01$. ^a One animal died. ^b Two animals died

Table III: Means $\pm$ standard deviations of micronucleus frequency (expressed as percent micronucleated cells) in bone marrow cells of mice treated with combustions particles.

Sampling time	Treatment	PCEs/ NCEs (%)	Mean (MN/PCEs) $\pm$ SD	Analyzed cells (n)
24 hr *	Negative Control	0.49	0.222 ± 0.147	9000 ^a
	Positive Control	0.39	$1.200 \pm 0.327^*$	10 000
	SCBR 0.3	0.55	$0.875 \pm 0.441^*$	8000 ^b
	SCBR 0.03	0.52	$1.222 \pm 0.434^*$	9000 ^a
	ROFA EP	0.45	$0.750 \pm 0.250^*$	8000 ^b
	ROFA UH	0.47	$0.875 \pm 0.330^*$	9000 ^a
48 hr *	Negative Control	0.83	0.600 ± 0.221	10 000
	Positive Control	0.39	$1.500 \pm 0.477^{**}$	10 000
	SCBR 0.3	0.51	$0.900 \pm 0.433^{**}$	10 000
	SCBR 0.03	0.53	$2.400 \pm 0.686^{**}$	10 000
	ROFA EP	0.55	$1.111 \pm 0.261^{**}$	9 000 ^a
	ROFA UH	0.46	$1.444 \pm 0.530^{**}$	9 000 ^a

SCBR (sugar cane burning residues), ROFA/UH (residual oil fly ash from University Hospital of the University of São Paulo), and ROFA/EP (residual oil fly ash collected from an electrostatic precipitator). PCE = Polychromatic Erythrocytes. Positive control (Cyclophosphamide), Negative control (saline). n = number of cells assayed (1000 cells/mouse). MN/PCE = Micronuclei in 100 bone marrow PCEs. ^a One animal died. ^b Two animals died. (*) and (**) ANOVA, $p < 0.0001$, saline *versus* SCBR (0.3 and 0.03), ROFA/UH and ROFA/EP.

Table IV - Micronucleus frequencies (expressed as percent micronucleated tetrads) measured in 300 pollen mother cells from each of fifteen *Tradescantia pallida* inflorescences exposed to combustion particles.

Treatment	Mean $\pm$ SE	N
Negative Control	0.14 $\pm$ 0.06	13
Positive Control	4.70 $\pm$ 1.05 *	10
SCBR 0.3	2.18 $\pm$ 0.35 *	13
SCBR 0.03	5.53 $\pm$ 1.04 *	15
ROFA EP	4.90 $\pm$ 1.07 *	10
ROFA UH	3.43 $\pm$ 0.70 *	11

SCBR (sugar cane burning residues), ROFA/UH (residual oil fly ash from University Hospital of the University of São Paulo), and ROFA/EP (residual oil fly ash collected from an electrostatic precipitator). Positive control (Cyclophosphamide), Negative control (saline). N = Number of the plants treated with one inflorescence. Significant effects of time ($p < 0.001$). (*) Mean MN in 300 tetrads from each of at least 15 plants/group (one inflorescence/plant)

Organic fraction isolated from TSP on harvesting and non-harvesting sugar cane culture seasons induce clastogenic effects, cytotoxicity and apoptosis signals.

Peron M.C.C.^a, Giocondo M.P.^a, Oliveira A.M.^a, Caliri, C.M.^a, Marchi M. R.R.^b, Silva F. S.^b, Arbex M.A.^c, Carvalho-Oliveira, R.^d, P.H.N. Saldiva^d, C.P. Soares^{a*}

^a Laboratory of Cytology and Cellular Biology, Department of Clinical Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, UNESP, São Paulo State University. R. Expedicionários do Brasil, 1621, CEP 14 801 902 Araraquara, São Paulo, Brazil.

^b Analytical Chemistry Department, Institute of Chemistry, UNESP, P.O. Box 355, Araraquara(SP), Brazil

^c Department of Medicine, School Paulista of Medicine, UNIFESP, University Federal of São Paulo, Rua Botucatu 740, 04023-062 – São Paulo – SP

^d Laboratory of Experimental Air pollution, Faculty of Medicine, Department of Pathology, School of Medicine, University of São Paulo (USP), Av. Dr Arnaldo, 455, SP, CEP 01246-903, São Paulo, Brazil.

***Corresponding author:**

Christiane Pienna Soares

School of Pharmaceutical Sciences, UNESP, São Paulo State University, R. Expedicionários do Brasil, 1621, CEP 14 801 902, Araraquara, São Paulo, Brazil. fax: +55-16- 3301-6547; Email address: soarescp@fcfar.unesp.br (C.P. Soares).

Abstract

Ethanol obtained from sugar cane has been considered an alternative fuel, considering that petroleum reserves could be scarced in few years. However, in Brazil, the harvesting is done handly, usually after sugar cane burning which is responsable for seasonal emission of air pollutants. The aim of the study was verify the in vitro cytotoxicity and genotoxicity behaviour, of the TSP in harvesting and non-harvesting seasons. The total suspended particulated (TSP) was sampled and was submmited to two treatments: 1) extracted with organic solvets (DCM:methanol, 4:1); 2) suspended ina a saline solution (0,85 % NaCl). Micronuclei (MN) was quantified in polen mother cells exposed to both, organic extract and suspension, to verify genotoxicity. To verify cell death and apoptosis signal, MTT assay and Bak, Bcl-2 and p53 phosporylated expression were performed in lung carcinoma cell line. Higher frequency of MN was observed in harvesting than non-harvesting TSP, indicating that the season are closely associated with DNA damage of the TSP. Dose-response and time-response were verified and cell death was high in cells exposed to organic extract in both harvesting and non-harvesting material. Higher expression of Bcl-2 and p53 phosphorylated was verified in the cells treated with organic extract in harvesting (3.0 mg/mL) and non-harvesting (0.3 and 3.0 mg/mL) in 24 and 48 hours of treatment. We can conclude that extracted organic compounds from harvesting season, which represents burning sugar cane biomass and non-harvesting time (fuel fossil combustion) are cytotoxic and genotoxic. Public politics should be discuss to found alternatives which could deacrese air pollution emissions.

Key Words: sugar cane biomass, genotoxicity, cytotoxicity, apoptosis, lung cell lines

Introduction

Ethanol produced from sugar cane has been successfully used as an alternative fuel in Brazil since 1970's. The annual burning of sugar cane plantations (crops) is an usual practice during harvesting time, representing an important seasonal source of environmental burning biomass emissions (Arbex et al, 2004). The emissions produce high levels of respirable pyrogenic particles, which is deleterious to the health of exposed population (Arbex et al, 2000; Buschini et al, 2001; Riedl and Diaz -Sanches, 2005).

The pyrolysis of sugar cane foliage under high temperatures emits carbonaceous particles and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) derived from recombination of acetylene units (Godoi et al., 2004a; Godoi et al., 2004b; Zamperlini et al., 2000). PAHs together with aromatic amines, halogenated compounds, aliphatic compounds, aldehydes, ketones, nitrogen dioxide, carbon monoxide, volatile organic compounds and ozone represent the most common outdoor pollutants (Castell et al, 2005). These compounds when inhaled may be absorbed and interact with lung cells or the surrounding tissues. Therefore, the respiratory tract is the primary target organ for the harmful properties of these pollutants. Short-term effects of outdoor air pollution include changes in lung function, respiratory symptoms and mortality due to respiratory failure (Annesi-Maesano and Dab, 2006).

Various studies have shown that air pollution leads to DNA damage specially 'bulky' DNA adducts, which are related to exposure to aromatic compounds, including PAHs (Vienis and Husgafvel-Pursiainen, 2005). The mutagenic potential of PAHs can be revealed by the presence of micronuclei (MN), which are cytoplasmic chromatin-containing bodies formed when acentric chromosome fragments or delayed chromosomes fail to become incorporated into daughter cell nuclei during cell division (Soares, et al,

2003; Russo et al, 2004). Thus, the incidence of micronuclei in animal or plant cells can be used as a biomarker of genotoxicity caused by air pollutants (Alves et al., 2003; Medeiros-Jr et al, 2004; Carvalho-Oliveira et al, 2005).

Moreover, since there is a correlation between DNA damage and cell death, apoptosis has been used as a marker of cell injury induced by urban atmospheric pollution as it represents the cellular response stress and damage (Alfaro-Moreno et al., 2002, Karlsson et al., 2004).

In the present study we evaluated the effects of particulate air pollutants in DNA damage, cytotoxicity and induction of apoptosis signals. Moreover, we investigated the seasonal variation of these biological effects and chemical air pollutants in sugar cane harvesting and non-harvesting periods.

2. Materials and Methods

2.1. Total suspended particles (TSP) sampling

Total suspended particles (TSP) samples were collected at Araraquara city, for 24h during 10 days in March 2003, corresponding to the non-harvesting season and during 10 days in September 2003, corresponding to the harvesting season. The samples were obtained by a high-volume sampler (Handi-vol, Energética, Brazil) operating with an average flow rate of 1.1 to 1.7m³ min⁻¹, which was placed at 4 m height in a sampling site located in a suburban area of the Araraquara city. The equipment was placed in Araraquara downtown under protection from the rain. Araraquara is situated in the so-called “sugar cane belt”, a region in the center of the São Paulo state which is responsible for most of the sugar cane business in Brazil. Araraquara is located at latitude 21°48’11’’S and longitude 48°08’25’’W and with a population of about 200,000 inhabitants. The closest sugar cane

crop is at a distance of approximately 5 km. Particles were collected in glass fiber filters (Energética, Brazil) which were dried during 24 hours at 50°C before and after particle collection for weighting. After this, the filters were stoked in refrigerator at 4°C for posterior analyses.

2.2. Chemical analysis

Chemicals and apparatus

Organic solvents (dichloromethane, methanol and acetonitrile, HPLC grade) were purchased from JT Baker (Xalostoc, México). Water was produced by a Milli-Q (Waters, Midford, MA, USA). All solvents were tested for possible contamination by performing procedural blanks. PAHs standards (purity grade > 99%) were purchased from Aldrich (Milwaukee, USA), except indene[(1,2,3-*cd*) pyrene] purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany).

HPLC/Fluorescence analyse were performed with HPLC Pro Star and Fluorescence detector Model 360 (Varian, Walnut Creek, USA) equipped with a SupelcosilTM LC-PAH column (25 cm x 4.6 mm, 5µm) (Supelco, Bellefonte, USA) . A gradient acetonitrile/water was used [40% Acetonitrile (5 min) → (25 min) → 90% Acetonitrile → (15 min) → 100% Acetonitrile (2 min)], as mobile phase, at a rate of 1.5 mL min⁻¹. The volume sample injected was 10 µL. The fluorescence detector was operated at $\lambda_{\text{excitation}}$ of 240 nm and $\lambda_{\text{emission}}$ of 398 nm, except for indene [(1,2,3-*cd*) pyrene (300 and 466 nm, respectively).

The analyse by GC/MS was performed using a Varian gas chromatograph (CP 3800) coupled with a mass spectrometer detector (Varian, Saturn 2000), with a CP-Sil 8 CB - low bleed/MS) (Chrompack-Varian) capillary column (30 m x 0.25 mm I.D. and film

thickness 0.25 μm). The oven temperature was programmed from 90 $^{\circ}\text{C}$ (1 min) to 120 $^{\circ}\text{C}$ at a rate of 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, and then from 120 to 310 $^{\circ}\text{C}$ at 4 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$, and holding at 310 $^{\circ}\text{C}$ for 20 min. Helium at a flow-rate of 1 mL min^{-1} was used as the carrier gas. The injector temperature was 250 $^{\circ}\text{C}$ in the splitless mode. The transferline and trap temperature were both 250 $^{\circ}\text{C}$. The analysis was performed by electron ionisation (70 e V), with ion-trap as ion analyzer, scanning from 40 to 650 mass units. The volume injected was 1.0 μL .

Table 1 - TSP PAHs' average concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$). Detection Limit (DL) and Quantification Limit (LQ) in HPLC/Flu system (Andrade,2000)

PAH	DL (pg)	LQ (pg)
Phenanthrene	16,2	54
Anthracene	0,94	3,1
Fluoranthene	58,7	196
Pyrene	4,41	14,7
Benzo[a]anthracene	5,67	18,9
Chrysene	33,3	111
Benzo[e]pyrene	3,43	11,4
Benzo[e]acephenantrilene	3,63	12,1
Benzo[k]fluoranthene	0,56	1,87
Benzo[a]pyrene	10,2	34
Dibenzo[a,h]anthracene	120	400
Benzo[g,h,i]perilene	107	357
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	33,2	111

Trace Elemental Comparative determination

The comparative determination of the trace elements in TSP was made from the 24 samples to both the non-harvesting season and harvesting season collected filters, by using a energy dispersive X-ray fluorescence spectrometer analysis(ED-XRF) (EDX 700, Shimadzu Corporation Analytical Instruments Division, Kyoto, Japan). It used a low power Rh-target tube, voltage 5 to 50kV, current 1 to 1000 μ A. The characteristic X-ray radiation was detected by a Si (Li) detector. The analysis were made in vacuum atmosphere, for the element range Na to U, on the 10mm filter surface. The non-exposed filters was used as a blank and its contribution was discounted of the results. The elemental carbon black concentration in the filters was determined by a smoke stain reflectance method (reflectance) using a digital reflectometer da (EEL, Smokestain Reflectometer, mod M43D, UK). The results are showed terms of the element percent .

TSP samples treatment

One-third of each filter was cut in small parts and extracted by 50 mL of dichloromethane: methanol (DCM:MeOH 4:1, v/v) in ultrasonic bath, during 30 minutes. The solvent was evaporated in an evaporator-concentrator at 40-45⁰C until 5 mL, approximately, and after by means of a gentle flow of nitrogen until almost dryness. The residues were re-dissolved in 1.0 mL acetonitrile and then analyzed by HPLC/Fluorescence and GC/MS. The PAHs were quantified (HPLC/Fluorescence) and confirmed (GC/MS) by comparison with authentic standards. Under the fluorescence wavelength used, it was not possible the quantification of naphthalene, acenaphtene e acenaphtylene. Method detection and quantification limits are showed on Table 1.

The other set of filters were also cut in small one-third parts, they were resuspended in 50 mL of 0.85% saline solution and shaking in ultrasound bath for 30 minutes. The filters slices were removed and the suspension was diluted to 0.3 and 3.0 mg/mL.

2.3. Plants

Mutagenesis of pollutants suspension was determined by means of the *Tradescantia* micronucleus assay (TRAD-MCN) in early tetrads of *Tradescantia pallida* (Ma, 1979, Batalha et al., 1999, Carvalho-Oliveira, 2005). Plants were obtained from School of Pharmaceutical's gardens and kept in laboratory for 24 hours in Hoagland's solution before treatment. After this period, cuttings were transferred to Becker jars containing the test solutions, in DCM:MeOH and saline extracts (3.0 and 0.3 mg/ml) from harvesting and non-harvesting TSP. How positive control were used formaldehyde 1000 ppm, negative control Hoagland solution and vehicle control DMSO 3%. for 8h. After the treatment, the were allowed to recover during 24 hours in Hoagland's solution, after that young inflorescences were collected and fixed in 1:3 acetic acid/ ethanol solution. The fixed inflorescences were coded, micronuclei were counted and those codes were revealed only after the completion of the experiment.

2.3.1. Micronucleus test (MN)

Fifteen plants, each with a single inflorescence, were evaluated for each group. The inflorescences were dissected and young anthers squashed in a solution of acetocarmine stain on a glass slide as described by Ma (1981). MN were counted on coded slides, and the code was revealed only after the completion of the experiment. Only preparations containing early tetrads were considered and the number of MN in 300 tetrads from each of

the fifteen plants from each group was counted at 400x magnification. The results were expressed as the percent of tetrads containing MN (frequency of MN).

2.4. Cell Culture and Viability

Lung carcinoma cell line (A549), gently provide by Dr Maria José Soares Mendes Giannini, School of Pharmaceutical Sciences (UNESP), Brazil, was maintained in F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 100U/mL penicillin-streptomycin, 25ng/mL amphotericin B, 10ng/mL kanamycin, 200ng/mL ciprofloxacin. The cell line was plated into 25cm² flasks and maintained in microenvironment at 37°C in a humidified atmosphere with 5% of CO₂, until 90 to 100 % of cellular confluence. Then, cells were trypsinized and 5x10⁴cell/1mL/well were seeded in to 12-well plates. After 24 hours incubation, the cells were treated with different concentrations of particulate obtained in Araraquara city in same season. The cells were treated for 12, 24 and 48 hours, quantitative evaluation of cell viability (%) was assayed by Trypan blue staining method in three independent experiments.

2.5. MTT Assay

Cellular cytotoxicity was determined by MTT assay, as a measurement of the live cell's ability to reduce 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) to violet-coloured formazan after treatment. Cells were seeded into 96-well plates at 2.5 ×10⁴ cells per well and cultured in Ham's F12 containing 10% fetal bovine serum (FBS) until the cells attached (24 hours). Then cells were treated with PHAs isolated from harvesting and non-harvesting TSP at two different concentrations (0.3 and 3.0 mg/mL) and

for 12, 24 and 48 hours in serum-free medium. The medium was removed and the cells were washed with PBS. After, the cells were incubated with MTT for another 3 h at 37°C. Medium was removed and dye crystal formazan was solubilized in 100 µL of dimethyl sulphoxide (DMSO). The MTT assay was performed in triplicate and the absorbance was measured at 540 nm by use of a Bio-Tek Powerwave X microplate reader (BioTek Instruments, Inc., USA). Each treatment (0.3 and 3.0mg/mL) and time (12, 24 and 48 hours) was followed by positive control (doxorubicin 15 µg/ml), negative control (non-treated cells) and vehicle control (DMSO 3%). As negative control results are necessary to calculate (below) cell death (%), negative control is considered equal to zero:

$$\text{Cell Death (\%)} = \frac{\text{negative control absorbance} - \text{test absorbance}}{\text{negative control absorbance}} \times 100$$

2.6. Flow cytometry (Bak, Bcl-2 and p53 phosphorylated)

Bak, Bcl-2 and p53 phosphorylated expression were evaluated by flow cytometry method and 2.5×10^4 cell/1.0mL/well of the both cell lines were cultivated in 24-well plates with Ham's F12 with 10% FBS, in 24 hours. The cells were treated with two different concentrations of PHAs (0.3 and 3.0mg/mL), isolated from harvesting and non-harvesting TSP. After treatment for 12, 24 and 48 hours, a fresh medium was replaced and the cell lines were incubated for more 24 hours. Then, cell lines were trypsinized, placed in sterile eppendorfs and incubated with saponin 0.5% in PBS, for 30 minutes, at room temperature. After incubation, the cells were washed 3 times with PBS and centrifugated to 10 000 rpm 4 °C (p53 phosphorylated) or room temperature (Bak and Bcl-2), for 15 minutes. The cells

were incubated with the monoclonal antibody anti-Bcl-2 (diluted to 1:200, DAKO, Glostrup, Denmark), anti-Bak (diluted to 1:200 DAKO), and p53 phosphorylated (diluted to 1:3000, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) 4 °C overnight. Carefully, the cells were washed several times with PBS and centrifugated to 10 000 rpm , 4 °C (p53 phosphorylated) or room temperature (Bak and Bcl-2) for 15 minutes. After, the cells were incubated, with secondary antibody conjugated with FITC (diluted to 1:60, SIGMA) for 1 hour, at room temperature. Following, the cells was washed 3 times with PBS and fixed with para formaldehyde 1% in PBS. The quantitative expression of Bcl-2, Bak and p53 phosphorilated, established as the intensity of green fluorescence, was determined by FACScalibur flow cytometry (Becton Dickinson, USA). As positive control the cells were treated with 15µg/mL of doxorubicin (Bak and Bcl-2) or 10 µg/mL of methotrexate (p53). As negative control, the cells lines were not treated and as vehicle control the cell lines were treated with DMSO 3%. All controls were performed to each treatment (0.3 and 3.0mg/mL) and time (12, 24 and 48 hours).

2.7. Statistical analysis

Data analysis was done by repeated measures, using either the absolute frequency of MN, cytotoxicity measured by MTT assay and apoptosis signal (Bak, Bcl-2 and p53 phosphorilated) or their square root as the dependent variable in the models. The Tukey test was employed for post-hoc analysis. The level of significance was set at 5%. Statistical analysis was done with the aid of the Instat Mac 2.01 statistical software (GraphPad software, San Diego, CA, USA). The one-way ANOVA on ranks was performed to compare trace element results in TSP sampled in harversting and non-harversting period.

Levene tests for equality variance were also employed (least significance difference) for multiple comparisons among the elements and reflectance and site. Statistical analyses were performed with the aid of the SPSS v13.0 computer package. The level of significance was set at 5%.

3. Results

PAHs concentrations for collected samples are showed in Table 2. Only three PAHs are found in both sampling seasons: pyrene, benzo(e)acephenantrilene and benzo(k)fluoranthene. For these compounds the concentrations are at least ten times higher at harvesting than at no-harvesting season. Table 2 and 3 demonstrate the comparative determination of trace elements (%) by energy dispersive X-ray fluorescence spectrometer analysis (ED-XRF) and elemental carbon black (%) determined by reflectance in TSP samples both non-harvesting and harvesting seasons. Trace elemental concentrations were significant by different between harvesting and non-harvesting TSP samples (Table 3). Trace element Al, Si, K, Cu, Zn, Sr, Zr, Ba, Pb were observed in 1 to 2 times more concentrated were non-harvesting. In contrast, S, Ca, Fe in 2 to 4 times higher in harvesting TSP. Although some elements were observed in lower concentration, in the harvesting TSP sample three main groups could be distinguished among the different samples (table 3). The first group is constituted of Al, Si, Fe, Ca, representing soil aerosol particles, the second group is associated with biomass burning aerosol and S and K indicates the presence of bioorganic aerosol components, the third group is characterized by the presence of Cu, Zn, Sr, Zr, Ba, Pb may indicating elements present in the circulation of superior plants and released during burning of sugar cane.

Figure 1 presents the chromatograms obtained for HPLC/FLU analysis from TSP extracts on harvesting and no-harvesting seasons for sugar cane culture. PAHs found for harvesting season are inespecific for vegetal or fossil biomass (as diesel ou gasoline) burning. Similar PAHs profile as found in other studies on sugar cane burning process (Zamperlini, 1997; Zamperlini, 2000; Godoi, 2004, Andrade, 2004). Nowever it is possible to evaluate a significative influence of the harvesting season on PAHs profile, because the compounds found on no-harvesting season are characteristics of gasoline combustion (Andrade,2004).

Figure 2 presents the frequency of micronuclei (%) in polen mother cells of *Tradescantia pallida*, exposed to PAHs and inorganic compounds isolated from harvesting and non-harvesting TSP. Higher frequency of micronuclei ($p < 0.0001$) was observed between both extracts (DCM:MeOH and saline) in harvesting and non-harvesting samples.

Figure 3 shows cellular cytotoxicity evaluated by MTT assay in A549 cell line treated with PAHs isolated from TSP in harvesting and non-harvesting period. Dose-response ($P = 0.001$) and time-response cell death were observed in all treatments. Higher cell death was observed in non-harvesting 3.0 mg/mL and harvesting 0.3 mg/mL ($p < 0.05$). Moreover, the cell death was higher in 24 and 48h ($p < 0.001$).

Apoptosis cell signals for Bak, Bcl-2 and p53 phosphorylated expressions evaluated by flow cytometry were demonstrated in Figure 4. Dose-response and time-response were observed in Bcl-2 expression (respectively, $P = 0.0091$ and $P = 0.0001$) and p53 phosphorylated (respectively, $P = 0.0335$ and $P = 0.0003$). No significant difference was observed in Bak expression in dose-response and time-response results (respectively $P = 0.6176$ and $P = 0.1380$). Despite moderate expression have been observed (0 to 41%), Bcl-2 expression was higher in harvesting 3.0 mg/mL ($p < 0.05$) and non-harvesting 0.3 and 3.0

mg/mL (respectively, $p < 0.01$ and $p < 0.05$). In addition, Bcl-2 expression was higher in 12 and 24 hours in all treatments (respectively $p < 0.001$ and $p < 0.01$). Although p53 expression have presented low levels (0 to 15%), higher expression was depended by time of the treatment, mainly in 24 and 48h (respectively $p < 0.01$ and $p < 0.001$).

Table 2 - TSP PAHs' average concentration ($\mu\text{g g}^{-1}$). Detection Limit (DL) and Quantification Limit (LQ) in HPLC/Flu system (Andrade,2000)

PAH	Concentration (ng g^{-1})*	
	Non Harvesting	Harvesting
Phenanthrene	ND	0.53
Anthracene	ND	4.11
Fluoranthene	ND	1.29
Pyrene	0.10	1.34
Benzo[a]anthracene	ND	0.52
Chrysene	ND	NQ
Benzo[e]pyrene	ND	0.72
Benzo[e]acephenantrilene	0.079	0.74
Benzo[k]fluoranthene	0.28	3.30
Benzo[a]pyrene	NQ	3.24
Dibenzo[a,h]anthracene	ND	NQ
Benzo[g,h,i]perilene	ND	0.27
Indeno[1,2,3-cd]pyrene	ND	ND

* Extract obtained from TSP of a blend 5 filters collected in different days for the same season.

ND = not detected, below detection limit (Table 1)

NQ =detected but not quantificated, below quantification limit (Table 1)

Table 3 - Descriptive analyses of the results (means, std derivation and std error of means) of the comparative determination of the trace elements by a energy dispersive X-ray fluorescence spectrometer analysis (ED-XRF) in (%) and elemental carbon black determined by a reflectance (%) in TSP samples both non-harvesting and harvesting season.

site	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean
Reflectance non-harvesting	24	27,8792	3,91763	,79968
harvesting	24	11,3833	1,50323	,30685
Al non-harvesting	24	,00200	,001103	,000225
harvesting	24	,00113	,000338	,000069
Si non-harvesting	24	,00367	,000482	,000098
harvesting	24	,00200	,000000	,000000
S non-harvesting	24	7,93163	2,933136	,598724
harvesting	24	13,27563	2,766955	,564802
K non-harvesting	24	,00367	,000482	,000098
harvesting	24	,00200	,000000	,000000
Ca non-harvesting	24	,00625	,004683	,000956
harvesting	24	,18538	,264475	,053986
Fe non-harvesting	24	12,99217	2,502561	,510833
harvesting	24	46,55863	6,988752	1,426573
Cu non-harvesting	24	4,13604	1,573624	,321215
harvesting	24	3,09729	1,361492	,277913
Zn non-harvesting	24	,00367	,000482	,000098
harvesting	24	,00200	,000000	,000000
Sr non-harvesting	24	,00950	,013075	,002669
harvesting	24	,00800	,012998	,002653
Zr non-harvesting	24	,00367	,000482	,000098
harvesting	24	,00200	,000000	,000000
Ba non-harvesting	24	,00367	,000482	,000098
harvesting	24	,00200	,000000	,000000
Pb non-harvesting	24	,73008	,382086	,077993
harvesting	24	,36246	,171378	,034982

Table 4 - Statistical analysis the results of the comparative determination of the trace elements by a energy dispersive X-ray fluorescence spectrometer analysis (ED-XRF) in (%) and elemental carbon black determined by a reflectance (%) in TSP samples.

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Difference	
									Lower	Upper
Reflectance	Equal variances assumed	14,887	,000	19,259	46	,000	16,49583	,85653	14,77172	18,21994
	Equal variances not assumed			19,259	29,629		16,49583	,85653	14,74564	18,24602
Al	Equal variances assumed	16,276	,000	3,715	46	,001	,000875	,000236	,000401	,001349
	Equal variances not assumed			3,715	27,275		,000875	,000236	,000392	,001358
Si	Equal variances assumed	184,000	,000	16,956	46	,000	,001667	,000098	,001469	,001865
	Equal variances not assumed			16,956	23,000		,001667	,000098	,001463	,001870
S	Equal variances assumed	,479	,492	-6,493	46	,000	-5,344000	,823087	-7,000788	-3,687212
	Equal variances not assumed			-6,493	45,844		-5,344000	,823087	-7,000940	-3,687060
K	Equal variances assumed	184,000	,000	16,956	46	,000	,001667	,000098	,001469	,001865
	Equal variances not assumed			16,956	23,000		,001667	,000098	,001463	,001870
Ca	Equal variances assumed	13,627	,001	-3,317	46	,002	-,179125	,053994	-,287809	-,070441
	Equal variances not assumed			-3,317	23,014		-,179125	,053994	-,290816	-,067434
Fe	Equal variances assumed	22,709	,000	-22,152	46	,000	-33,566458	1,515276	-36,6166	-30,5164
	Equal variances not assumed			-22,152	28,803		-33,566458	1,515276	-36,6665	-30,4664
Cu	Equal variances assumed	,072	,790	2,446	46	,018	1,038750	,424753	,183768	1,893732
	Equal variances not assumed			2,446	45,068		1,038750	,424753	,183290	1,894210
Zn	Equal variances assumed	184,000	,000	16,956	46	,000	,001667	,000098	,001469	,001865
	Equal variances not assumed			16,956	23,000		,001667	,000098	,001463	,001870
Sr	Equal variances assumed	,002	,963	,399	46	,692	,001500	,003763	-,006075	,009075
	Equal variances not assumed			,399	45,998		,001500	,003763	-,006075	,009075
Zr	Equal variances assumed	184,000	,000	16,956	46	,000	,001667	,000098	,001469	,001865
	Equal variances not assumed			16,956	23,000		,001667	,000098	,001463	,001870
Ba	Equal variances assumed	184,000	,000	16,956	46	,000	,001667	,000098	,001469	,001865
	Equal variances not assumed			16,956	23,000		,001667	,000098	,001463	,001870
Pb	Equal variances assumed	9,950	,003	4,301	46	,000	,367625	,085479	,195564	,539686
	Equal variances not assumed			4,301	31,894		,367625	,085479	,193487	,541763

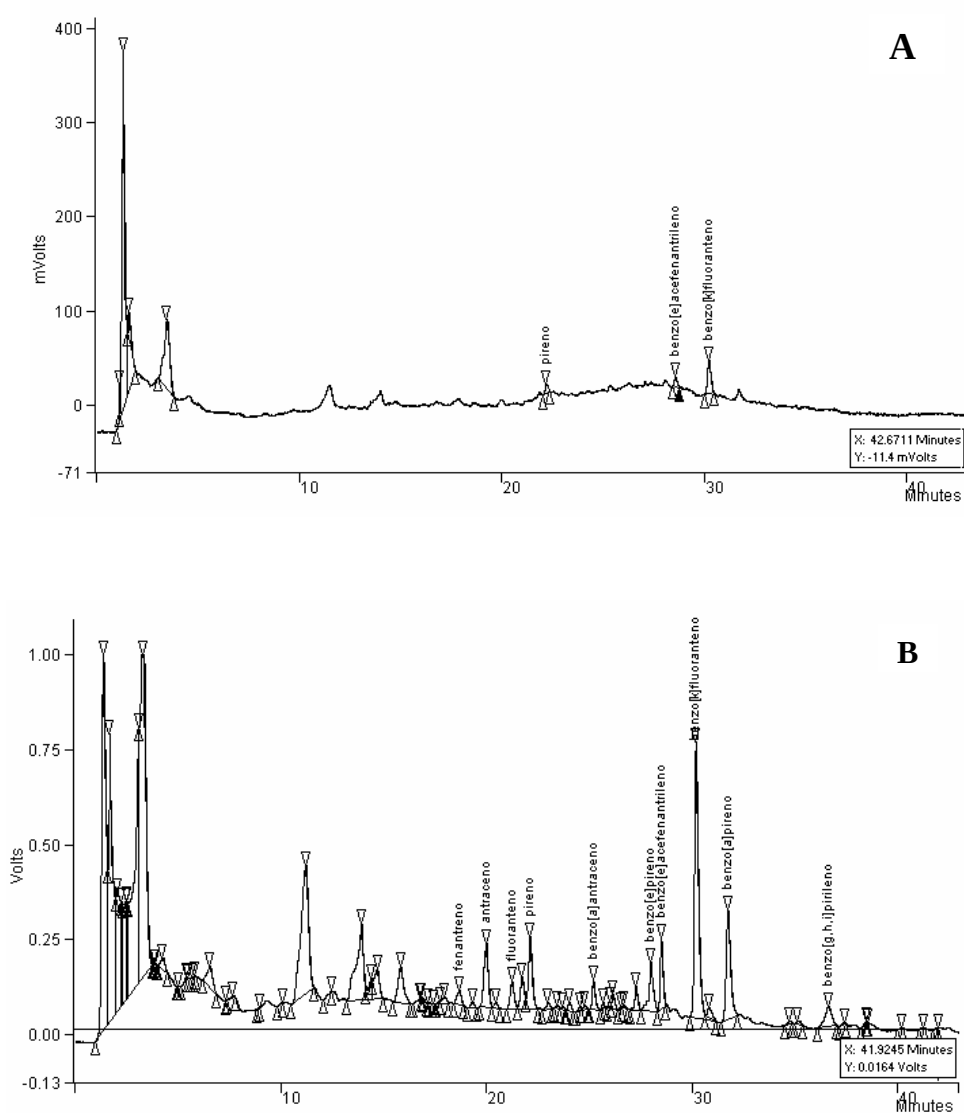


Figure 1 - Chromatograms obtained for HPLC/FLU analysis from TSP extracts on (A) no-harvesting and (B) harvesting seasons for sugar cane culture

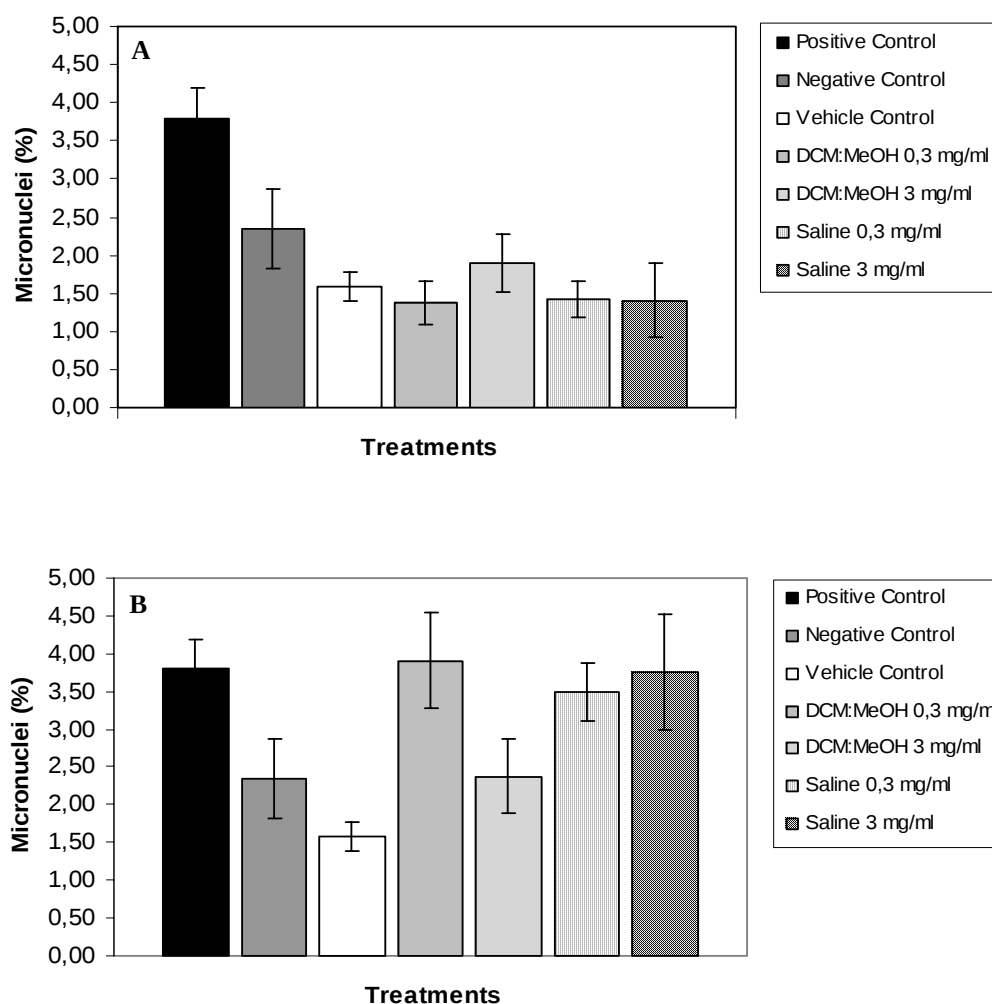


Figure 2 - Frequency of micronuclei (%) in pollen mother cells of *Tradescantia pallida* treated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) at concentrations of 0.3 and 3.0 mg/mL, as well as extracts solubilized in saline (0.3 and 3.0 mg/mL). A) Non- Harvesting B) Harvesting. One Way ANOVA ($p < 0.0001$) with Tukey's pos-test to multiple comparison between harvesting and non-harvesting; $p < 0.001$ - Negative control versus Vehicle control versus DCM:MeOH 0.3mg/mL versus Saline 0.3mg/mL versus Saline 3.0mg/mL; $p < 0.05$ - DCM:MeOH 3.0mg/mL harvesting and non-harvesting.

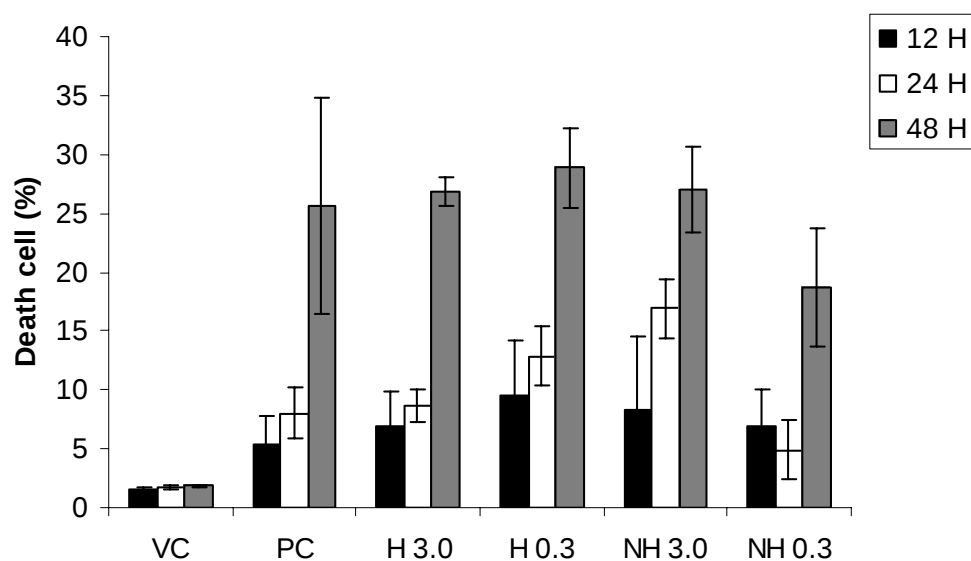


Figure 3 – Percentage of death cell (A549) after in vitro treatment with biomass from burns of sugar-cane; vehicle control (VC), positive control (PC), harvesting (H) in the concentrations of 0,3 and 3,0 mg/mL, as well as no harvesting (NH) 0,3 mg/mL and 3,0 mg/mL.

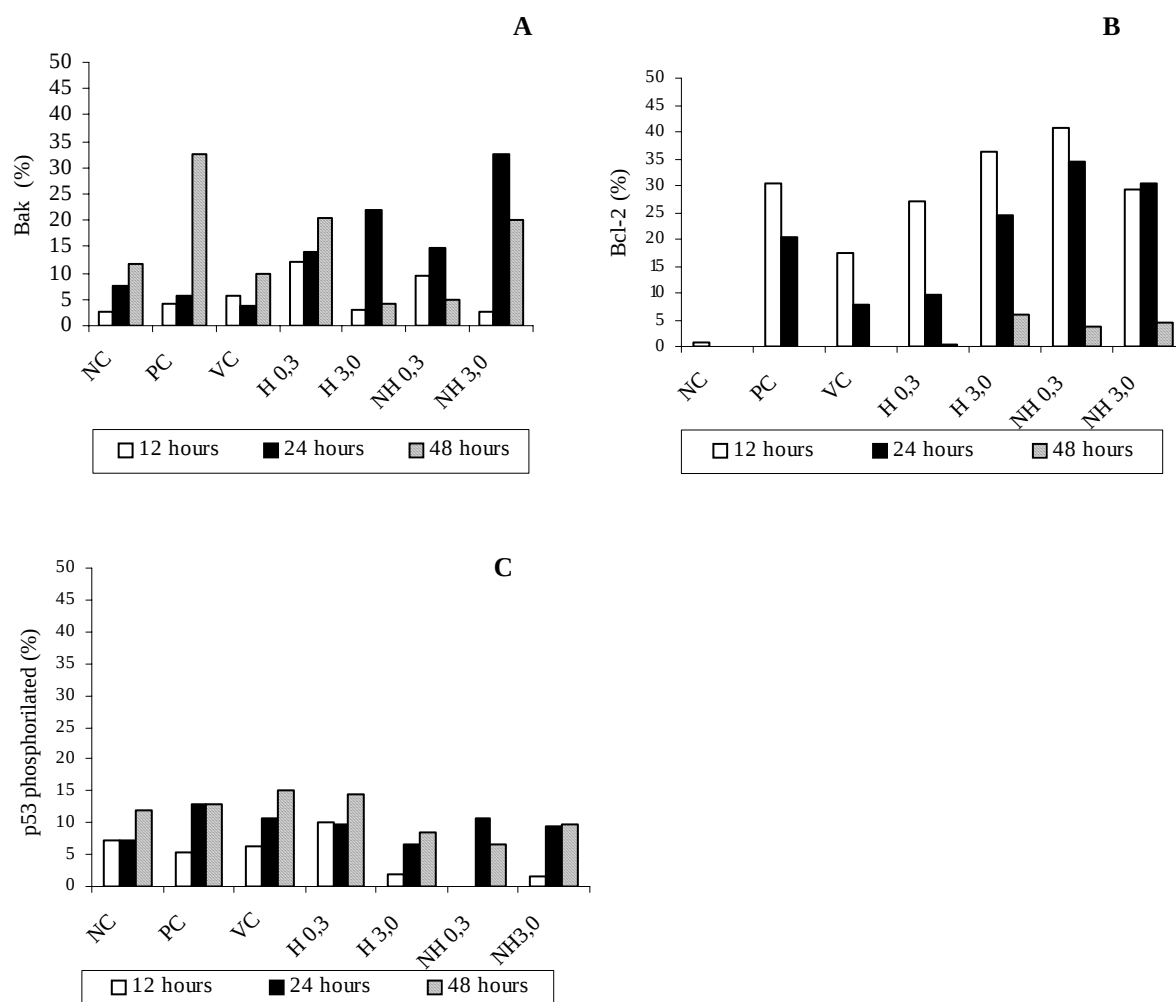


Figure 4 – Apoptosis cell signaling in A549 cell line treated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in harvesting (H) and non-harvesting (NH) TSP, assessed by flow cytometry assay. A), B) and C) Bak, Bcl-2 and p53 phosphorylated proteins expression. Negative Control (NC) = Cell line were not treated; Positive control (PC) = Cell lines treated with doxorubicin (15 μ g/mL) and Vehicle control VC = cell lines were treated with DMSO 3%.

4. Discussion

A number of essential trace metals, e.g. zinc, manganese, copper and chromium is known as potential toxicants, depending on their levels and causing adverse health effects in the exposed individuals (Chukhlovina et al., 2001). In particular, excessive exposure to heavy metals in vivo and in vitro causes distinct toxic effects, due to altered growth and cellular survival (Chukhlovina et al., 2001). Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and several compounds, including trace elements have been also found in sugar cane burning biomass such as we found in the present study (GODOI et al., 2004a; GODOI et al., 2004b; Zamperlini et al., 2000). In accordance with those studies we also found high concentration phenanthrene, fluoranthene, benzopyrene and dibenzanthracene, which are related to cell death, apoptosis and DNA damage (PLISKOVA et al., 2005, ISKANDER et al., 2004, ARIF, SMITH and GUPTA, 1999).

Like other polycyclic aromatic hydrocarbons, certain metabolites of benzo[a]anthracene have been implicated as potent carcinogens and these effects are thought to be caused by the covalent binding of these species to nucleophilic groups on the bases of DNA - adduct (ARIF, SMITH and GUPTA, 1999). As biomarkers of response, cytogenetic analysis determining chromosome aberrations or micronuclei has been widely used. Although, micronuclei and sister chromatid exchanges measured in peripheral white blood cells are satisfactory biomarkers for PAHs exposure (BRANDT and WATSON, 2003) in the present study we could find a close association between high micronuclei frequency in pollen mother cells of *Tradescantia pallida* treated with different times and concentrations of PAHs and collected at different time point. The micronucleus evaluation in *T. pallida* is a sensitive bioassay for mutagenesis that may be employed both under field

and laboratory conditions. Previous study has demonstrated that air pollution mutagenicity could be monitorized successfully by micronuclei in pollen mother cells of *T.pallida* (CARVALHO-OLIVEIRA et al., 2005). Increased frequency of micronuclei observed in harvesting season seems to represent a potential mutagenicity caused by burning sugar cane biomass.

Previous studies have demonstrated that air pollution is likely to increase the risk to lung cancer. Emissions rich in PAHs have been considered an important risk factor to lung cell carcinogenesis (VIENEIS and HUSGAFVEL-PURSIINEN, 2005). In the present study, we found high rates of cell death in lung carcinoma cell line treated with PAHs isolated from TSP of sugar cane harvesting and non-harvesting period. The presence of several components, including metals and polycyclic aromatic hydrocarbons, in the pollutant of the air induces toxicity in the exposed cells resulting in increase of concentration-dependent cellular apoptosis (HETLAND et al, 2004). Moreover higher bcl-2 protein expression was observed in high harvesting and non harvesting PAHs and in 24 and 48h of treatment, indicating, especially in harvesting particulate, that sugar cane burning biomass triggers apoptosis signals. Our findings demonstrated a low expression of p53 phosphorylated in all treatment and at different times, may indicating a inhibition of apoptosis p53-dependent pathway. Pifithrin-alpha, a synthetic inhibitor of p53 activity, abolished both S-phase arrest and apoptosis induced by genotoxic PAHs (PLISKOVA et al., 2005). Modulation of programmed cell death (apoptosis) by different heavy metals seems, at least in part, to determine the lymphocyte immunotoxicity. Normally, the cells with sufficient genomic damage show increased p53-dependent apoptosis which prevents possible malignant transformation and tumor growth. Some heavy metal ions, e.g. Cu (II) and Cr (VI) may enhance apoptosis of lymphoid cells. By contrast, zinc and cadmium ions

are shown to inhibit apoptosis in vitro. Suppression of apoptosis may prevent natural elimination of genetically altered cells, thus conserving DNA mutations and promoting carcinogenic effects in affected cell populations (Chukhlovina et al., 2001).

We can conclude that PAHs present in harvesting and in non-harvesting induces DNA damage, high cytotoxicity and apoptosis signals, indicating that sugar cane burning biomass could be deleterious to the health of the population exposed.

Acknowledgments

The authors are thankful to FAPESP and CNPq by financial support, allowing the performance of this study.

References

Alfaro-Moreno E, Martínez L., Cuellar C. G., Bonner J. C., Murray J. C., Rosas I., Rosales S. P. L., Osornio-Vargas Á. R. Biologic Effects Induced in Vitro by PM10 from Three Different Zones of Mexico City. *Environ Health Perspect* 110:715–720, 2002.

Alves, E.S., Pedroso, A.N.V., Domingos, M., Guimarães, E.T., Saldiva, P.H.N., 2003. Biomonitoramento indoor do potencial mutagênico do ar em laboratórios e herbário do Instituto de Botânica por meio do bioensaio Trad-MCN. *Hoehnea*, 30, 89-94.

Annesi-Maesano I, Dab W. Air pollution and the lung: epidemiological approach. *Med Sci (Paris)*. 22(6-7):589-94, 2006.

Andrade, S.J. - Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em urina. Dissertação (mestrado). IQ/UNESP, 2000, 80pp

Andrade, S.J. – Investigação sobre a composição química e avaliação da atividade mutagênica do material particulado atmosférico sob a influência da queima de cana-de-açúcar. Tese (doutorado). IQ/UNESP, 2004, 103pp

Arif JM, Smith WA, Gupta RC. DNA adduct formation and persistence in rat tissues following exposure to the mammary carcinogen dibenzo[a,l]pyrene. *Carcinogenesis*. 20(6):1147-50, 1999.

Arbex, M.A., Bohm, G.M., Saldiva, P.H.N., Conceição, G.M.S., Pope III, A.C., Braga, A.L.F., 2000. Assessment of the effects of sugar cane plantation burning on daily counts of inhalation therapy. *J. Air & Waste Manage. Assoc.* 50, 1745-1749.

Arbex, M.A., Cançado, J.E.D., Pereira, L.A.A., Braga, A.L.F., Saldiva, P.H.N., 2004. Queima de biomassa e efeitos sobre a saúde. *J. Bras. Pneumol.* 30, 158-175.

Batalha, J.R.F.; Guimarães, E.T.; Lobo, D.J.A.; Lichtenfels, A.J.F.C.; Deur, T.; Carvalho, H.A.; Alves, E.S.; Domingos, M.; Rodrigues, G.S.; Saldiva, P.H.N., 1999. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the *Tradescantia* micronuclei assay. *Mutat. Res.* 426, 229-232.

Buschini, A.; Cassoni, F.; Anceschi, E.; Pasini, L.; Poli, P.; Rossi, C., 2001. Urban airborne particulate: genotoxicity evaluation of different size fractions by mutagenesis test on microorganisms and comet assay. *Chemosphere*, 44, 1723-1736.

Carvalho-Oliveira, R.; Pozo, R.M.K.; Lobo, D.J.A.; Lichtenfels, A.J.F.C.; Martins-Junior, H. A.; Bustilho, J.O.W.V.; Saiki, M.; Sato, I.M.; Saldiva, P.H.N., 2005. Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in São Paulo, Brazil. *Environ. Res.* 98, 1-7.

Godoi, R.H.M.; Godoi, A.F.L.; Worobicc, A.; Andrade, S.J.; Hoog, J.; Santiago-Silva, M.R.; Grieken, R.V. 2004. Characterization of sugar cane combustion particles in the Araraquara region, Southeast Brazil. *Microchimica Acta.* 145, 53-56.

Godoi, A.F.L.; Ravindra, K.; Godoi, R.H.M.; Andrade, S.J.; Santiago-Silva, M.R.; Vaeck, L.V.; Grieken, R.V. 2004. Fast chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aerosol samples from sugar cane burning. *Journal of Chromatography A*. 1027, 49-53

Iskander K, Paquet M, Brayton C, Jaiswal AK. Deficiency of NRH:quinone oxidoreductase 2 increases susceptibility to 7,12-dimethylbenz(a)anthracene and benzo(a)pyrene-induced skin carcinogenesis. *Cancer Res.* 64(17):5925-8, 2004.

Kartzer, A.; Buchhorn, G.H.; Hockertz, S.; Loehr, J.F 2003. In vitro toxicity and mutagenicity of CoCrMo and TiAl wear particles. *Toxicology*. 190, 145-154.

MA, T.H., 1979. Micronuclei induced by X-rays and chemical mutagens in meiotic pollen mother cells of *Tradescantia*. A promising test system. *Mutat Res.*, 64, 307-313.

Ma, T.H.,1981. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube aberration test for in situ monitoring and mutagen screening. *Environ. Health Perspect.* 37, 85-90.

Medeiros Junior, N., Rivero, D.H.R.F., Kasahara, D.I., Saiki, M., Godleski, J.J., Koutrakis, P., Capelozzi, V.L., Saldiva, P.H.N. and Antonangelo, L., 2004. Acute pulmonary and hematological effects of two types of particle surrogates are influenced by their elemental composition. *Environ. Res.* 95, 62-70.

Pliskova M, Vondracek J, Vojtesek B, Kozubik A, Machala M. Deregulation of cell proliferation by polycyclic aromatic hydrocarbons in human breast carcinoma MCF-7 cells reflects both genotoxic and nongenotoxic events. *Toxicol Sci.* 83(2):246-56, 2005.

Riedl M, Diaz-Sanches D. 2005. Biology of diesel exhausts effects on respiratory function. *J Allergy Clin Immunol* 115:221-228.

Russo, C.; Rocco, L.; Morescalchi, M.A; Stingo, V., 2004. Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments. *Ecotoxicol and Environ. Safety* 57, 168-174.

Soares, S.R.C.; Bueno-Guimarães, H.M.; Ferreira, C.M.; Rivero, D.H.R.F.; De Castro, I, Garcia, M.L.B.; Saldiva, P.H.N., 2003. Urban air pollution induces micronuclei in peripheral erythrocytes of mice in vivo. *Environ. Res.* 92, 191-196.

Sumita, N.M.; Mendes, M.E.; Macchione, M.; Guimarães, E.T.; Lichtenfels, A.J.F.C; Lobo, D.J.A.; Saldiva, P.H.N., 2003. *Tradescantia pallida* cv. *purpurea* boom in the characterization of air pollution by accumulation of trace elements. *J. Air & Waste Manage. Assoc.* 53, 574-579.

Vieneis P, Husgafvel-Pursiainen K. Air pollution and cancer: biomarker studies in human populations. *Carcinogenesis* 26(11): pp.1846–1855, 2005

Zamperlini, G.C., Santiago-Silva, M., Vilegas, W., 2000. Solid-phase extraction of sugar cane soot extract for analysis by gas chromatography with flame ionisation and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A.* 889, 281-286.