

Rosa Maria do Vale Bosso

Avaliação da Atividade Mutagênica da
Fuligem Sedimentável Proveniente
da Queima da Cana - de - Açúcar e da
Urina dos Cortadores de Cana Através
de Ensaio com Mutação Gênica Reversa
em *Salmonella Typhimurium*



1910000912



ROSA MARIA DO VALE BOSSO

**Avaliação da Atividade Mutagênica da Fuligem Sedimentável
Proveniente da Queima da Cana-de-Açúcar e da Urina dos
Cortadores de Cana Através de Ensaio com Mutação Gênica
Reversa em *Salmonella typhimurium*.**



912/00

Dissertação apresentada para
obtenção do Grau de Mestre em
Ciências Biológicas-Genética.

já serrevado

São José do Rio Preto - SP
2000

Não importa em que ponto da vida estamos, não importa o que contribuiu para criá-lo, não importa o que está acontecendo, lembre-se de que estamos sempre fazendo o melhor possível, com o conhecimento, percepção e sabedoria que possuímos no momento.

Orientadora: Profa. Dra. Nívea Dulce Tedeschi Conforti Froes

Co-orientadora: Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda

Louise L. Hay



Pedico esta etapa da minha vida especialmente

*A duas pessoas maravilhosas, meus pais
Eleny e Santo, pelo amor, compreensão e ensinamento
dedicado com tanta paciência e carinho. Pelo apoio e por
não lerem*

**Não importa em que ponto da vida estamos, não
importa o que contribuiu para criá-lo, não importa o que está
acontecendo, lembre-se de que estamos sempre fazendo o
melhor possível, com o conhecimento, percepção e
sabedoria que possuímos no momento.**

*A minha querida irmã e amiga, pelas
virtudes que buscamos e ainda buscamos, tanto
profissional quanto espiritualmente.*

Louise L. Hay

Ao terminar essa etapa o sentimento presente é muito especial. A experiência vivida e a maturidade adquirida foi e está sendo de muito valor para me tornar um ser humano melhor.

2

Agradeço especialmente

Dedico esta etapa da minha vida especialmente

À duas pessoas maravilhosas, meus pais Eleny e Santo, pelo amor, compreensão e ensinamento dedicado com tanta paciência e carinho. Pelo apoio e por não terem medido esforços para que alcançasse esse objetivo.

À minha querida irmã e amiga, pelas vitórias que buscamos e ainda buscaremos juntas, tanto profissional quanto espiritualmente.

Ao terminar essa etapa o sentimento presente é muito especial. A experiência vivida e a maturidade adquirida foi e está sendo de muita valia para me tornar um ser humano melhor.

Agradeço especialmente:

À Deus, por poder estar aqui, aprendendo e tentando contribuir da maneira que me é possível nesse momento.

Aos meus pais e irmã, mensagem de amor que me foi enviada como um presente merecedor.

À Nívea, pela valiosa e dedicada contribuição tanto científica quanto direcionando-me a entender que tudo o que necessito vem a mim na perfeita seqüência de espaço e tempo.

À Eliana, pelo carinho com que me recebeu e confiança em mim depositada, além de sua presteza e pronta disposição no momento da implantação da técnica de concentração da urina e em todos os momentos que foi solicitada sua colaboração.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Nívea Dulce Tedeschi Conforti Froes, pela orientação deste trabalho, sem a qual não teria sido possível sua realização. Pelas valiosas críticas e sugestões, que contribuíram de modo fundamental para os meus primeiros passos nos árduos e difíceis caminhos do mundo científico. Pela confiança, incentivo, atenção, apoio, palavras de estímulo e carinho em todos os momentos do desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda, do Departamento de Biologia da FCF de Araraquara, pela co-orientação deste trabalho. Agradeço a atenção, disposição à discussão e dedicação na transmissão dos conhecimentos da técnica utilizada, proporcionando-me condições indispensáveis através de seu laboratório para a realização dos ensaios microbiológicos.

À Profa. Dra. Mary Rosa Santiago Silva, do Departamento de Química Analítica do Instituto de Química de Araraquara, pela pronta disposição e confiança que me recebeu em seu grupo de trabalho, além da grande e indispensável colaboração com relação a extração dos compostos da fuligem e urina, me cedendo espaço e autonomia em seu laboratório para que eu pudesse realizar grande parte deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Wagner Vilegas, do Departamento de Química Orgânica do Instituto de Química da UNESP de Araraquara, por emprestar solventes e a resina no momento em que precisei.



À Profa. Dra. Adriana Barbosa Santos, do Departamento de Ciências da Computação e Estatística do IBILCE, pelo cuidado, atenção e presteza com que realizou a análise estatística dos dados, além da prontidão em me atender quando necessitei de sua colaboração.

À Profa. Dra. Maria Inês Zanolli Sato, do Setor de Microbiologia - CETESB - Cia. Tec. Saneam. Ambiental - São Paulo, por aceitar em participar como membro da banca examinadora deste trabalho, pelas valiosas sugestões que contribuíram na elaboração da forma definitiva. Além da calorosa e prestativa recepção quando estive pela primeira vez na CETESB com dúvidas sobre a metodologia de extração dos compostos da fuligem.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Ceron, professor do curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de concentração em Genética IBILCE / UNESP - SJRP pela aceitação em participar como membro da banca examinadora deste trabalho e pelas criteriosas sugestões que contribuíram na elaboração da forma definitiva.

Às Profas. Dras. Agnes Cristina Fett Conte e Ana Elizabete Silva, professoras do curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de concentração em Genética IBILCE / UNESP - SJRP pelas sugestões apresentadas no exame geral de qualificação.

À todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Área de Concentração em Genética do IBILCE / UNESP e todos professores do Departamento de Biologia deste instituto, pela transmissão de seus conhecimentos e experiências.



Aos voluntários que participaram do estudo cedendo urina, sem os quais o trabalho não poderia ter sido realizado.

À Gisele, Sandra, Ana Flávia, Simone, Rodrigo e Sandro, do grupo da Analítica da Profa. Mary Rosa, pelo apoio constante, recepção calorosa, ajuda nas dúvidas com relação aos equipamentos do laboratório e momentos agradáveis passados juntos.

À todos os funcionários do Instituto de Química da UNESP de Araraquara pela ajuda prestada quando precisei.

À Silvia, Ivone, Marisa e Néia, funcionárias do Departamento de Microbiologia da FCF da UNESP de Araraquara, pela valiosa colaboração prestada sempre que foram solicitadas.

À Paula, irmã, amiga e colega de trabalho, pela preciosa colaboração, paciência e grande participação em todos esses anos morando fora de casa.

À Ana Regina, amiga e colega de trabalho desde a iniciação científica sempre muito prestativa em todos os momentos.

Às amiga e colegas de trabalho do Laboratório de Monitoração de Populações Expostas e Epidemiologia Molecular, Andréa, Bel, Lya e Priscila, pelo carinho da convivência e apoio.

Aos funcionários da Seção de Pós-Graduação, Polo e Biblioteca, em especial Getúlio, Elza e Maria do Carmo, pela disponibilidade com que sempre me atenderam.



Aos funcionários dos Departamentos de Biologia e Botânica por todos os favores prestados.

Aos amigos da Pós-Graduação, pela amizade e pelos bons momentos, que tornou o curso mais agradável.

Ao amigo de Pós-Graduação Marcos Estécio, sempre pronto a colaborar quando solicitado.

A Diretoria do Instituto de Biociência Letras e Ciências Exatas da UNESP de São José do Rio Preto, pelas condições materiais que possibilitaram a realização deste trabalho.

A CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pelo apoio financeiro.

A Todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho

Meus sinceros agradecimentos pelo êxito alcançado.

*Importante e bom, no mundo, é isto: que as
peleças não estão sempre iguais, ainda não foram
terminadas, mas elas vão sempre mudando.
Isso que
a vida me ensinou.*

Guimarães Rosa

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO

1.1 - Considerações Gerais sobre Compostos Fluorados no Processo de Combustão	1
1.2 - O Papel do Ambiente do Aparelhamento de Fecundação	16
1.3 - A Cana-de-Açúcar e a Região de Aracaju	23

2- OBJETIVOS

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Fátiga	27
3.1.1 - Caracterização da Amostra	27
3.1.2 - Metodologia de Extração	29
3.1.2.1 - Extração por Ultrassom	29
3.1.2.2 - Extração por Soxhlet	30
3.2 - Urina	30
3.2.1 - Caracterização dos Indivíduos Amostrados	30
3.2.2 - Metodologia de Extração e Concentração dos Compostos da Urina	31
3.3 - Ensaio de Mutação Gênica Reversa	32
3.3.1 - Linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i>	32
3.3.2 - Verificação das Características Genéticas das Linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i>	33
a) Verificação da Auxotofia 3-Histidina	34
b) Verificação da Presença de Mutação do...	34
c) Verificação da Presença da Orelha negra	34
d) Verificação da Presença da Resistência à Tetraciclina	34
3.3.3 - Sistema de Alívio	34
3.3.4 - Procedimento do	34
3.4 - Controles	34
3.5 - Avaliação e Interpretação dos Resultados	34

"Importante e bonito, no mundo, é isto: que as pessoas não estão sempre iguais, ainda não foram terminadas, mas elas vão sempre mudando. Afinam ou desafinam. Verdade maior. É isso que a vida me ensinou."

Guimarães Rosa

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - Considerações Gerais Sobre Compostos Eliminados no Processo de Combustão.....	1
1.2 - O Papel do Ambiente no Aparecimento de Neoplasias.....	16
1.3 - A Cana-de-Açúcar e a Região de Araraquara.....	22
2 - OBJETIVOS	26
3 - MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 - Fuligem.....	27
3.1.1 - Caracterização da Amostra.....	27
3.1.2 - Metodologia de Extração.....	27
3.1.2.A) Extração por Ultrassonicação	27
3.1.2.B) Extração por Soxhlet.....	28
3.2 - Urina.....	29
3.2.1 - Caracterização dos Indivíduos Amostrados.....	29
3.2.2 - Metodologia de Extração e Concentração dos Compostos da Urina	31
3.3 - Ensaio de Mutação Gênica Reversa.....	32
3.3.1- Linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i>	32
3.3.2 - Verificação das Características Genéticas das Linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i>	34
a) Verificação da Auxotrofia à Histidina.....	34
b) Verificação da Presença de Mutação <i>rfa</i>	34
c) Verificação da Presença da Deleção <i>uvrB</i>	34
d) Verificação da Presença do Plasmídio de Resistência pKM101 (fator R) que confere resistência a ampicilina.....	35
3.3.3 - Sistema de Ativação Metabólica.....	35
3.3.4 - Procedimento do ensaio (<i>Salmonella</i> /microsoma).....	36
3.4 - Controles.....	37
3.5 - Avaliação e Interpretação dos Resultados.....	38



4 - RESULTADOS	39
4.1 - Atividade Mutagênica dos Extratos Orgânicos da Urina.....	39
4.1.1 - Atividade Mutagênica na Presença de Ativação Metabólica.....	39
4.1.2 - Atividade Mutagênica na Ausência de Ativação Metabólica.....	48
4.1.3 - Comparação da Atividade Mutagênica Relacionando os Grupos. Linhagens, Doses e Metabolização.....	56
4.2 - Atividade Mutagênica dos Extratos Orgânicos da Fuligem.....	63
4.2.1 - Atividade Mutagênica do Extrato Orgânico da Fuligem por extração Ultrassônica.....	63
4.2.2 - Atividade Mutagênica do Extrato Orgânico da Fuligem por Extração Soxhlet.....	69
5 - DISCUSSÃO	75
5.1 - Atividade Mutagênica detectada na Urina.....	75
5.2 - Atividade Mutagênica da Fuligem Sedimentável da Cana-de-Açúcar...	85
6 - CONCLUSÕES	91
7 - RESUMO	92
8 - SUMMARY	94
9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95
10 - APÊNDICE	111
11 - ANEXOS	135

Lista de Figuras

Figura

1 - Estruturas dos HAPs considerados como poluentes prioritários pela EPA.....	3
2 - Regiões de um hidrocarboneto aromático policíclico.....	5
3 - Etapas do metabolismo do benzo(a)pireno.....	6
4 - Estrutura química de alguns nitro hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (nitro HAPs).....	9
5 - Metabolismo oxidativo do 1-nitropireno.....	11
6 - Estrutura química de aminas aromáticas e arilamidas. Ac = -COCH ₃	13
7 - Vias metabólicas das aminas aromáticas e arilamidas. PHS = Prostaglandina H sintetase. Ac = -COCH ₃	14
8 - Curvas dose-resposta dos extratos orgânicos da urina, adsorvidos pela resina XAD-2, do grupo exposto à queimada da cana-de-açúcar (E) e grupo controle (C) nas diferentes doses testadas, frente as linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, YG1024 e YG1021 na presença de ativação metabólica.....	42
9 - Resposta mutagênica expressa em razão de mutagenicidade dos extratos orgânicos da urina, adsorvidos pela resina XAD-2, do grupo exposto à queima da cana-de-açúcar (E) e grupo controle (C) nas diferentes doses testadas, frente as linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, YG1024 e YG1021 na presença de ativação metabólica.....	47
10 - Curvas dose-resposta dos extratos orgânicos da urina, adsorvidos pela resina XAD-2, do grupo exposto à queima da cana-de-açúcar (E) e grupo controle (C) nas diferentes doses testadas, frente as linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, YG1024 e YG1021 na ausência de ativação metabólica.....	51
11 - Resposta mutagênica expressa em razão de mutagenicidade dos extratos orgânicos da urina, adsorvidos pela resina XAD-2, do grupo exposto à queima da cana-de-açúcar (E) e grupo controle (C) nas diferentes doses testadas, frente as linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, YG1024 e YG1021 na ausência de ativação metabólica.....	55
12 - Comparação da atividade mutagênica nas linhagens TA98, YG1024 e YG1021, obtida na presença de ativação metabólica, utilizando-se o extrato orgânico da urina dos indivíduos do grupo exposto e controle na dose zero µL/placa.....	57
13 - Comparação da atividade mutagênica nas linhagens TA98, YG1024 e YG1021, obtida na presença de ativação metabólica, utilizando-se o extrato orgânico da urina dos indivíduos do grupo exposto e controle na dose 6,25 µL/placa.....	58
14 - Comparação da atividade mutagênica nas linhagens TA98, YG1024 e YG1021, obtida na presença de ativação metabólica, utilizando-se o extrato orgânico da urina dos indivíduos do grupo exposto e controle na dose 12,5 µL/placa.....	59
15 - Comparação da atividade mutagênica nas linhagens TA98, YG1024 e YG1021, obtida na presença de ativação metabólica, utilizando-se o extrato orgânico da urina dos indivíduos do grupo exposto e controle na dose 25 µL/placa.....	60

16 - Comparação da atividade mutagênica nas linhagens TA98, YG1024 e YG1021, obtida na presença de ativação metabólica, utilizando-se o extrato orgânico da urina dos indivíduos do grupo exposto e controle na dose 50 µL/placa.....	61
17 - Comparação da atividade mutagênica nas linhagens TA98, YG1024 e YG1021, obtida na ausência de ativação metabólica, agrupando-se as diferentes doses (µL/placa) utilizadas do extrato orgânico da urina dos indivíduos dos grupos exposto e controle.....	62
18 - Curvas dose-resposta do extrato orgânico ultrassônico do material particulado da fuligem sedimentada da cana-de-açúcar nas diferentes doses, utilizando as linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, YG1024 e YG1021 tanto na presença quanto ausência de ativação metabólica.....	66
19 - Curvas dose-resposta do extrato orgânico soxhlet do material particulado da fuligem sedimentada da cana-de-açúcar nas diferentes doses, utilizando as linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, YG1024 e YG1021 tanto na presença quanto ausência de ativação metabólica.....	72

Lista de Tabelas

Tabela

1 - Descrição das amostras de indivíduos expostos à queima da cana (E) e controles (C), quanto à idade, sexo, tempo de exposição e atividade profissional.....	30
2 - Descrição comparada das linhagens bacterianas.....	33
3 - Estatística descritiva do número de revertentes his+/placa, indicando tamanho da amostra (N), média ($\bar{X}$) e desvio padrão (DP), calculados para o grupo controle (C) e grupo exposto (E) à queima da cana-de-açúcar em diferentes doses utilizando-se as linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, YG1024 e YG1021 na presença de ativação metabólica. Entre parênteses após o tamanho da amostra, está indicado o número de placas analisadas para cada dose testada.....	40
4 - Resposta mutagênica dos extratos orgânicos da urina expressa em razão de mutagenicidade (RM) do grupo controle (C) e grupo exposto à queima da cana-de-açúcar (E) nas diferentes doses testadas, frente às linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, YG1024 e YG1021 na presença de ativação metabólica.....	43
5 - Estatística descritiva expressa em razão de mutagenicidade (RM), indicando tamanho da amostra (N), média ($\bar{X}$) e desvio padrão (DP), calculados para o grupo controle (C) e grupo exposto à queima da cana de açúcar (E) em diferentes doses utilizando-se as linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, YG1024 e YG1021 na presença de ativação metabólica.....	46
6 - Estatística descritiva do número de revertentes his+/placa, indicando tamanho da amostra (N), média ($\bar{X}$) e desvio padrão (DP), calculados para o grupo controle (C) e grupo exposto (E) à queima da cana-de-açúcar em diferentes doses, utilizando-se as linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, YG1024 e YG1021 na ausência de ativação metabólica. Entre parênteses após o tamanho da amostra, está indicado o número de placas analisadas para cada dose testada.....	49
7- Resposta mutagênica dos extratos da urina expressa em razão de mutagenicidade (RM), do grupo controle (C) e grupo exposto à queima da cana de açúcar (E) nas diferentes doses testadas frente às linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, YG1024 e YG1021 na ausência de ativação metabólica.....	52
8 - Estatística descritiva expressa em razão de mutagenicidade (RM), indicando tamanho da amostra (N), média ($\bar{X}$) e desvio padrão (DP), calculados para o grupo controle (C) e grupo exposto à queima da cana de açúcar (E) em diferentes doses utilizando-se as linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, YG1024 e YG1021 na ausência de ativação metabólica.....	54
9 - Estatística descritiva do número de revertentes his+/placa, utilizando-se as linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, YG1024 e YG1021 na presença (+S9) e ausência (-S9) de ativação metabólica, obtida para as diferentes doses ($\mu\text{g/placa}$) do extrato orgânico ultrassônico do material particulado da fuligem sedimentada da cana-de-açúcar. Os valores estão apresentados como média de triplicata ($\bar{X}$) $\pm$ desvio padrão (DP).....	64

10 - Resposta mutagênica do extrato orgânico ultrassônico do material particulado da fuligem sedimentada da cana-de-açúcar expressa em razão de mutagenicidade (RM) nas diferentes doses. utilizando-se as linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, YG1024 e YG1021, tanto na presença quanto ausência de ativação metabólica	68
11 - Estatística descritiva do número de revertentes his+/placa, utilizando-se as linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, YG1024 e YG1021 na presença (+S9) e ausência (-S9) de ativação metabólica, obtida para as diferentes doses (µg/placa) do extrato orgânico soxhlet do material particulado da fuligem sedimentada da cana-de-açúcar. Os valores estão apresentados como média de triplicata ($\bar{X}$) ± desvio padrão (DP).....	70
12 - Resposta mutagênica do extrato orgânico soxhlet do material particulado da fuligem sedimentada da cana-de-açúcar expressa em razão de mutagenicidade (RM) nas diferentes doses, utilizando as linhagens de <i>Salmonella typhimurium</i> TA98, YG1024 e YG1021, tanto na presença quanto ausência de ativação metabólica.....	73

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Considerações Gerais sobre Compostos Eliminados no Processo de Combustão

A combustão de matéria orgânica tem causado grande impacto ambiental devido à emissão de gases e partículas (Crutzen *et al.*, 1979, Crutzen e Andrae, 1990, Lobert *et al.*, 1990, Cicerone, 1994). Esse processo proporciona a maior fonte de emissão de material particulado que chega a ser estimada em 104 Tg/ano (104.000.000.000 Kg/ano). No Brasil, a contribuição de materiais particulados provém das queimadas no cerrado, no Amazonas e de processos agrícolas. O material particulado afeta a saúde humana, principalmente os pulmões, provocando efeito crônico no trato respiratório. A biosfera também é afetada, uma vez que modifica a composição das espécies, alterando a cadeia alimentar e bloqueando a luz solar provocando mudanças climáticas e interferindo, conseqüentemente no ecossistema, pois a deposição da fuligem afeta a adsorção de CO_2 e O_2 (Botkin e Keller, 1995).

O processo de combustão ocorre envolvendo três estágios designados ignição, flamejamento e combustão lenta. A ignição é o processo inicial no qual se tem pequenas chamas. No segundo estágio, a combustão é mais eficiente e há emissão de dióxido de carbono (CO_2), nitrogênio (N_2), água (H_2O) óxido nítrico (NO_x) e dióxido de enxofre (SO_2). No terceiro estágio, processo de baixa temperatura e ausência de chama, há emissão de grandes quantidades de compostos oxidados incompletamente, tais como, monóxido de carbono (CO), metano (CH_4) e outros hidrocarbonetos particulados. Entre os dois últimos estágios tem-se a formação de etino (C_2H_2) e cianogênio (NCCN). O etino sofre polimerização, via radicais livres, até a formação dos núcleos aromáticos, dando origem aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs). Alguns HAPs contendo menor número de anéis aromáticos (Naftaleno, Fenantreno e Antraceno) reagem formando outros HAPs de maior peso (Hepp *et al.*, 1995).



Os HAPs, assim como as aminas aromáticas e nitro hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (nitro-HAPs), representam uma classe importante de poluentes ambientais, que são conhecidos por sua ação mutagênica e/ou carcinogênica, pois as lesões resultantes das ligações desses compostos com o DNA quando não reparadas poderão iniciar o processo neoplásico.

Os HAPs constituem uma subclasse dos compostos policíclicos aromáticos (CPAs). São moléculas orgânicas formadas por átomos de hidrogênio e carbono encontradas como subprodutos da combustão incompleta de materiais orgânicos, tais como, fuligens das queimadas, carvão, gás, óleo, combustíveis fósseis, madeira, lixo, produtos de tabaco e outros, e encontrados, portanto, no ambiente ocupacional e residencial.

A *Environmental Protection Agency* (EPA) dos Estados Unidos considera como poluentes prioritários para investigação ambiental 16 HAPs (EPA, 1988), cujas estruturas estão representadas na Figura 1.

A maior fonte desses compostos nocivos provém da emissão de materiais particulados da queima de plantações agrícolas ou da madeira do fogão à lenha bem como, da combustão do carvão, da cobertura do piche, de incêndio de florestas, motores de veículos e produção de coque (Van Houdt, 1990, Lewtas *et al.*, 1992). Tais compostos atuam por dispersão das cinzas, atingindo o homem pela inalação ou através da pele, sendo que a contaminação do ambiente se dá por escoamento de água (Deportes *et al.*, 1995).

Desde 1920, uma intensa série de investigações tem sido empreendida visando identificar e isolar HAPs com atividade carcinogênica. Como resultado, o benzo(a)pireno (B(a)P) foi reconhecido como o principal e mais ativo componente do alcatrão, motivo pelo qual têm se realizado estudos detalhados sobre a relação entre a estrutura química e a atividade desses compostos, a fim de que o risco para o homem possa ser melhor avaliado e, conseqüentemente, minimizado (Diple *et al.*, 1990).

As hipóteses existentes até então para explicar a ação dos HAPs baseavam-se em estudos empíricos sobre a estrutura química. Os supostos



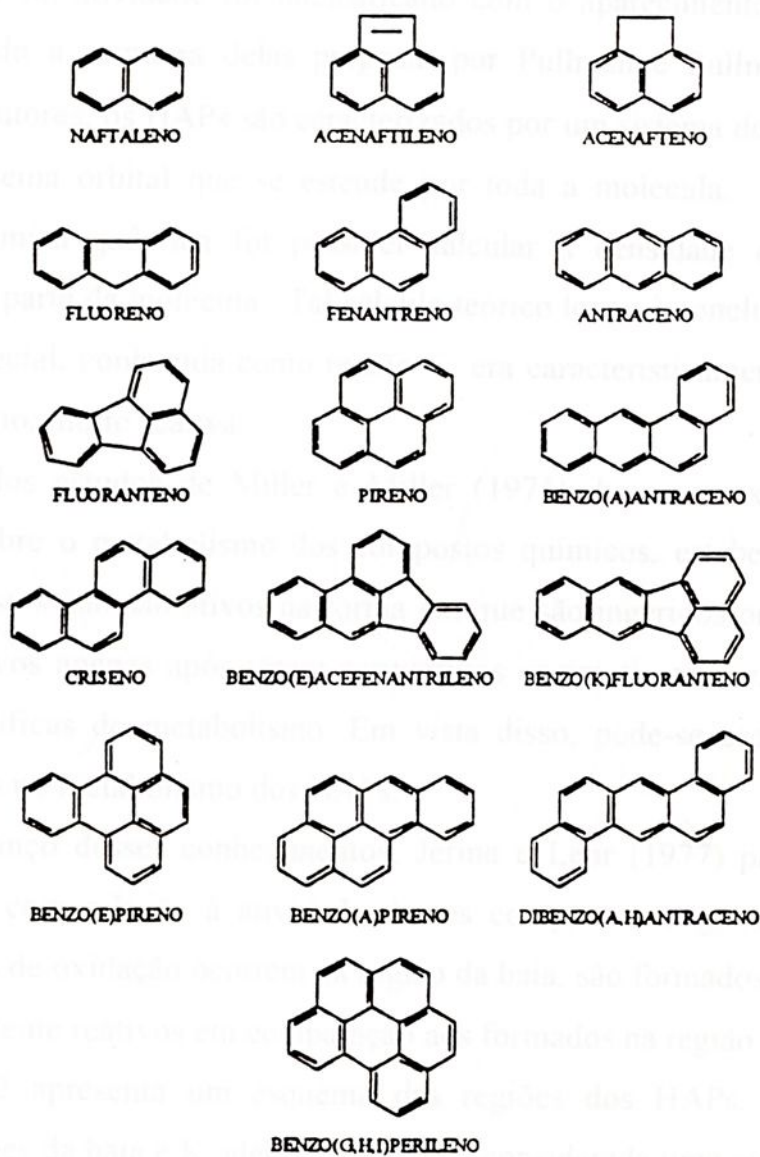


Figura 1 - Estruturas dos HAPs considerados como poluentes prioritários pela EPA.

requerimentos para a atividade carcinogênica dos HAPs pareciam residir na sua estrutura coplanar e na presença de um núcleo fenantreno junto, preferencialmente, com pelo menos um anel adicional de benzeno. Todavia, o entendimento de tal atividade foi intensificado com o aparecimento de teorias eletrônicas, sendo a primeira delas proposta por Pullman e Pullman (1955). Segundo esses autores, os HAPs são caracterizados por um sistema de elétrons π , ou seja, um sistema orbital que se estende por toda a molécula. Através de métodos de química quântica foi possível calcular a densidade de elétrons associada a cada parte da molécula. Tal cálculo teórico levou à conclusão de que uma ligação especial, conhecida como região K, era caracteristicamente rica em elétrons e, portanto, muito reativa.

A partir dos estudos de Miller e Miller (1971), houve a expansão do conhecimento sobre o metabolismo dos compostos químicos, 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. Em vista disso, pode-se esclarecer os passos envolvidos no metabolismo dos HAPs.

Com o avanço desses conhecimentos, Jerina e Lehr (1977) propuseram uma outra teoria com relação à atividade desses compostos, segundo a qual, quando as reações de oxidação ocorrem na região da baía, são formados epóxidos muito mais fortemente reativos em comparação aos formados na região K.

A Figura 2 apresenta um esquema das regiões dos HAPs. Pode-se identificar as regiões da baía e K, além da região A, considerada uma extensão da baía, e a região L que, dentre todas, efetua o papel mais importante no mecanismo de destoxificação (Lei-Scheng, 1985).

De modo resumido, o metabolismo dos HAPs (Figura 3) é mediado pela aril hidrocarboneto hidroxilase (AHH), uma das muitas monoxigenases de função mista, que participam das reações de ativação metabólica da Fase II do metabolismo celular.

Figura 2 - Regiões de um hidrocarboneto aromático polícíclico



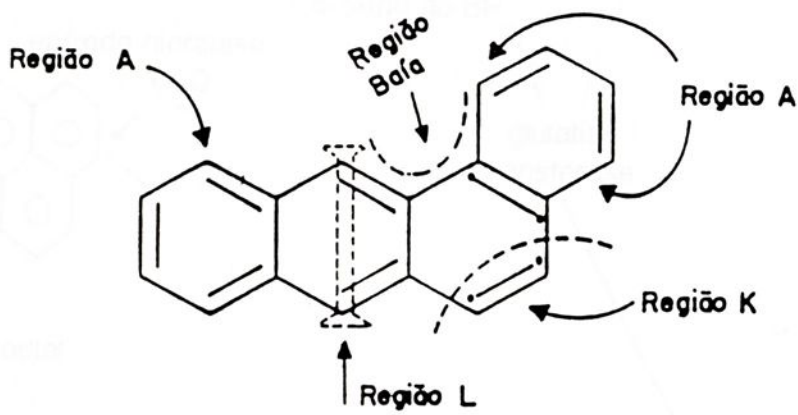


Figura 2 - Regiões de um hidrocarboneto aromático policíclico

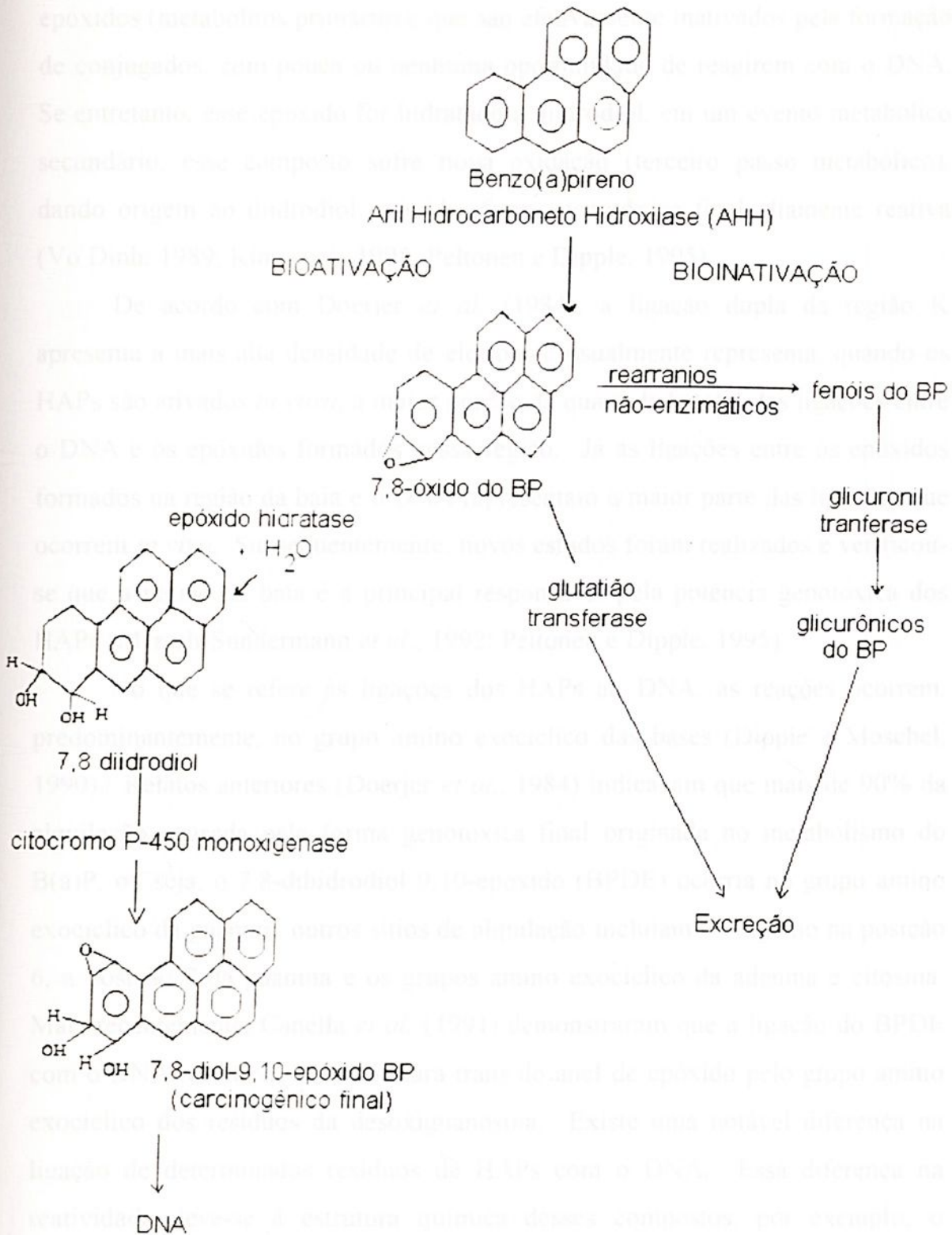


Figura 3- Etapas do metabolismo do benzo(a)pireno.

Uma vez em contato com o organismo, esses compostos são oxidados a epóxidos (metabólitos primários), que são efetivamente inativados pela formação de conjugados, com pouca ou nenhuma oportunidade de reagirem com o DNA. Se entretanto, esse epóxido for hidratado a dihidrodiol, em um evento metabólico secundário, esse composto sofre nova oxidação (terceiro passo metabólico), dando origem ao dihidrodiol epóxido, forma genotóxica final altamente reativa (Vo Dinh, 1989; Kim *et al.*, 1995; Peltonen e Dipple, 1995).

De acordo com Doerjer *et al.* (1984), a ligação dupla da região K apresenta a mais alta densidade de elétrons e usualmente representa, quando os HAPs são ativados *in vitro*, a maior porção da quantidade total das ligações entre o DNA e os epóxidos formados nessa região. Já as ligações entre os epóxidos formados na região da baía e o DNA representam a maior parte das ligações que ocorrem *in vivo*. Subsequentemente, novos estudos foram realizados e verificou-se que a região da baía é a principal responsável pela potência genotóxica dos HAPs (Mersch-Sundermann *et al.*, 1992; Peltonen e Dipple, 1995).

No que se refere às ligações dos HAPs ao DNA, as reações ocorrem, predominantemente, no grupo amino exocíclico das bases (Dipple e Moschel, 1990). Relatos anteriores (Doerjer *et al.*, 1984) indicavam que mais de 90% da alquilação causada pela forma genotóxica final originada no metabolismo do B(a)P, ou seja, o 7,8-dihidrodiol 9,10-epóxido (BPDE) ocorria no grupo amino exocíclico da guanina; outros sítios de alquilação incluíam o oxigênio na posição 6, a posição 7 da guanina e os grupos amino exocíclico da adenina e citosina. Mais recentemente, Canella *et al.* (1991) demonstraram que a ligação do BPDE com o DNA resulta de uma abertura trans do anel de epóxido pelo grupo amino exocíclico dos resíduos da desoxiguanosina. Existe uma notável diferença na ligação de determinados resíduos de HAPs com o DNA. Essa diferença na reatividade deve-se à estrutura química desses compostos, por exemplo, o dimetil-benzo(a)antraceno (DMBA) possui um grupo metil na região da baía, o que não ocorre com o B(a)P. Isso permite que o DMBA reaja, semelhantemente, com a desoxiadenina e a desoxiguanosina e o B(a)P reaja quase que apenas com



a desoxiguanosina (Dipple *et al.*, 1990; Peltonen e Dipple, 1995). Essas diferenças de conformação podem presumivelmente levar à diferenças nas vias em que os adutos de DNA são reparados ou não durante o processo da duplicação celular, conferindo capacidade diferencial na indução de mutações gênicas e no aparecimento de uma lesão pré-neoplásica irreversível (Peltonen e Dipple, 1995).

Os nitro-HAPs são contaminantes amplamente distribuídos no ambiente, sendo formados como resultado do processo de combustão incompleta de matéria orgânica, como as queimadas dos canaviais, ou através da simples reação na atmosfera de HAPs com óxidos de nitrogênio e quantidades pequenas de ácidos (Heflich, 1990, Shah *et al.*, 1991). O processo de contato com o homem pode ser através da pele, do trato respiratório e gastrointestinal (ABmann *et al.*, 1997), de modo que tal contato ocorre através do material particulado que os nitro-HAPs estão adsorvidos, material esse que varia de tamanho inalável ou não inalável (Rosenkranz, 1996). A Figura 4 mostra alguns dos já bem estudados nitro-HAPs.

O interesse na mutagenicidade e nos possíveis riscos à saúde atribuídos a esses compostos intensificou-se quando nitropirenos altamente mutagênicos foram isolados como contaminantes de alguns "toners" fotocopiadores, na década de 70 (Tokiwa e Ohnishi, 1986). A partir daí, vários estudos foram realizados mostrando que muitos nitro-HAPs são mutagênicos em células bacterianas e em células de cultura de mamíferos, além de também induzirem aberrações cromossômicas e trocas entre cromátide irmãs (Rosenkranz e Mermelstein, 1983). Mais recentemente estabeleceu-se a capacidade dos compostos do grupo 1,6-dinitropireno induzirem mutações *in vivo* (locus HPRT, oncogene K-ras, e gene supressor de tumor p-53) (Smith *et al.*, 1995, Rosenkranz, 1996), de modo que no geral os dinitro-HAPs são mais mutagênicos que os seus análogos mononitros-HAPs e são carcinogênicos em roedores induzindo uma variedade de tumores tanto no sítio de aplicação quanto distante dele (Rosenkranz e Mermelstein, 1983), identificando que o potente efeito dessas substâncias à saúde



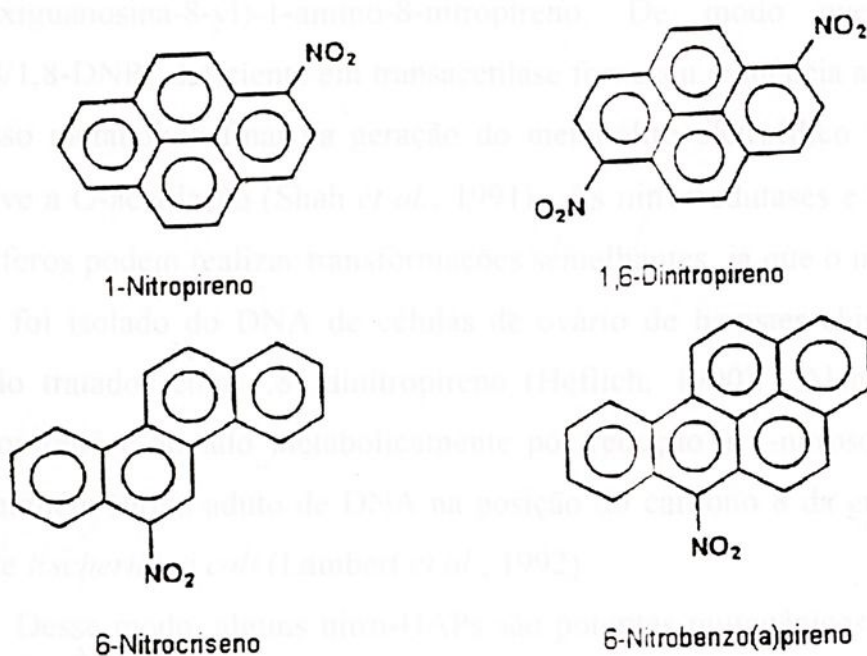


Figura 4 - Estrutura química de alguns nitro hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (nitro HAPs).

inclui sua toxicidade crônica e aguda, sendo considerados, no momento, como eficientes carcinogênicos (ABmann *et al.*, 1997).

Os dinitropirenos foram de grande interesse devido a sua extraordinária mutagenicidade em alguns ensaios principalmente nos de reversão em *Salmonella typhimurium*. Nesses, o 1,8-dinitropireno produz uma potente resposta mutagênica na ausência de ativação metabólica, possivelmente como resultado da nitrorredução bacteriana à N-hidroxi-1-amino-8-nitropireno, seguida pela O-acetilação bacteriana à uma forma que reage com o DNA, formando N-(desoxiguanosina-8-yl)-1-amino-8-nitropireno. De modo que a linhagem TA98/1,8-DNP₆, deficiente em transacetilase forneceu evidência adicional de que o passo metabólico final na geração do metabólito eletrofílico final realmente envolve a O-acetilação (Shah *et al.*, 1991). As nitrorredutases e O-acetilases de mamíferos podem realizar transformações semelhantes, já que o mesmo aduto de DNA foi isolado do DNA de células de ovário de hamster chinês e de ratos, quando tratados com 1,8- dinitropireno (Heflich, 1990). Além disso, o 1,8-dinitropireno é ativado metabolicamente por redução à 1-nitroso-8-nitropireno, que também forma aduto de DNA na posição do carbono 8 da guanina do gene *lacI* de *Escherichia coli* (Lambert *et al.*, 1992)

Desse modo, alguns nitro-HAPs são potentes mutagênicos de ação direta em sistemas que empregam células bacterianas, já outros apresentam níveis baixos de mutagenicidade podendo também ser metabolizados pelos microsossomos do fígado de mamíferos, a 3-, 6- e 8-hidroxi-1-nitropireno e a 4,5- e 9,10-óxidos de 1-nitropireno (Figura 5). Além disso, o metabolismo dos óxidos de 1-nitropireno pela epóxido hidrolase resulta nos diidrodióis correspondentes. Os óxidos e fenóis de 1-nitropireno são todos substratos para nitrorredução bacteriana e de mamíferos e resultam nas ligações desses compostos ao DNA, gerando mutações. A oxidação do anel seguida pela nitrorredução bacteriana parece ser a principal via de ativação para a mutagenicidade do 1-nitropireno quando mediada pela mistura S9 em *Salmonella typhimurium*. Em animais de laboratório, o 1-nitropireno, é convertido a metabólitos, que são o produto da

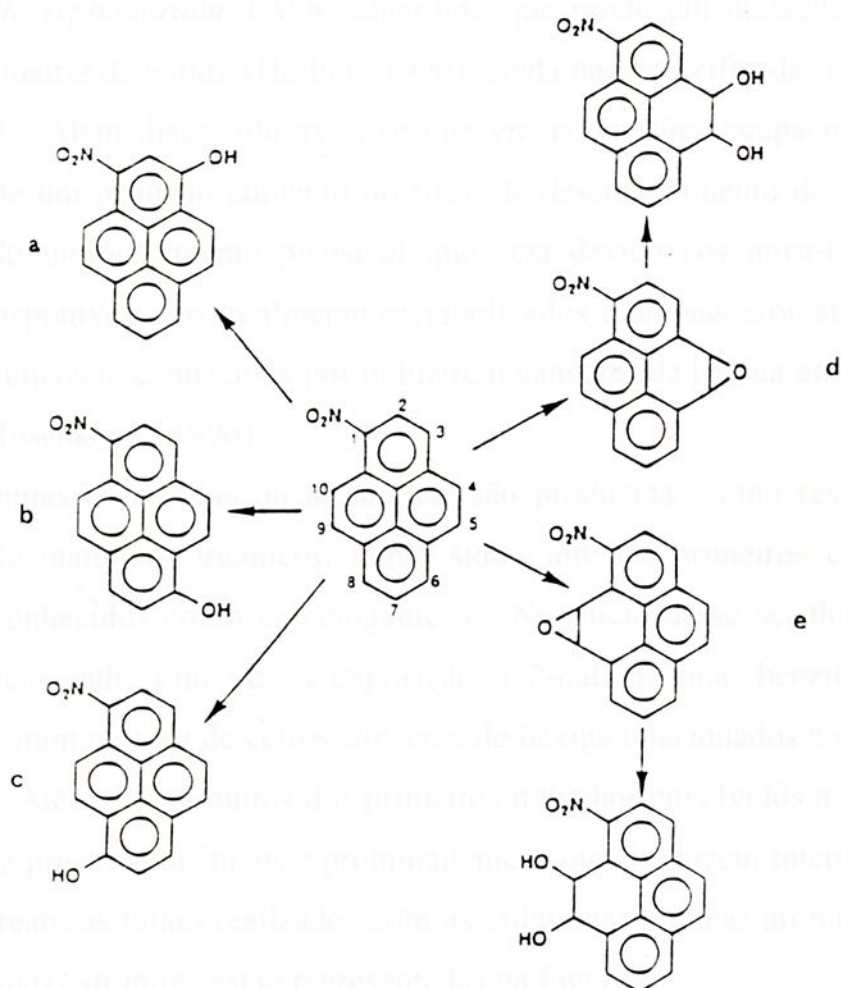


Figura 5 - Metabolismo oxidativo do 1-nitropireno. a, 3-hidroxi-1-nitropireno; b, 6- hidroxi-1-nitropireno; c, 8- hidroxi-1-nitropireno; d, 4,5-oxi-1-nitropireno; e, 9,10- oxi-1-nitropireno. Os oxi-nitropirenos são posteriormente convertidos em 4,5-hidroxi-1-nitropireno e 9,10-hidroxi-1-nitropireno, respectivamente.

oxidação do anel ou a combinação da oxidação e nitrorredução do anel, embora muitos desses metabólitos formem conjugados de glutathiona ou O-glicuronida (Heflich, 1990).

Os nitropirenos são os mais ativos mutagênicos de ação direta na linhagem de *Salmonella typhimurium* TA98, sugerindo que produzem mutações do tipo mudança na matriz de leitura (Heflich, 1990), ainda não especificadas (Watanabe *et al.*, 1997). Além disso, observou-se que em populações ocupacionalmente exposta existe um pequeno aumento no risco de desenvolvimento de câncer de bexiga, sendo biologicamente plausível que seja devido aos nitro-HAPs que quando biodisponíveis são facilmente metabolizados à aminas aromáticas, uma classe de químicos já conhecidos por induzirem cânceres de bexiga em humanos e roedores (Rosenkranz, 1996).

As aminas aromáticas ou arilaminas são produzidas como resultado da combustão de materiais orgânicos, tendo sido um dos primeiros compostos químicos reconhecidos como carcinogênicos. No início desse século, estudos epidemiológicos indicaram que a exposição à 2-naftilamina, benzidina e 4-aminobifenil eram a causa de certos cânceres de bexiga relacionados à exposição ocupacional. Além disso, muitos dos primeiros trabalhos envolvidos na ativação metabólica de procarcinogênicos e promutagênicos que produzem intermediários eletrofílicos reativos foram realizados com as arilaminas (aminas aromáticas) ou arilamidas, cujas estruturas estão representadas na Figura 6.

Segundo (Beland e Kadlubar 1990) as aminas aromáticas precisam sofrer reações metabólicas para produzirem compostos mutagênicos reativos (Figura 7). Assim, quando as reações de metabolização ocorrem no grupamento amino, geralmente tem-se a ativação do composto, entretanto quando a metabolização ocorre no anel tem-se usualmente o processo de destoxificação. De acordo com Heflich (1990), o processo de ativação envolve a N-oxidação que resulta na formação de N-hidroxi arilaminas. A arilamina e o seu metabólito N-oxidado podem ser substratos para a N-acetilação, resultando respectivamente em arilamidas e ácidos arilidroxâmico.



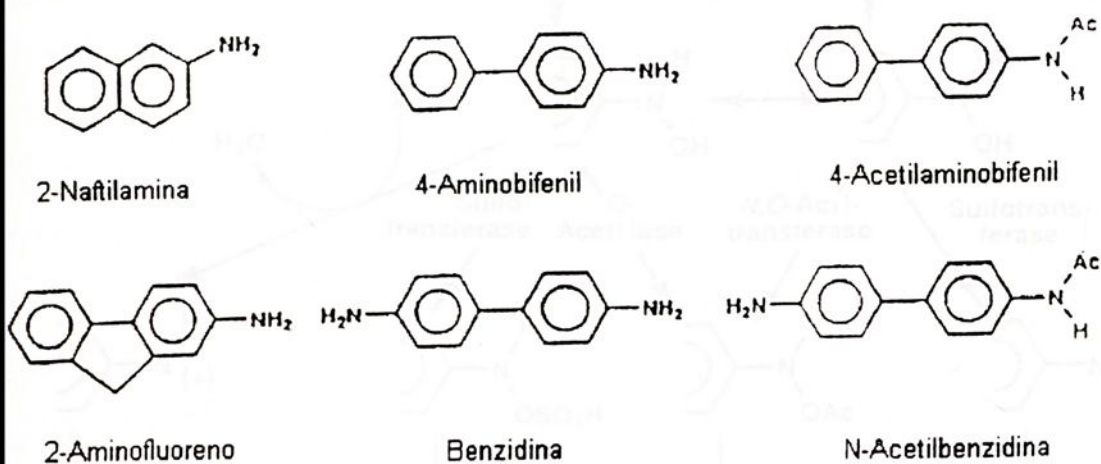


Figura 6 - Estrutura química de aminas aromáticas e arilamidas. Ac = $-\text{COCH}_3$

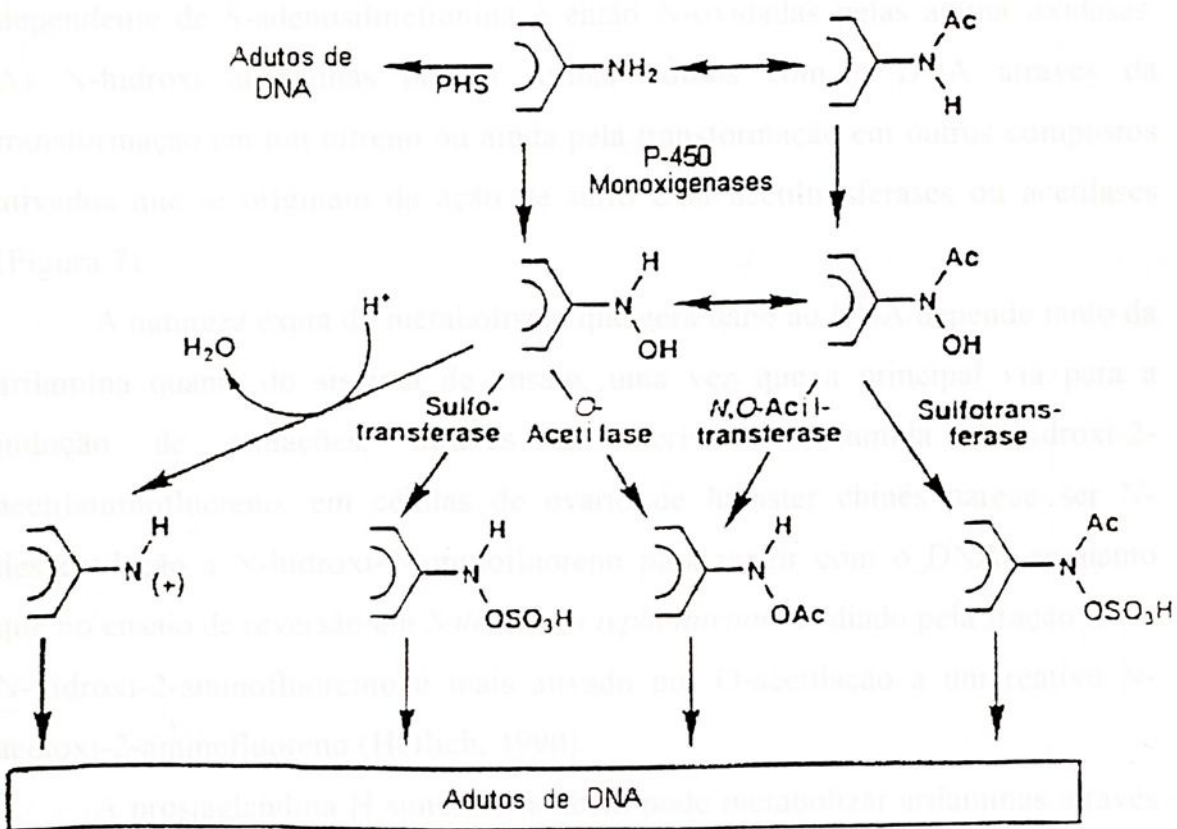


Figura 7 - Vias metabólicas das aminas aromáticas e arilamidas. PHS = prostaglandina H sintetase; Ac = $-\text{COCH}_3$.

As arilamidas podem também ser N-oxidadas e tanto arilamidas quanto os ácidos arilidroxâmicos podem ser enzimaticamente desacetilados formando arilaminas e N-hidroxi arilaminas. A N-oxidação das arilaminas e arilamidas é catalisada pelas citocromo P-450 monoxigenases, podendo algumas arilaminas serem N-oxidadas pelas amina oxidases. Um possível caminho alternativo da N-oxidação foi descrito por Ziegler *et al.* (1988) em que as aminas aromáticas, como a benzidina, são primeiramente N-metiladas por N-metiltransferase dependente de S-adenosilmetionina e então N-oxidadas pelas amina oxidases. As N-hidroxi arilaminas podem formar adutos com o DNA através da transformação em íon nitreno ou ainda pela transformação em outros compostos ativados que se originam da ação de sulfo e/ou acetiltransferases ou acetilases (Figura 7).

A natureza exata do metabolismo que gera dano ao DNA depende tanto da arilamina quanto do sistema de ensaio, uma vez que a principal via para a indução de mutações, através do derivado arilamida N-hidroxi-2-acetilaminofluoreno, em células de ovário de hamster chinês parece ser N-desacetilação à N-hidroxi-2-aminofluoreno para reagir com o DNA, enquanto que no ensaio de reversão em *Salmonella typhimurium* mediado pela fração S9, o N-hidroxi-2-aminofluoreno é mais ativado por O-acetilação a um reativo N-acetoxi-2-aminofluoreno (Heflich, 1990).

A prostaglandina H sintetase também pode metabolizar arilaminas através do mecanismo de um elétron não envolvendo a N-hidroxilação. A ativação por essa via pode ser de especial importância em certos tecidos extra hepáticos, incluindo a bexiga (Heflich, 1990).

O maior sítio de ligação no DNA pelas aminas aromáticas e arilamidas, que são ativadas através da N-oxidação, é a posição C8 da desoxiguanosina, com exceção da ligação no DNA da 1-naftilamina, que forma um aduto com a O⁶-desoxiguanosina e possivelmente a 4-acetilaminostilbeno, cujo aduto não foi completamente caracterizado. Entretanto, quando as N-hidroxi arilamidas são ativadas através da sulfotransferase, são formados adutos de DNA N-acetilados.



tanto na posição C8 quanto na N² da desoxiguanosina sendo produzido, desse modo, diferentes eventos mutacionais (Heflich, 1990).

Dessa maneira, parece clara a intensa ameaça que esses compostos representam, uma vez que a maior agravante da atividade mutagênica e, certamente da atividade carcinogênica, é a reação dos mesmos com o DNA.

1.2 - O Papel do Ambiente no Aparecimento de Neoplasias

Muitos mutagênicos e/ou carcinogênicos conhecidos são detectados na atmosfera assim como muitos compostos, cujos efeitos mutagênicos são desconhecidos também o são. Agente mutagênico é aquele capaz de causar, direta ou indiretamente, mutações, ou seja, alterações do material genético de uma célula que não resultam de segregação ou recombinação. A mutação pode ser espontânea ou induzida por agentes físicos, químicos ou biológicos. Incidindo sobre células somáticas, pode levar a um processo carcinogênico no próprio indivíduo, caso ocorra em células germinativas pode produzir doenças ou malformações nas gerações futuras.

Os compostos presentes no ambiente, que podem oferecer riscos adversos à saúde do homem, nem sempre possuem capacidade para exercer ação tóxica. Na maioria das vezes, tais agentes precisam sofrer reações metabólicas que se caracterizam principalmente pelas reações da fase I, quando ocorrem principalmente reações de oxidação que ativam os compostos e reações da fase II, representando a conjugação dos compostos químicos com enzimas capazes de inativá-los (Benet e Sheiner, 1987).

A grande maioria das reações da fase I é mediada por enzimas presentes principalmente na fração microsomal do fígado de mamíferos, denominadas monoxigenases de função mista. Essa fração consiste de três componentes essenciais, um citocromo microsomal especializado, que é o citocromo P-450, citocromo P-450-redutase dependente de NADPH e fosfolipídios. O citocromo P-450 é uma hemoproteína que tem papel fundamental na oxidação de certos



compostos químicos. É assim denominado por ser um pigmento (P) que tem pico de absorção no comprimento de onda de 450 nm (Arnott *et al.*, 1979). Através dessas reações de oxidação os compostos tornam-se altamente eletrofílicos e ligam-se facilmente aos centros nucleofílicos do DNA. Uma vez ocorrida a ligação composto-químico DNA, ocorre a desnaturação da molécula de DNA, pois a mesma é lesada com a perda de uma ou várias bases nitrogenadas, que causam o aparecimento de falhas ou quebras em uma de suas hélices ou em ambas.

As reações de conjugação geralmente levam à inativação dos compostos químicos. Essas reações são catalisadas pelas enzimas da classe das Glutatião-S-transferases (GSTs) e N-acetiltransferases (NATs), proporcionando mudanças nas propriedades físico-químicas dos substratos, que limitam as reações de biotransformação e levam a uma rápida excreção do composto estranho, via bile ou urina. Entretanto, às vezes, essas reações não resultam na inativação de um determinado composto já que são dependentes de determinadas condições, como fatores genéticos de cada indivíduo, hábito alimentar, tipo de exposição ocupacional dos mesmos, capacidade individual de efetuar o reparo do DNA e estrutura química do composto (Ames *et al.*, 1995).

A função biológica das fases I e II é proteger a célula contra efeitos citotóxicos, pela conversão de compostos químicos não polares potencialmente tóxicos em formas excretáveis, solúveis em água, tornando-os inócuos. Todavia, alguns tornam-se ativados (Friedberg *et al.*, 1995) e, portanto, com capacidade de se ligarem ao DNA podendo, assim, serem responsáveis pela necrose tecidual, pela carcinogenicidade e por outros efeitos tóxicos (Benet e Sheiner, 1987).

A carcinogênese é um processo anormal, não controlado, da diferenciação e proliferação celular. Esse processo pode ser identificado precocemente, quando alterações moleculares são encontradas no DNA, sendo sucedidas por alterações bioquímicas e fenotípicas das células, num contínuo em direção à malignidade (Rabello-Gay *et al.*, 1991). Inicialmente, esse processo é localizado, mas pode disseminar-se pelo organismo. A capacidade dessas células em crescer em locais



inapropriados ou se propagar indefinidamente pode ser letal para o organismo que as possuam (Lewin, 1993).

Consideram-se, pelo menos, três etapas desde o momento da agressão química até o aparecimento da neoplasia. A primeira etapa é a iniciação, que representa o passo em que a substância química é processada metabolicamente pelo hospedeiro, liga-se em macromoléculas como o DNA. Esse é seguido por um ciclo de duplicação, com divisão celular, onde a lesão bioquímica é fixada e transforma as células-alvo em células iniciadas. A característica dessa etapa é que esses passos bioquímicos podem ser reparados. A segunda etapa é designada promoção, na qual as células iniciadas têm condições de proliferar sob a forma tumoral. A progressão, terceira etapa da carcinogênese, é entendida como o passo em que algumas neoplasias sofrem alterações qualitativas em seu fenótipo, por exemplo, transformando-se de benignas em malignas, possivelmente por seleção clonal (Cohen, 1987; Camargo, 1991).

O tempo entre o efeito iniciador e o aparecimento de um tumor bem reconhecido é denominado período de latência e, no homem, parece variar de 10 a 20 anos. Enquanto o acúmulo de mudanças genéticas em células somáticas é considerado essencial para a gênese do câncer, tornou-se claro que nem todo carcinógeno é genotóxico, podendo participar de modo indireto, como promotores durante a carcinogênese (Lewin, 1993; Yamasaki *et al.*, 1996).

Dados epidemiológicos indicam que a maioria dos cânceres ocorre devido a fatores ambientais no sentido mais amplo da palavra e conseqüentemente, a identificação de carcinógenos no ambiente é de fundamental importância para sua prevenção, sendo os poluentes ambientais, pesticidas sintéticos e outros compostos químicos produzidos pelo homem, um risco extensivo de câncer para a população geral (Ramel, 1991).

Delclos *et al.* (1993) sugeriram haver forte correlação entre exposição à altas concentrações de HAPs e incidência de câncer de pulmão, estando também os HAPs relacionados com a etiologia do câncer faringeano, de cólon e bexiga (Kaderlik e Kadlubar, 1995). O uso do tabaco é um já bem conhecido fator de



risco para o desenvolvimento de vários tipos de cânceres, incluindo de cabeça e pescoço, de esôfago, de carcinoma de células orais escamosas, de pulmão e de bexiga (Davidson *et al.*, 1993; Scully, 1993; Ames, *et al.*, 1995).

No que se refere aos derivados dos HAPs, Rosenkranz e Mermelstein (1985) observaram evidência de transformação neoplásica em células cultivadas e indução de tumores em roedores causados pelos conjugados de nitro-HAPs.

Watanabe *et al.* (1997) testaram a mutagenicidade de 15 nitro-HAPs que foram detectados em partículas de ar e/ou fontes de emissões de combustão e observaram a indução de transversões C-G $\rightarrow$ A-T, em linhagens de *Salmonella typhimurium*, designadas como a mais freqüente mutação de substituição de base do gene supressor de tumor p53 em câncer de pulmão, uma vez que esse é o órgão que primeiro é atingido pelos nitro-HAPs presentes na atmosfera. Já as aminas aromáticas, usadas como produtos industriais, parecem induzir câncer de bexiga em trabalhadores expostos ocupacionalmente e em animais experimentais (Kuenemann-Migeot *et al.*, 1997).

Vários ensaios têm sido realizados para averiguar os efeitos dos poluentes e os riscos para a saúde. A avaliação de amostras de ar de São Paulo e Cubatão (Sato *et al.*, 1995) e de Porto Alegre (Vargas *et al.*, 1998) utilizando o teste com *Salmonella typhimurium* sugere a presença de nitro-HAPs (mono- e dinitro-HAPs), compostos sabidamente responsáveis por substancial atividade mutagênica. Uma significativa atividade mutagênica foi também demonstrada, utilizando o mesmo teste em concentrados de urina de indivíduos fumantes (Kuenemann-Migeot, *et al.*, 1996, Smith *et al.* 1996, Kuenemann-Migeot, *et al.*, 1997, Mure *et al.*, 1997). Outros ensaios, como o teste cometa, têm sido realizados em peixes que habitam rios altamente poluídos por HAPs, resultando na detecção de danos no DNA causados certamente por esses contaminantes ambientais (Pandurangi *et al.*, 1995).

Estudos citogenéticos também evidenciaram alterações na freqüência de trocas entre cromátides-irmãs (TCI), aberrações cromossômicas e micronúcleos

em células de indivíduos expostos aos HAPs (Motykiewicz *et al.*, 1992; Chorazy *et al.*, 1994; Hatjian *et al.*, 1995).

Dessa maneira, a população como um todo está constantemente exposta às complexas misturas de compostos químicos ambientais principalmente aquelas ricas em HAPs, que podem causar danos à saúde, expressos a curto ou longo prazo, acentuando-se ainda mais em populações ocupacionalmente expostas.

Os indivíduos que trabalham no corte da cana-de-açúcar estão constantemente expostos a uma ampla variedade de compostos químicos mutagênicos que são liberados com a queima das plantações da cana, realizada para facilitar o corte das mesmas. Fato esse confirmado por Zamperlini (1997) que estudou os constituintes da fuligem sedimentável da cana-de-açúcar com ênfase na presença de HAPs, utilizando-se técnicas cromatográficas e espectrofotométricas e revelou a presença de todos os HAPs considerados importantes pela EPA (com exceção do dibenzo(a,h)antraceno), além de vários alquil-HAPs. Os compostos mutagênicos liberados com a queima dos canaviais entram em contato com o organismo do indivíduo por inalação, absorção dérmica ou até mesmo por via oral durante as refeições que ocorrem no próprio canavial. Tais compostos são freqüentemente excretados na urina inalterados, como conjugados ou como metabólitos (Yamasaki e Ames, 1977). A maioria deles é metabolizada em sua forma mais ativa e só então é capaz de formar adutos com o DNA e induzir alterações cromossômicas. Assim sendo, um bom biomarcador é a mutagenicidade urinária já que o nível de compostos mutagênicos na urina reflete a dose de exposição e o estado metabólico dessas substâncias que estão sendo excretadas (Mure *et al.*, 1997). Embora a mutagenicidade urinária não seja específica, uma vez que não identifica os vários compostos mutagênicos na urina, apresenta a vantagem de integrar a mistura desses compostos e detectá-los na urina sem a necessidade de identificar cada um deles (DeMarini, *et al.*, 1997).

O teste de mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* (teste de Ames) é um ensaio utilizado por mais de 20 anos para avaliar, através da urina, tanto o estilo de vida quanto exposição ocupacional a mutagênicos e/ou



carcinogênicos potenciais (Ames *et al.*, 1975; Falck *et al.*, 1980), além das misturas complexas ambientais (Chrisp *et al.*, 1978, Chrisp e Fisher, 1980). Entretanto, a urina para ser testada deve passar por processos químicos que resultam em sua concentração, uma vez que a mesma não pode ser testada da maneira como é eliminada do organismo, por se encontrar muito diluída. Nessa condição, somente mutagênicos presentes em altas concentrações ou aqueles de potência excepcional poderiam ser detectados, já que apenas uma quantidade pequena de urina pode ser adicionada ao sistema teste por causa das limitações de volume. Por essa razão, têm-sido utilizadas técnicas de adsorção em resina para concentrar os mutagênicos presentes nessa amostra, bem como eliminar a possibilidade de resultados falso positivos pela presença de histidina (Yamasaki e Ames, 1977; Kuenemann-Migeot *et al.*, 1996; Mure *et al.*, 1997).

A atividade mutagênica na urina já foi demonstrada em indivíduos fumantes (Yamasaki e Ames, 1977; Einistö *et al.*, 1990), ou naqueles que estão em tratamento medicamentoso (Espinosa-Aguirre *et al.*, 1996) ou que freqüentemente comem carne frita (Sousa *et al.*, 1985). Esse parâmetro também foi usado como biomarcador de exposição em várias situações ocupacionais (Falck *et al.*, 1980; Sinues *et al.*, 1992; Choi *et al.*, 1995; Clonfero *et al.*, 1995; DeMarini *et al.*, 1997).

A sensibilidade do teste de mutagenicidade do extrato da urina dos cortadores de cana assim como do extrato da fuligem da cana foi aumentada através do ensaio de pré-incubação e das linhagens indicadoras YG, recentemente desenvolvidas, capazes de detectar metabólitos mutagênicos formados a partir de nitroarenos e aminas aromáticas. Essas linhagens foram obtidas da clonagem de genes correspondentes às enzimas nitrorredutases e O-acetiltransferase que ativam os compostos, a fim de que esses possam exercer sua atividade mutagênica (Watanabe *et al.*, 1989, 1990).



1.3- A Cana-de-Açúcar e a Região de Araraquara

Nos anos 70, a produção de cana-de-açúcar teve enorme expansão devido principalmente ao programa Pró-álcool. Hoje o Brasil tem 4.500.000 hectares de cana, 324 usinas e 1.100.000 trabalhadores, detendo $\frac{1}{4}$ dos canaviais do planeta, ocupando a posição de maior produtor mundial de cana-de-açúcar (Globo Repórter Especial, 1996).

Anualmente na época da colheita da cana, que se estende de maio a novembro, costuma-se queimar previamente a plantação para facilitar o corte manual das plantas, diminuindo dessa forma o tempo para finalização da colheita. Dessa operação de queima resulta uma fuligem que permanece algum tempo em suspensão no ar e tem sido apontada como responsável pelo aumento da incidência de casos de afecções respiratórias na população da região (Doença, 1992, Clima, 1994, Oliveira, 1996). Nessa época, o clima e a poluição aumentam em 80-124% os problemas respiratórios (Clima, 1994, Oliveira, 1996, Oliveira, 1997), pois a dispersão da fumaça e da fuligem é dificultada principalmente no final da tarde e início da noite.

A queima da cana-de-açúcar gera poluição e destrói as poucas matas que restam na região. Se as palhas fossem queimadas em caldeiras gerariam energia equivalente a $\frac{1}{2}$ Itaipú (Globo Repórter Especial, 1996). Certamente, a queima da cana contribui com a emissão de materiais particulados para a atmosfera, mas não se sabe em que extensão. Segundo informações do Sindicato dos Empregadores Rurais de Araraquara, existem na região cerca de 40.000 trabalhadores de cana potencialmente expostos, além de toda fauna e flora. Na verdade, não existe informação sobre a atividade biológica e o eventual prejuízo dessa fuligem à saúde e ao meio ambiente.

A poluição causada pelas queimadas é um assunto polêmico, debatido por diferentes segmentos envolvidos no processo, como a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), usineiros, universidades, Associação do



Meio Ambiente de Araraquara (ASSEMARA) (Clima, 1994, Corrêa, 1996, Oliveira, 1996, Oliveira, 1997).

Várias tentativas de acordo foram feitas para garantir o fim das queimadas. Na região de Araraquara, as queimadas foram restringidas entre 16 e 21 h (Acordo, 1994). Em setembro de 1995 chegaram a ser proibidas pelo não-cumprimento do Decreto Estadual 28093-88, segundo o qual as usinas devem observar a direção do vento para evitar que a fuligem atinja cidades vizinhas ao canavial, além de evitar a realização das queimadas em canaviais a menos de 1 Km de distância do perímetro urbano. Contudo, os usineiros ameaçaram não realizar a safra e recorreram à proibição das queimadas (Usinas, 1995). O tribunal da Justiça de SP cassou a liminar que proíbe a queima da cana em abril de 1996 (Corrêa, 1996).

A CETESB lançou um plano contra a queima da cana-de-açúcar visando eliminá-la dentro de um prazo de 5 anos, com diminuição gradativa até sua eliminação total e a ampliação do raio de proibição de 1 Km (Cetesb, 1996a).

Na região de Ribeirão Preto, a Câmara Municipal aprovou um projeto que prevê o fim das queimadas em 6 anos. Em junho de 1996, foi encaminhado à câmara outro projeto que prevê o fim desse processo em 2 anos (Cetesb, 1996b). Um grande reforço foi dado pelos resultados obtidos por Zamperlini (1997) que verificou substâncias mutagênicas e/ou cancerígenas, os HAPs na fuligem sedimentável proveniente da queima da cana-de-açúcar. Tal pesquisa foi usada pelo Ministério Público nas ações para o combate às queimadas. Contudo, a interpretação errônea da dissertação por "comentaristas", acrescida de afirmações falsas como "queimada da cana causa câncer", causaram muita polêmica (Padirra, 1997, Paiva, 1997, Fuligem, 1997), motivando os pesquisadores responsáveis a se manifestarem (Vilegas e Santiago, 1997).

Baseado na lei 6.938/81, da política nacional do meio ambiente, o Ministério Público entrou com cerca de 200 ações contra a queima da cana no estado de São Paulo (Oliveira, 1997). Rapidamente, o governo tomou providências criando o decreto de nº 42.056 de 06 de agosto de 1997, publicado



no Diário Oficial do Estado no dia 07 de agosto de 1997, regulamentando a queima da palha da cana. O decreto permitiu as queimadas por 15 anos para as áreas não mecanizáveis e oito anos para as mecanizáveis (Decreto, 1997) o que foi um golpe duro para os promotores de justiça (Paiva, 1997, Decreto, 1997, Goulart, 1997). A promotoria considerou o decreto ilegal e apoiou suas ações na lei Federal 5.938/81, cujo artigo terceiro considera crime "a degradação da qualidade ambiental resultante de atividade que direta ou indiretamente prejudiquem a saúde, a segurança e o bem estar da população" (Costa, 1997).

O decreto desencadeou a união dos promotores da justiça do Meio Ambiente do Estado de São Paulo com os promotores criminais e o rompimento das negociações com o setor sucroalcooleiro e governo do Estado de São Paulo (Promotores, 1997). O Ministério Público também se uniu a entidades ecológicas, médicas e outras instituições, com a participação do CRM (Conselho Regional de Medicina), OAB (Ordem dos Advogados do Brasil) e Associação dos Professores da USP para combater a prática em canaviais até o final da safra (Região, 1997). Entretanto, apoiadas no decreto do Governador Mário Covas, algumas usinas conseguiram permissão na Justiça para praticar a queimada (Costa, 1997).

No início de 98 foi emitida uma sentença que determina que as usinas cessem imediatamente as queimadas na região de Araraquara (Juiz, 1998), mas os usineiros novamente recorreram da sentença (Usineiros, 1998). No entanto, existe um anteprojeto do Governo, no qual as usinas teriam que mecanizar a colheita de $\frac{1}{4}$ dos canaviais a cada cinco anos, o que daria um prazo de vinte anos para o fim das queimadas (Governo, 1998).

Em 29 de março de 98 entrou em vigor a nova Lei de Crimes Ambientais que permite punir as queimadas, dentre as quais as queimadas nos canaviais (Documento, 1998). Mesmo com falha e omissões dessa lei ambiental que pode criar dificuldades em sua aplicação, os integrantes do Ministério Público discutirão um plano de ação nacional em relação às queimadas (Léo, 1998).



A queimada também se tornou um problema para os usineiros, pois os produtos procedentes de cana queimada não receberão o selo de qualidade do produto. Além disso, a empresa deverá colher 80% da cana crua para tal certificação. (Documento, 1998).

Desse modo, fica bastante claro que a queima da cana-de-açúcar constitui preocupação nacional, trazendo à tona não apenas um problema ambiental de significativa importância, como também a implicação de sérias conseqüências à saúde da população como um todo.

Com relação a esse último aspecto, não há dúvidas de que as maiores implicações incidem sobre a saúde dos trabalhadores envolvidos no corte da cana-de-açúcar.

Assim sendo, este estudo propõe o início de levantamentos de dados e resultados, na tentativa de contribuir para a tomada de decisões mais seguras.



2- OBJETIVOS

Devido ao fato da combustão incompleta de matéria orgânica, como a queima dos canaviais, liberar compostos já reconhecidos como mutagênicos e/ou carcinogênicos e de não existir informação nem comprovação sobre a atividade biológica da fuligem da cana, o presente trabalho teve por objetivos:

1- Avaliar a possível atividade mutagênica dos compostos eliminados na urina dos cortadores de cana (grupo exposto), bem como do material particulado sedimentável (fuligem) liberado na queima das plantações de cana-de-açúcar, ambos da safra de 1998, através de ensaios com mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) empregando as linhagens TA98, YG1021 e YG1024.

2- Comparar a possível atividade mutagênica dos compostos eliminados na urina do grupo exposto com o resultado obtido para o grupo não exposto, tanto na presença quanto ausência de ativação metabólica.



3 - MATERIAL E MÉTODOS

A parte experimental do presente estudo foi realizada em colaboração com os Departamentos de Química Analítica do Instituto de Química e de Ciências Biológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, ambos da UNESP - Câmpus de Araraquara.

3.1 - Fuligem

3.1.1 - Caracterização da Amostra

A fuligem sedimentável foi coletada no solo dos canaviais, logo após as queimadas, em áreas rurais da região de Araraquara. O material foi recolhido manualmente e armazenado em saco de polietileno.

A fuligem foi peneirada até atingir a granulometria de $0,149\ \mu\text{m}$, a fim de separar as impurezas tais como gravetos, folhas e terra. A amostra foi colocada em vidro âmbar, vedado com teflon e armazenada no congelador até a realização da extração.

Os compostos orgânicos adsorvidos ao material particulado da fuligem sedimentável foram extraídos através de dois procedimentos, que incluíram ultrassom ou soxhlet, usando-se uma mistura de 4:1 (v/v) de diclorometano/metanol (DCM:MeOH) ou tolueno (todos Merck), respectivamente, como agentes extratores. Os ensaios de mutagenicidade do material extraído da fuligem pelos métodos descritos a seguir foram realizados em triplicata, utilizando-se o teste de Ames (item 3.3).

3.1.2 - Metodologia de Extração

A) Extração por Ultrassonicação

Uma amostra contendo 40g de fuligem foi colocada em um erlenmeyer, juntamente com 400 mL da mistura DCM:MeOH (4:1). Em seguida o



erlenmeyer foi colocado no banho ultrassônico por 30 minutos, à temperatura de 20°C. Posteriormente, realizou-se a filtração em papel de filtro Whatman nº 41. Seguiu-se à concentração no rotaevaporador a vácuo à temperatura de 40°C até o volume de 10 mL. O extrato concentrado foi armazenado em geladeira e, no momento dos ensaios de mutagenicidade, volumes apropriados do mesmo foram evaporados sob fluxo leve de nitrogênio gasoso e ressuspensos em 1.5 mL DMSO. Foram usados diferentes volumes do material dissolvido em DMSO, correspondentes a 27,16, 54,32, 108,82, 217,63 e 435,27 µg de MOE/placa.

A quantidade de material orgânico extraído (MOE) em µg/mL na extração por ultrassom ou soxhlet foi determinada em balança eletrônica (Mettler). Volumes de 1 mL do extrato obtido em DCM:MeOH (4:1) ou tolueno foram pipetados em duplicata em cadinhos de alumínio previamente secos (104°C) e de pesos determinados. Após a completa evaporação do solvente em placa aquecedora à temperatura de 35°C, os cadinhos foram para o dessecador por 16 h. Subseqüentemente, foram novamente pesados e calculou-se a concentração de MOE pela média das diferenças dos pesos iniciais e finais para cada amostra.

B) Extração por Soxhlet

Uma amostra de fuligem pesando 40g foi envolvida em papel de filtro Whatman nº 41 e colocada no tubo para amostra, de modo a encaixar sua parte superior no condensador de refluxo e a parte inferior em um balão contendo 500 mL de tolueno. A extração do material orgânico foi feita em manta aquecedora por 8 horas, à uma temperatura de 50°C. Seguiu-se à concentração no rotaevaporador a vácuo à temperatura de 40°C, até o volume de 10 mL. O extrato concentrado foi armazenado em geladeira e, no momento dos ensaios de mutagenicidade, volumes apropriados desse extrato foram evaporados sob fluxo leve de nitrogênio gasoso e ressuspensos em 1.5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma). Nos ensaios de mutagenicidade foram usados diferentes volumes do material dissolvido em DMSO, que correspondem a 8,84; 17,68; 35,36; 70,72 e 141,66 µg de MOE/placa.



3.2 - Urina

3.2.1 - Caracterização dos Indivíduos Amostrados

A avaliação da atividade mutagênica na urina foi realizada em vinte e quatro indivíduos saudáveis, não fumantes, sendo a população exposta representada por doze cortadores de cana-de-açúcar da região de Araraquara, há pelo menos quatro anos. O grupo controle foi composto por doze indivíduos da população geral. Os grupos foram pareados por sexo e idade, sendo a idade média dos indivíduos expostos de 35,08 anos e do grupo controle de 36 anos. A avaliação da atividade mutagênica na urina foi realizada utilizando-se o teste de mutação gênica reversa em *Salmonella thyphimurium*, com ou sem ativação metabólica como será descrito posteriormente.

Foi considerada, para ambas as amostras, a exposição desses indivíduos a agentes físicos e químicos, ao consumo de álcool, ao aparecimento de doenças viróticas ou bacterianas e outros fatores ocorridos até seis meses antes da coleta da urina. Essas informações foram obtidas e registradas, por meio de um amplo questionário (anexo 1), aplicado durante entrevista antes da coleta da urina. Os dados referentes à caracterização da amostra estão apresentados na Tabela 1.

C04	29	M	Estudante
C05	34	M	Eng. Civil
C06	31	M	Estudante
C07	37	F	Escritor
C08	37	F	Escritora
C09	41	F	Farmacêutica
C10	33	F	Estudante
C11	30	F	Paralela
C12	41	F	Escritora

Tabela 1- Descrição das amostras de indivíduos expostos à queima da cana (E) e controles (C), quanto à idade, sexo, tempo de exposição e atividade profissional.

Indivíduos	Idade (anos)	Sexo	Tempo de Exposição (anos)	Atividade Profissional
E01	40	F	6	Cortador(a) cana
E02	30	F	12	Cortador(a) cana
E03	33	F	19	Cortador(a) cana
E04	31	F	20	Cortador(a) cana
E05	37	F	20	Cortador(a) cana
E06	37	F	21	Cortador(a) cana
E07	25	M	4	Cortador(a) cana
E08	48	M	4	Cortador(a) cana
E09	22	M	7	Cortador(a) cana
E10	22	M	9	Cortador(a) cana
E11	56	M	21	Cortador(a) cana
E12	40	M	22	Cortador(a) cana
C01	39	M	—	Auxiliar compras
C02	50	M	—	Prof. Univers.
C03	34	M	—	Escriturário
C04	20	M	—	Estudante
C05	34	M	—	Eng. Civil
C06	21	M	—	Estudante
C07	37	F	—	Escriturária
C08	37	F	—	Escriturária
C09	41	F	—	Escriturária
C10	38	F	—	Escriturária
C11	40	F	—	Escriturária
C12	41	F	—	Escriturária

3.2.2 - Metodologia de Extração e Concentração dos Compostos da Urina

A concentração e extração dos compostos presentes na urina dos indivíduos amostrados seguiu a metodologia descrita por Yamasaki e Ames (1977), com algumas modificações.

A urina foi coletada consecutivamente durante 3 dias logo após o término do trabalho, no período da safra de 1998, usando-se frasco de polietileno. Em seguida, esse material foi congelado a uma temperatura de -20°C , até o momento de ser processada.

A adsorção dos compostos orgânicos presentes na urina foi realizada através da resina não polar XAD-2 (Aldrich), constituída por polímeros de estireno-divinilbenzeno, que adsorve seletivamente compostos policíclicos com dois ou mais anéis fusionados (Mure *et al.*, 1997). A resina foi lavada por arrastamento e decantação várias vezes com acetona e metanol (ambos Merck), e armazenada em água milli-Q na geladeira.

Para cada indivíduo foram processados 500 mL de urina em duas colunas de 20 e 30 cm, ambas com diâmetro interno de 0,9 cm, passando respectivamente 200 e 300 mL de urina em cada uma delas. Em cada processo de extração, a resina devidamente preparada foi empacotada na coluna, de modo a se obter camadas com altura de 4,7 e 7,0 cm (3 e $4,5\text{ cm}^3/\text{volume de camada}$), respectivamente.

As amostras de urina foram previamente filtradas em papel de filtro Whatman nº 42 e os valores do pH corrigidos para aproximadamente 7,0, com NaOH 0,5 M. A urina foi percolada pela coluna a uma velocidade de 2-3 mL/minuto, regulada por uma torneira de teflon. Na sequência passou-se água destilada para eliminar a histidina, que poderia ter ficado adsorvida na resina, em seguida a acetona (10 mL de acetona para cada 100 mL de urina), solvente utilizado para eluir os compostos que foram adsorvidos na resina, uma vez que essa apresenta baixa toxicidade e alta volatilidade. O eluato (solvente mais composto) foi secado sob fluxo leve de nitrogênio gasoso até a eliminação de todo o solvente. O extrato foi congelado para posterior realização do teste. Ao



extrato, proporcional à 100 mL de urina, adicionou-se 400 μ L do solvente DMSO para a realização do ensaio. Foram usados diferentes volumes desse extrato dissolvido em DMSO (6,25; 12,5; 25; 50 μ L) que equivale a 1,56; 3,12; 6,25; 12,5 mL de urina/placa.

3.3 - Ensaio de Mutação Gênica Reversa

O ensaio de mutação gênica reversa avaliado nesse trabalho foi o Teste de Ames que baseia-se na utilização de linhagens de *Salmonella typhimurium* auxotróficas para o aminoácido histidina, as quais reverterem à prototrofia pelo tratamento com agentes mutagênicos (Maron e Ames, 1983).

3.3.1 - Linhagens de *Salmonella typhimurium*

Foram utilizadas as linhagens de *S. typhimurium* TA 98, gentilmente fornecida pelo Prof. Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley, California, EUA e as YG1024 e YG1021, gentilmente cedidas pelos Drs. Takehiko Nohmi e Watanabe MasahiKo do Instituto Nacional de Ciências Higiênicas, Tokio, Japão. Essas linhagens apresentam diferentes mutações no operon da histidina e outras características genéticas que lhes conferem maior sensibilidade na detecção de diversos compostos mutagênicos, como a mutação *rfa* que causa perda parcial da barreira lipopolissacarídica da parede bacteriana, facilitando a difusão de moléculas grandes para o interior da célula, a deleção de gene *uvrB* que causa deficiência do sistema de reparo por excisão e fator R plasmidial (plasmídio pKM101) que confere resistência à ampicilina e contém os genes *muc AB*, cuja expressão causa estímulo no sistema de reparo suscetível ao erro ("error prone"). A linhagem TA98 apresenta mutação no gene *hisD* (*hisD3052*) que codifica para a histidinol desidrogenase, apresentando como ponto preferencial para reversão oito resíduos repetitivos de GC (Maron e Ames, 1983) e detecta compostos mutagênicos que causam deslocamento do quadro de leitura do DNA.

As linhagens YG1024 e YG1021 apresentam as mesmas características genéticas que a TA98 diferindo por superproduzirem respectivamente O-



acetiltransferase e nitrorredutase (Tabela 2). Essas linhagens são altamente sensíveis em detectar classes específicas de compostos mutagênicos, uma vez que a YG1024 detecta mais eficientemente compostos hidroxilaminos, nitro aromáticos e aminas aromáticas (Watanabe *et al.*, 1990) e a YG1021 demonstra alta sensibilidade apenas para alguns nitroarenos mutagênicos (Watanabe *et al.*, 1989).

Tabela 2- Descrição comparada das linhagens bacterianas

Linhagem Bacteriana	Descrição
TA98 - <i>rfa</i> , Δ <i>uvrB</i> , <i>hisD3052</i> , <i>bio</i> ⁻ , pKM101	Linhagem do Ames sensíveis às mutações de mudança de matriz de leitura
YG1021 - TA98 com pYG216	Linhagem derivada da TA98 com plasmídio que aumenta a atividade da nitrorredutase
YG1024 - TA98 com pYG219	Linhagem derivada da TA98 com plasmídio que aumenta a atividade da O- acetiltransferase

3.3.2 - Verificação das Características Genéticas das Linhagens de *Salmonella typhimurium*

a) Verificação da Auxotrofia à Histidina

As culturas bacterianas foram estriadas com alça de platina em placas controles de ágar mínimo acrescidas de histidina e biotina e placas testes contendo apenas biotina. A biotina é requerida uma vez que a deleção do gene *uvrB* se estende até o gene responsável por sua síntese. Após incubação por 24 h a 37°C, as placas testes contendo apenas biotina não devem apresentar crescimento, enquanto o contrário deve ocorrer com as placas suplementadas com histidina e biotina.

b) Verificação da Presença de Mutação *rfa*

Esse caráter foi confirmado através da sensibilidade ao cristal violeta. Foi semeado 0,1 mL da cultura “pernoite” das três linhagens, em placas de ágar nutriente, sendo introduzido no centro da placa um disco de papel de filtro esterilizado de 5 mm de diâmetro e pipetado no centro desse disco 10 µL de solução violeta 1%. As cepas devem apresentar um halo de inibição de, no mínimo, 14 mm de diâmetro após incubação a 37°C por 24 h, indicando que contêm a mutação *rfa*, sendo assim sensível ao cristal violeta.

c) Verificação da Presença da Deleção *uvrB*

Essa mutação foi confirmada verificando-se a sensibilidade à radiação ultravioleta (UV germicida), devido à deficiência no mecanismo de reparo por excisão. Foram semeadas estrias grossas paralelas da cultura “pernoite”, na superfície de uma placa de ágar nutriente. A seguir, metade da placa foi coberta com cartolina e irradiada com lâmpada (UV) de 15 watts a uma distância de 33 cm por 8 segundos e após, foi incubada a 37°C por 24h. As linhagens portadoras da deleção devem crescer somente na metade da placa não irradiada, indicando que contêm a deficiência *uvrB*, sendo assim sensível a luz UV.



d) Verificação da Presença do Plasmídeo de Resistência pKM101 (fator R) que confere resistência a ampicilina

Foram feitas estrias com solução de ampicilina 8 mg/mL em placas de ágar nutriente, com posterior secagem. A placa foi dividida em três partes e em cada uma delas semeou-se a cultura do caldo nutriente “pernoite”, perpendicularmente à estria do antibiótico. As placas foram incubadas invertidas a 37°C por 24h. As linhagens resistentes a ampicilina não foram inibidas pelo antibiótico e cresceram continuamente através das estrias.

Esses testes devem ser sempre realizados para a confirmação das características genéticas das linhagens.

Para a estocagem das linhagens, foi preparado o caldo nutriente com antibiótico (ampicilina 8 mg/mL), mais a linhagem com incubação a 37°C sob agitação por no máximo 16h. Após esse período, foram pipetados 0,9 mL dessa cultura juntamente com 0,1 mL de DMSO, com posterior congelamento a -20°C por 24 h e estocagem a -70°C.

3.3.3 - Sistema de Ativação Metabólica

Os ensaios de mutagenicidade foram realizados tanto na presença quanto ausência de ativação metabólica. Para os testes com ativação metabólica, utilizou-se a fração microsomal S9 preparada a partir de homogeneizados de fígado de rato Sprague Dawley, previamente tratados com Aroclor 1254, adquiridos sob a forma liofilizada da MolTox Molecular Toxicology Inc., Annapolis, USA.

Volumes adequados da mistura de ativação S9 foram preparados no momento do ensaio e mantidos em gelo durante sua execução. Utilizou-se a mistura padrão recomendada por Maron e Ames (1983), constituída de 4% de fração S9; 1% de cloreto de potássio 0,4 M; 1% de cloreto de magnésio 1,65 M; 0,5% de D-glicose-6-fosfato 1M (G6P, Sigma); 4% de β -nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato 0,1 M (NADP, Sigma); 50% de tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 7,4 (81% de fosfato de sódio dibásico 0,2 M e 19% de fosfato de sódio



monobásico 0,2 M) e 39,5% de água destilada estéril. Os reagentes usados no preparo da mistura S9, quando não especificados, foram procedentes da Merck e Sigma.

3.3.4 - Procedimento do ensaio (*Salmonella*/microsoma)

Para a realização experimental do teste de mutagenicidade foi utilizado o método de pré-incubação (Maron e Ames, 1983), empregando as linhagens TA98, YG1024 e YG1021. O método de pré-incubação é uma modificação do ensaio padrão de incorporação em placa, primeiro introduzido por Yahagi *et al.* (1975) a fim de detectar a atividade mutagênica de tinturas carcinogênicas. Nessa técnica, a bactéria, a substância teste e a mistura S9 quando usada, são incubadas antes de serem transferidas para a placa com ágar.

Para a realização do ensaio foi preparado o ágar mínimo glicosado (7,5 g Bacto ágar (Difco) e 465 mL/frasco água destilada), glicose 40% (Merck) e Meio Vogel Bonner 'E' 50x concentrado (sulfato de magnésio heptaidratado, ácido cítrico monoidratado, fosfato de sódio e amônio pentaidratado, fosfato de potássio dibásico (todos Merck) e água destilada, sendo misturados na proporção de 500, 25 e 10 mL/frasco respectivamente e distribuídos cerca de 25 mL/placas de petri e colocados para secagem na estufa a 37°C por um período de 48h. Nesse intervalo, preparou-se o ágar de superfície (Top ágar) composto por cloreto de sódio, Bacto ágar e água destilada, a solução de histidina/biotina 0,5 mM (Sigma) (10 mL / 100 mL de Top ágar) e o caldo nutriente/Oxóide N°2 (Difco) na proporção 30 mL de água destilada e 0,75g de meio Oxóide. A solução de histidina/biotina foi adicionada ao Top ágar que foi mantido em banho-maria a 45°C. As bactérias, provenientes de um estoque mantido a -80°C, foram inoculadas com alça de platina em 30 mL de caldo nutriente e mantidas a 37°C, sob constante agitação (160 rpm) durante 14h, de modo a se obter uma densidade de 1 a 2 x 10⁹ bactérias/mL.

Em tubos de ensaio foram colocados 100 µL da cultura pernoite de *Salmonella typhimurium*, a substância teste (extrato orgânico da urina ou



fuligem) nas devidas concentrações e 500 μL da mistura S9 ou 500 μL de tampão fosfato (pH 7,4) para os ensaios sem ativação metabólica. Após homogeneização, os tubos assim compostos foram incubados a 37°C por 20 a 30 minutos. Subseqüentemente, a esses tubos foram adicionadas alíquotas de 2 mL de Top ágar suplementados com histidina/biotina, os tubos foram agitados e vertidos sobre a superfície das placas contendo ágar mínimo glicosado (meio seletivo) e essas foram incubadas a 37°C por 48h. Todos os procedimentos foram realizados evitando-se acender as lâmpadas para minimizar o potencial de fotoxidação. Após esse período, procedeu-se à contagem do número de colônias revertentes. Os ensaios foram realizados em duplicata ou em triplicata. Os testes com as três linhagens foram realizados como experimentos independentes e a ausência de toxicidade foi visualmente verificada em cada placa. Para cada amostra de fuligem foram testadas 5 doses diferentes de extrato orgânico, previamente determinadas, sendo que a dose máxima de exposição foi de 435,3 μg de MOE/placa. Para cada amostra de urina foram testadas 4 doses diferentes de extrato orgânico diluído, previamente determinadas, sendo que a dose máxima de exposição foi de 50 μL de extrato diluído/placa. Os meios de cultura foram preparados com água destilada e esterilizados em autoclave a 121°C por quinze minutos.

3.4 - Controles

Em cada ensaio foram realizados controles positivo, negativo e branco.

Os controles positivos incluíram compostos mutagênicos específicos para as linhagens e condição do ensaio. Utilizou-se 10 μg de 4-nitro-o-fenilenediamina (NPD)/placa e 3 μg de 2-antramina/placa para os experimentos sem S9 e com S9 respectivamente. Esses controles foram incluídos para se confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada linhagem aos mutagênicos e a eficácia do sistema de ativação metabólica, quando esse procedimento foi realizado.



Como controle negativo foi utilizado o solvente DMSO, no volume máximo de 75 μ L.

Como "branco" foram preparados extratos seguindo-se a metodologia ultrassônica e soxhlet sem a fuligem e usando-se apenas os solventes. Foi também preparado "branco" para a metodologia de extração dos compostos da urina, usando-se água no lugar da urina.

3.5 - Avaliação e Interpretação dos Resultados

Foram feitos cálculos de estatísticas descritivas e gráficos para a representação da curva dose-resposta, tanto para os extratos orgânicos da fuligem quanto para os da urina.

Os dados foram analisados utilizando o programa estatístico "Statistica 5.0", que permitiu avaliar o efeito dose resposta do número médio de revertentes e da razão de mutagenicidade (RM) obtidos para o grupo exposto e controle, através do cálculo da análise de variância (ANOVA – teste F) (Zar, 1984).

A inclinação da reta ajustada à curva dose-resposta também foi fornecida por esse programa e corresponde ao número de revertentes induzidos por μ g de extrato orgânico da fuligem e μ L do extrato diluído da urina.

A partir dos resultados, calculou-se ainda a razão de mutagenicidade (RM) associada a cada linhagem dentro de cada grupo (exposto e controle) para cada dose analisada, como sendo a média do número de revertentes na placa teste (espontâneos mais induzidos) dividida pela média do número de revertentes por placa do controle negativo (espontâneos).

Considerou-se uma amostra positiva quando a RM foi maior ou igual a 2 em pelo menos uma das doses testadas e houve efeito dose-resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos. Quando somente um dos critérios foi atingido, considerou-se que a amostra apresentou indício de mutagenicidade (Vargas *et al.*, 1993).

Os resultados foram expressos em revertentes/ μ g de MOE da fuligem e revertentes/ μ L do extrato orgânico diluído da urina.



4 - RESULTADOS

4.1 - Atividade Mutagênica dos Extratos Orgânicos da Urina

A atividade mutagênica dos extratos orgânicos da urina do grupo controle (C) e grupo exposto à queima da cana-de-açúcar (E), adsorvidos pela resina XAD-2, foi avaliada através de ensaios com mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* usando-se as linhagens TA98, YG1024 e YG1021 tanto na presença quanto ausência de ativação metabólica.

4.1.1 - Atividade Mutagênica na Presença de Ativação Metabólica

Na Tabela 3 tem-se os dados da estatística descritiva indicando tamanho da amostra (N), média ($\bar{X}$) e desvio padrão (DP) do número de revertentes his+/placa para o grupo controle (C) e grupo exposto à queimada (E) nas diferentes doses testadas, com as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, YG1024 e YG1021 na presença de ativação metabólica. O valor médio mais alto de revertentes his+/placa foi de $114,5 \pm 35,5$, observado na amostra do grupo exposto com a linhagem YG1024 na dose de 50 μ L, mostrando ser praticamente o dobro quando se observa o valor médio do grupo controle obtido quando testado com a mesma linhagem e dose. Já a média mais baixa de revertentes his+/placa foi de $27,1 \pm 7,5$ no grupo controle na linhagem YG1021, na dose de 6,25 μ L. O DP no grupo exposto variou de 3,5 a 21,7 na TA98, de 15,9 a 35,9 na YG1024 e de 4,9 a 11,7 na YG1021 entre as doses analisadas, indicando que o número de revertentes mostra-se mais homogêneo quanto a YG1021 nas cinco doses. Já no grupo controle, a variação foi de 5,8 a 11,8, de 13,0 a 26,2 e de 6,1 a 10,1, respectivamente. Os valores médios de revertentes his+/placa no controle negativo (DMSO), respectivamente, na amostra exposta e controle foram de $30,8 \pm 3,5$ e $37,1 \pm 7,8$ na TA98, $67,2 \pm 15,9$ e $55,6 \pm 13,4$ na YG1024 e $34,2 \pm 4,9$ e $28,3 \pm 6,1$ na YG1021 para a amostra do grupo exposto (Tabela 3) enquanto que a média de revertentes his+/placa no controle positivo (2-antramina 3 μ g/placa)



Tabela 3 - Estatística descritiva do número de revertentes his+/placa, indicando tamanho da amostra (N), média ($\bar{X}$) e desvio padrão (DP), calculados para o grupo controle (C) e grupo exposto à queima da cana-de-açúcar (E) em diferentes doses utilizando-se as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, YG1024 e YG1021 na presença de ativação metabólica. Entre parênteses após o tamanho da amostra, está indicado o número de placas analisadas para cada dose testada.

Cepas	Dose (μ L/placa)	C			E		
		N	$\bar{X}$	DP	N	$\bar{X}$	DP
TA98	0	12 (36)	37,1	7,8	12 (34)	30,8	3,5
	6,25	12 (35)	32,3	5,8	12 (36)	43,8	19,6
	12,5	12 (36)	33,5	9,1	12 (35)	44,0	21,7
	25	12 (35)	33,6	8,9	12 (36)	45,4	19,2
	50	12 (35)	34,9	11,8	12 (36)	49,2	17,1
YG1024	0	12 (36)	55,6	13,4	12 (30)	67,2	15,9
	6,25	12 (35)	52,5	13,3	12 (36)	72,2	26,7
	12,5	12 (35)	55,6	13,0	12 (34)	85,3	28,6
	25	12 (36)	59,6	19,4	12 (36)	104,4	35,9
	50	12 (34)	58,1	26,2	12 (35)	114,5	35,7
YG1021	0	12 (34)	28,3	6,1	12 (36)	34,2	4,9
	6,25	12 (36)	27,1	7,5	12 (35)	33,7	9,8
	12,5	12 (35)	28,7	7,0	12 (36)	33,3	8,5
	25	12 (35)	28,5	9,9	12 (36)	38,6	8,9
	50	12 (33)	28,4	10,1	12 (35)	44,3	11,7

foi de $2913,0 \pm 43,5$ na TA98, $3405,7 \pm 94,7$ na YG1024 e $3374,0 \pm 27,5$ na YG1021. No ensaio realizado com o branco os valores médios de revertentes his+/placa foram de $34,0 \pm 5,2$ na TA98, $52,7 \pm 1,5$ na YG1024 e $33,0 \pm 0,0$ na YG1021.

Os números de revertentes his+/μL do extrato diluído da urina, para o grupo exposto e controle foram respectivamente $37,5 \pm 17,7$ e $34,3 \pm 8,9$ para a TA98, $70,9 \pm 30,1$ e $54,4 \pm 17,7$ para a YG1024 e $32,9 \pm 8,6$ e $28,0 \pm 8,6$ para a YG1021, indicando que o índice mais elevado foi obtido na linhagem YG1024.

Na Figura 8 (A, B e C) tem-se as curvas dose-resposta dos extratos urinários, tanto do grupo exposto quanto do controle com as três linhagens analisadas, TA98, YG1024 e YG1021 na presença de ativação metabólica. Essa Figura ilustra efeito significativo de dose (valor $p < 0,001$) linhagem (valor $p < 0,001$) e grupo (valor $p < 0,001$) e sugere que tais efeitos seja decorrente da diferença que existe no comportamento da amostra quando se compara os grupos exposto e controle e também pelo aumento do número de revertentes com o aumento da dose, principalmente quando as amostras foram testadas com a linhagem YG1024.

As curvas dose-resposta observadas na Figura 8A e a Tabela 4 mostram que o extrato orgânico da urina nos dois grupos não induziu atividade mutagênica na linhagem TA98, uma vez que não ocorreu o efeito dose-resposta entre as doses testadas e o número de revertentes e a razão de mutagenicidade (RM) mostrou uma resposta negativa, já que o índice dois não foi atingido em, pelo menos, uma das doses testadas para ambos os grupos. Entretanto, apesar dessa resposta negativa, o grupo exposto apresentou um número maior de revertentes quando comparado com o controle.

A Figura 8B e a Tabela 4 mostram que o extrato orgânico da urina do grupo exposto apresentou indícios de atividade mutagênica quando testado com a linhagem YG1024. O número de revertentes induzidos apresentou uma forte correlação positiva com o aumento da dose comparado ao grupo controle, (Figura 8B), embora a RM tenha sido negativa, dado que o índice atingido não foi maior



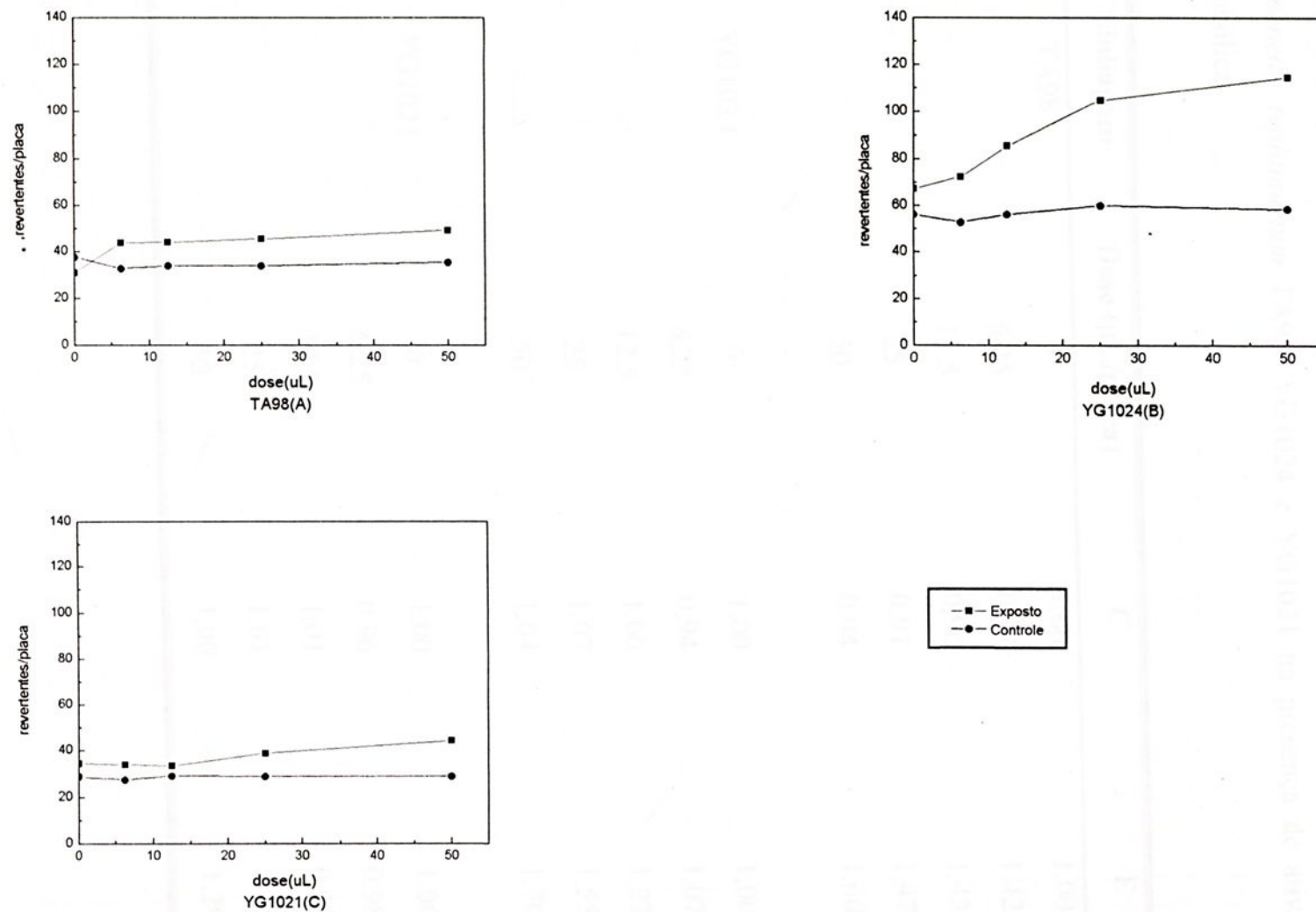


Figura 8- Curvas dose-resposta dos extratos orgânicos da urina, adsorvidos pela resina XAD-2, do grupo exposto à queima da cana-de-açúcar (E) e grupo controle (C) nas diferentes doses testadas, nas linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, YG1024 e YG1021 na presença de ativação metabólica.

Tabela 4 - Resposta mutagênica dos extratos orgânicos da urina expressa em razão de mutagenicidade (RM) do grupo controle (C) e grupo exposto à queima da cana-de-açúcar (E) nas diferentes doses testadas, frente às linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, YG1024 e YG1021 na presença de ativação metabólica.

Linhagem	Dose (μ L/placa)	C	E
TA98	0	1,00	1,00
	6,25	0,87	1,42
	12,5	0,90	1,43
	25	0,91	1,47
	50	0,94	1,60
YG1024	0	1,00	1,00
	6,25	0,94	1,07
	12,5	1,00	1,27
	25	1,07	1,55
	50	1,04	1,70
YG1021	0	1,00	1,00
	6,25	0,96	0,98
	12,5	1,01	0,98
	25	1,01	1,13
	50	1,00	1,29

ou igual a dois em pelo menos uma das doses (Tabela 4). Ressalta-se entretanto que na dose de 50 μL a RM do grupo exposto está bem próxima do valor dois.

A Figura 8C indica que o extrato orgânico da urina tanto no grupo exposto quanto no controle não induziu atividade mutagênica na linhagem YG1021, uma vez que não ocorreu o efeito dose-resposta entre as doses testadas e o número de revertentes induzidos, mostrando apenas um pequeno aumento no número de revertentes em 25 e 50 μL no grupo exposto. No que se refere a RM, essa amostra também foi negativa (Tabela 4), embora exista uma pequena diferença com relação as doses de 25 e 50 μL no grupo exposto, comparada ao controle.

Comparando-se as curvas dose-resposta das três linhagens avaliadas podemos observar uma diferença de comportamento da linhagem YG1024 com relação às demais. As médias de revertentes his+/placa dessa linhagem foram significativamente maiores do que as obtidas com as linhagens TA98 e YG1021, no grupo exposto.

Os resultados individuais dos extratos orgânicos da urina dos indivíduos expostos à queima da cana-de-açúcar e dos controles na presença de ativação metabólica, nas diferentes doses e linhagens analisadas constam do apêndice. Com relação às amostras de cada indivíduo exposto, avaliadas com a linhagem TA98, observou-se mutagenicidade nas amostras de três deles, ausência de mutagenicidade nas amostras de seis indivíduos e indício de mutagenicidade nas amostras dos outros três. Na linhagem YG1024, obteve-se resposta positiva para os extratos urinários de cinco indivíduos, ausência de mutagenicidade para dois deles e indício de mutagenicidade para os outros cinco indivíduos. Já com relação à linhagem YG1021 obteve-se ausência de mutagenicidade nas amostras de oito indivíduos e indício de mutagenicidade para as dos outros quatro. No que diz respeito aos extratos urinários dos indivíduos controles, avaliados com a linhagem TA98, obteve-se ausência de mutagenicidade nas amostras de onze indivíduos e indício de mutagenicidade para um deles. A linhagem YG1024 mostrou resposta negativa para nove indivíduos e indício de mutagenicidade para

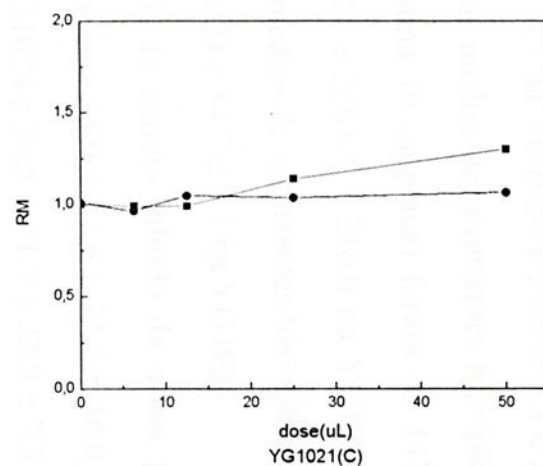
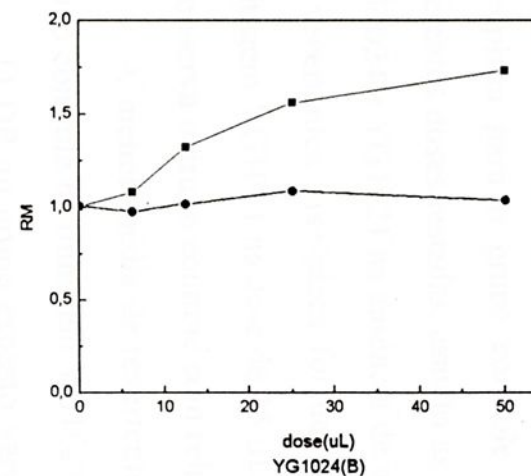
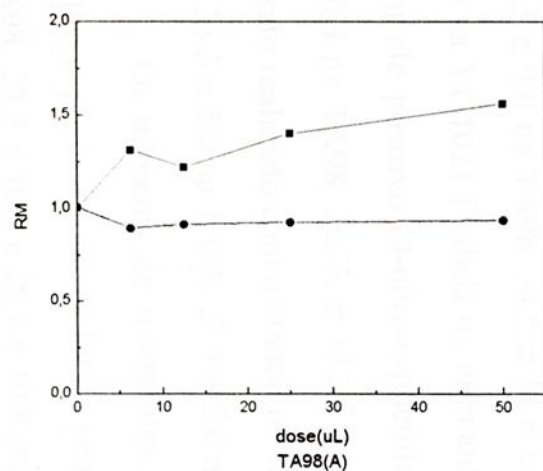
três deles. Já a linhagem YG1021 mostrou ausência de mutagenicidade nas amostras de onze indivíduos e resposta positiva para a amostra de um deles.

Na Tabela 5 tem-se os dados da estatística descritiva expressa em razão de mutagenicidade (RM) dos extratos urinários dos grupos controle (C) e exposto (E) com as três linhagens analisadas, na presença de ativação metabólica.

A Figura 9 (A, B e C) mostra a resposta mutagênica expressa em razão de mutagenicidade (RM) dos extratos orgânicos da urina, tanto do grupo exposto quanto do controle com as três linhagens analisadas, na presença de ativação metabólica. Essa Figura ilustra efeito significativo de dose (valor $p < 0,001$) linhagem (valor $p = 0,006$) e grupo (valor $p < 0,001$) e sugere que tais efeitos seja decorrente da diferença que existe com relação a resposta obtida para as linhagens YG1024 e YG1021 e com relação a diferença dos índices de mutagenicidade considerando-se as doses. Portanto, os resultados obtidos com a análise estatística das razões de mutagenicidade foram condizentes com os resultados obtidos quando os dados foram analisados com o número médio de revertentes his+/placa.

Tabela 5 - Estatística descritiva expressa em razão de mutagenicidade (RM), indicando tamanho da amostra (N), média ($\bar{X}$) e desvio padrão (DP), calculados para o grupo controle (C) e grupo exposto à queima da cana-de-açúcar (E) em diferentes doses utilizando-se as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, YG1024 e YG1021 na presença de ativação metabólica.

Cepas	Dose ($\mu\text{L/placa}$)	C		E	
		N	$\bar{X} \pm \text{DP}$	N	$\bar{X} \pm \text{DP}$
TA98	0	12	1,00 $\pm$ 0,00	12	1,00 $\pm$ 0,00
	6,25	12	0,89 $\pm$ 0,12	12	1,31 $\pm$ 0,49
	12,5	12	0,91 $\pm$ 0,16	12	1,22 $\pm$ 0,55
	25	12	0,92 $\pm$ 0,24	12	1,40 $\pm$ 0,51
	50	12	0,93 $\pm$ 0,30	12	1,56 $\pm$ 0,44
YG1024	0	12	1,00 $\pm$ 0,00	12	1,00 $\pm$ 0,00
	6,25	12	0,97 $\pm$ 0,20	12	1,08 $\pm$ 0,25
	12,5	12	1,01 $\pm$ 0,18	12	1,32 $\pm$ 0,27
	25	12	1,08 $\pm$ 0,33	12	1,56 $\pm$ 0,37
	50	12	1,03 $\pm$ 0,47	12	1,73 $\pm$ 0,45
YG1021	0	12	1,00 $\pm$ 0,00	12	1,00 $\pm$ 0,00
	6,25	12	0,96 $\pm$ 0,19	12	0,99 $\pm$ 0,22
	12,5	12	1,04 $\pm$ 0,24	12	0,99 $\pm$ 0,20
	25	12	1,03 $\pm$ 0,37	12	1,14 $\pm$ 0,23
	50	12	1,06 $\pm$ 0,50	12	1,30 $\pm$ 0,28



■ Exposto
● Controle

Figura 9: Resposta mutagênica expressa em razão de mutagenicidade dos extratos orgânicos da urina, adsorvidos pela resina XAD-2, do grupo exposto à queima da cana-de-açúcar (E) e grupo controle (C) nas diferentes doses, nas linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, YG1024 e YG1021 na presença de ativação metabólica.

4.1.2 - Atividade Mutagênica na Ausência de Ativação Metabólica

Tabela 6 - Estatística descritiva do número de revertentes his+/placa, indicando

Na Tabela 6 tem-se os dados da estatística descritiva indicando tamanho da amostra (N), média ($\bar{X}$) e desvio padrão (DP) do número de revertentes his+/placa para o grupo controle (C) e grupo exposto à queimada (E) nas diferentes doses testadas, usando as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, YG1024 e YG1021 na ausência de ativação metabólica. O valor médio mais alto de revertentes his+/placa foi de $42,2 \pm 18,4$, observado no grupo exposto na linhagem YG1021 na dose de 25 μ L, mostrando ser praticamente o dobro quando se observa o grupo controle com relação a mesma linhagem e dose.

A menor média de revertentes his+/placa foi de $21,4 \pm 7,0$ observada no grupo controle na linhagem YG1021 na dose de 50 μ L.

O DP no grupo exposto variou de 8,8 a 15,7 na TA98, de 7,1 a 11,6 na YG1024 e de 8,5 a 18,4 na YG1021 entre as doses analisadas. Já no grupo controle a variação foi de 9,0 a 19,1; 4,7 a 13,6 e de 4,5 a 9,0 respectivamente, entre as doses testadas, indicando que o número de revertentes his+/placa mostrasse mais homogêneo quanto a YG1021 nas cinco doses.

Os valores médios de revertentes his- placa no controle negativo (DMSO), respectivamente, na amostra exposta e controle foram de $36,8 \pm 8,8$ e $38,5 \pm 9,0$ na TA98, $34,5 \pm 11,6$ e $30,7 \pm 4,7$ na YG1024 e $37,6 \pm 8,5$ e $27,0 \pm 4,5$ na YG1021 (Tabela 6), enquanto que as médias de revertentes his+/placa no controle positivo (4-nitro-o-phenilenediamina 10 μ g/placa) foram de $1474,3 \pm 130,4$ na TA98, $2633, \pm 132,7$ na YG1024 e $2583,3 \pm 216,0$ na YG1021. No ensaio realizado com o branco os valores médios de revertentes his+/placa foram de $26,3 \pm 5,0$ na TA98, $27,3 \pm 5,0$ na YG1024 e $34,7 \pm 8,1$ na YG1021.

Os números de revertentes his-/ μ L do extrato diluído da urina, para o grupo exposto e controle foram respectivamente $35,9 \pm 11,6$ e $34,2 \pm 16,0$ para a TA98, $29,2 \pm 10,1$ e $28,1 \pm 10,8$ para a YG1024 e $36,5 \pm 11,7$ e $23,9 \pm 7,3$ para a YG1021, indicando que a linhagem YG1024 teve o menor índice de revertentes his+/ μ L.

Tabela 6 - Estatística descritiva do número de revertentes his+/placa, indicando tamanho da amostra (N), média ($\bar{X}$) e desvio padrão (DP), calculados para o grupo controle (C) e grupo exposto à queima da cana-de-açúcar (E) em diferentes doses utilizando-se as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, YG1024 e YG1021 na ausência de ativação metabólica. Entre parênteses após o tamanho da amostra, está indicado o número de placas analisadas para cada dose testada.

Cepas	Dose (μ L/placa)	C			E		
		N	$\bar{X}$	DP	N	$\bar{X}$	DP
TA98	0	12 (30)	38,5	9,0	12 (31)	36,8	8,8
	6,25	12 (30)	33,4	16,6	12 (28)	36,8	12,7
	12,5	12 (30)	33,3	14,3	12 (29)	34,4	10,7
	25	12 (30)	31,2	19,1	12 (28)	36,1	12,4
	50	12 (30)	33,6	18,8	12 (28)	38,3	15,7
YG1024	0	12 (36)	30,7	4,7	12 (32)	34,5	11,6
	6,25	12 (30)	27,3	13,6	12 (31)	26,9	8,3
	12,5	12 (30)	24,5	10,2	12 (31)	24,7	7,1
	25	12 (30)	22,1	8,8	12 (31)	29,3	9,8
	50	12 (29)	23,9	11,6	12 (30)	29,9	10,5
YG1021	0	12 (29)	27,0	4,5	12 (31)	37,6	8,5
	6,25	12 (30)	21,5	9,0	12 (29)	37,0	12,0
	12,5	12 (29)	22,4	7,8	12 (29)	35,3	10,9
	25	12 (30)	21,5	6,8	12 (29)	42,2	18,4
	50	12 (27)	21,4	7,0	12 (29)	37,2	11,8

A Figura 10 (A, B e C) mostra as curvas dose-resposta dos extratos urinários tanto do grupo exposto quanto do controle com as três linhagens analisadas TA98, YG1024 e YG1021, na ausência de ativação metabólica. Essa Figura ilustra efeito significativo de linhagem (valor $p < 0,001$) e grupo (valor $p < 0,001$) e sugere que tais efeitos seja decorrente do maior número de revertentes na amostra do grupo exposto com relação ao controle na linhagem YG1021. Além disso indica que não ocorreu efeito significativo de dose (valor $p = 0,689$), já que em nenhuma das curvas houve aumento do número de revertentes com o aumento da dose.

A Figura 10A e a Tabela 7 mostram que o extrato orgânico da urina não induziu mutagenicidade em ambos os grupos quanto a TA98, uma vez que não existe o efeito dose-resposta entre as diferentes doses e o número de revertentes induzidos e a RM indica uma resposta negativa já que o índice dois não foi atingido em, pelo menos, uma das doses testadas para ambos os grupos. Observa-se ainda que o número de revertentes mantém-se praticamente constante nos dois grupos (Figura 10A), o que difere quando se observa a curva dose-resposta da amostra do grupo exposto e controle na presença de S9 com relação à mesma linhagem (Figura 8A).

A Figura 10B mostra que o extrato orgânico da urina não induziu atividade mutagênica tanto no grupo exposto quanto no controle na YG1024, uma vez que não existe o efeito dose-resposta entre as diferentes doses e o número de revertentes induzidos. Observa-se ainda que o número de revertentes mantém-se constante com o aumento da dose em ambos os grupos, diferindo do que ocorre com a curva dose-resposta da amostra do grupo exposto e controle na presença de S9 para a mesma linhagem (Figura 8B). Além disso, a RM (Tabela 7) vem confirmar o resultado negativo já que o índice não atingiu valor maior ou igual a dois nos extratos dos dois grupos analisados.

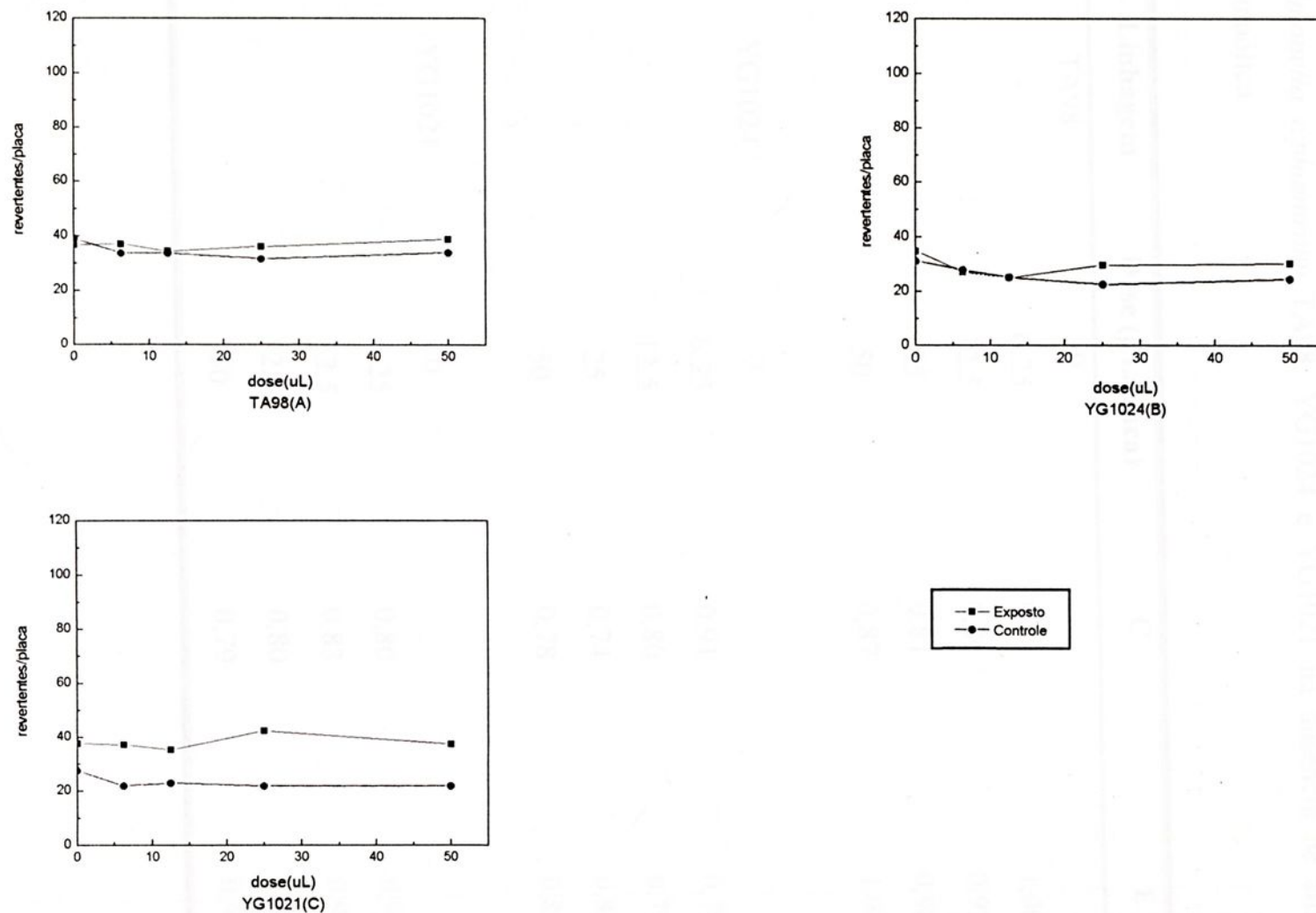


Figura 10- Curvas dose-respostas dos extratos orgânicos da urina, adsorvidos pela resina XAD-2, do grupo exposto à queima da cana-de-açúcar (E) e grupo controle (C) nas diferentes doses testadas, nas linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, YG1024 e YG1021 na ausência de ativação metabólica.

Tabela 7 - Resposta mutagênica dos extratos orgânicos da urina expressa em razão de mutagenicidade (RM) do grupo controle (C) e grupo exposto à queima da cana-de-açúcar (E) nas diferentes doses testadas, frente às linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, YG1024 e YG1021 na ausência de ativação metabólica.

Linhagem	Dose ($\mu\text{L/placa}$)	C	E
TA98	0		
	6,25	0,87	1,00
	12,5	0,86	0,93
	25	0,81	0,98
	50	0,87	1,04
YG1024	0		
	6,25	0,91	0,78
	12,5	0,80	0,72
	25	0,74	0,85
	50	0,78	0,87
YG1021	0		
	6,25	0,80	0,98
	12,5	0,83	0,94
	25	0,80	1,12
	50	0,79	0,99

Com relação a Figura 10C observou-se que o extrato orgânico da urina também não induziu mutagenicidade nos dois grupos na YG1021, uma vez que não ocorreu o efeito dose-resposta entre as diferentes doses e o número de revertentes induzidos, o que pode ser confirmado na Tabela 7 com uma resposta negativa para a RM. Entretanto, ressalta-se que essa foi a única linhagem em que o número de revertentes foi maior no grupo exposto que no controle, embora mantendo-se constante com o aumento da dose.

Os resultados individuais dos extratos orgânicos da urina dos indivíduos expostos à queima da cana-de-açúcar e dos controles na ausência de ativação metabólica, nas diferentes doses e linhagens analisadas constam do apêndice. Todas as amostras dos indivíduos expostos e controles mostraram ausência de mutagenicidade, com exceção das amostras de dois indivíduos expostos que mostraram indício de mutagenicidade na linhagem TA98.

Na Tabela 8 tem-se os dados da estatística descritiva expressa em razão de mutagenicidade (RM) dos extratos urinários dos grupos controle (C) e exposto (E), nas três linhagens analisadas, na ausência de ativação metabólica.

A Figura 11 (A, B e C) mostra a resposta mutagênica expressa em razão de mutagenicidade (RM) dos extratos orgânicos da urina, tanto do grupo exposto quanto do controle, nas três linhagens analisadas, na ausência de ativação metabólica. Essa Figura ilustra efeito significativo de dose (valor $p=0,028$) linhagem (valor $p=0,043$) e grupo (valor $p=0,001$) e sugere que tais efeitos seja decorrente da diferença que existe com relação a resposta obtida para as linhagens YG1024 e TA98 e com relação a diferença dos índices de mutagenicidade considerando-se as duas últimas doses.

Esses resultados diferem daqueles obtidos quando os dados foram analisados com o número médio de revertentes his+/placa por não ter ocorrido efeito significativo de dose (valor $p=0,089$) quando analisados pelo número médio de revertentes his+/placa.



Tabela 8 - Estatística descritiva expressa em razão de mutagenicidade (RM), indicando tamanho da amostra (N), média ($\bar{X}$) e desvio padrão (DP), calculados para o grupo controle (C) e grupo exposto à queima da cana-de-açúcar (E) em diferentes doses utilizando-se as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, YG1024 e YG1021 na ausência de ativação metabólica.

Cepas	Dose ($\mu\text{L/placa}$)	C		E	
		N	$\bar{X} \pm \text{DP}$	N	$\bar{X} \pm \text{DP}$
TA98	0	12	1,00 $\pm$ 0,00	12	1,00 $\pm$ 0,00
	6,25	12	0,87 $\pm$ 0,25	12	1,10 $\pm$ 0,34
	12,5	12	0,87 $\pm$ 0,19	12	1,00 $\pm$ 0,28
	25	12	0,80 $\pm$ 0,34	12	1,01 $\pm$ 0,38
	50	12	0,86 $\pm$ 0,31	12	1,07 $\pm$ 0,37
YG1024	0	12	1,00 $\pm$ 0,00	12	1,00 $\pm$ 0,00
	6,25	12	0,92 $\pm$ 0,32	12	0,80 $\pm$ 0,21
	12,5	12	0,84 $\pm$ 0,26	12	0,86 $\pm$ 0,32
	25	12	0,75 $\pm$ 0,19	12	0,85 $\pm$ 0,26
	50	12	0,81 $\pm$ 0,35	12	0,90 $\pm$ 0,28
YG1021	0	12	1,00 $\pm$ 0,00	12	1,00 $\pm$ 0,00
	6,25	12	0,83 $\pm$ 0,30	12	0,93 $\pm$ 0,21
	12,5	12	0,85 $\pm$ 0,25	12	0,87 $\pm$ 0,17
	25	12	0,82 $\pm$ 0,23	12	1,04 $\pm$ 0,28
	50	12	0,82 $\pm$ 0,23	12	0,96 $\pm$ 0,16

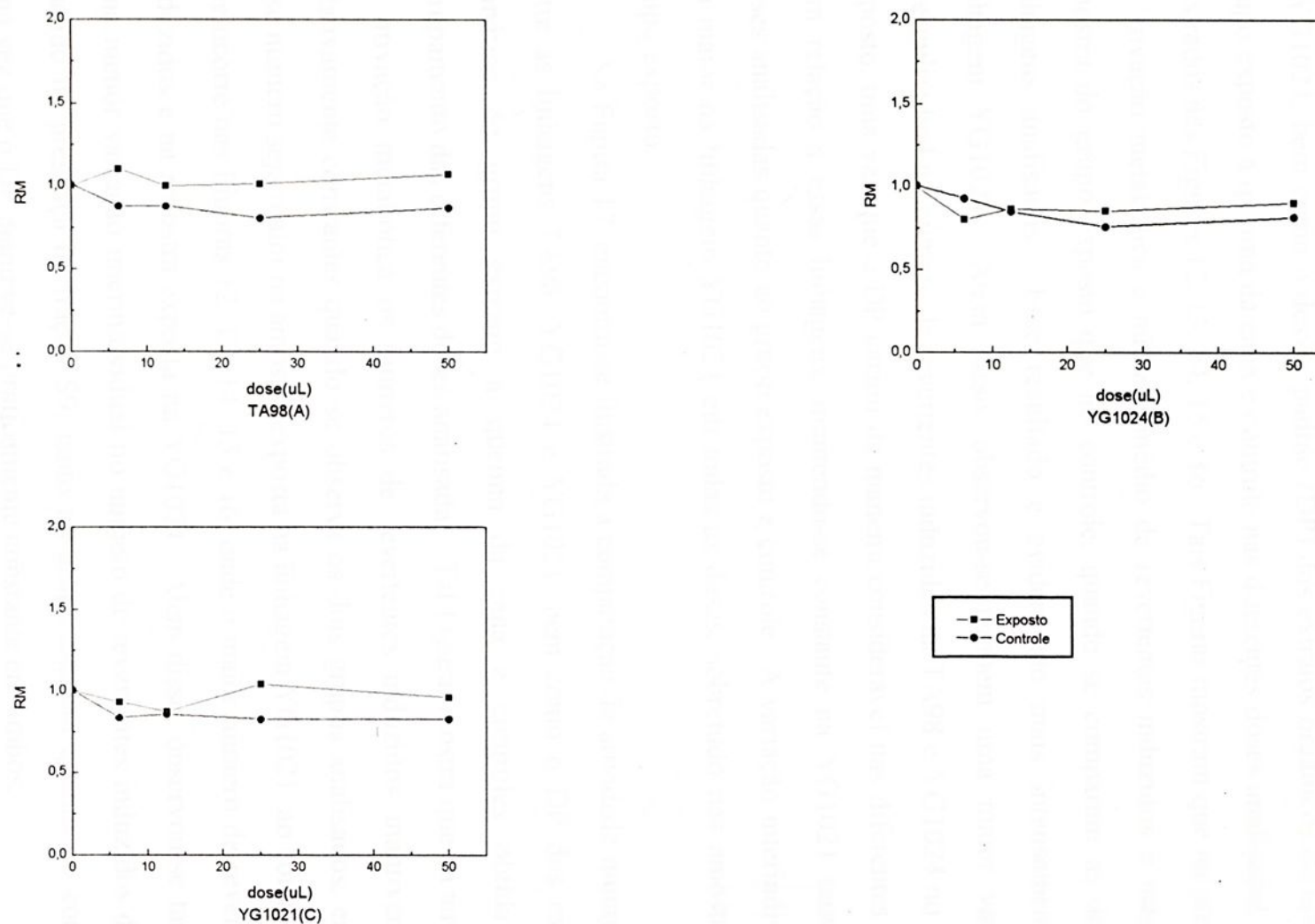


Figura 11- Resposta mutagênica expressa em razão de mutagenicidade dos extratos orgânicos da urina, adsorvidos pela resina XAD-2, do grupo exposto à queima da cana-de-açúcar (E) e grupo controle (C) nas diferentes doses, nas linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, YG1024 e YG1021 na ausência de ativação metabólica.

4.1.3 - Comparação da Atividade Mutagênica Relacionando os Grupos, Linhagens, Doses e Metabolização

A comparação da atividade mutagênica entre as linhagens TA98, YG1024 e YG1021, bem como o desvio padrão (DP) dos extratos orgânicos da urina do grupo exposto à queima da cana e controle nas diferentes doses analisadas, estão ilustrados nas Figuras 12, 13, 14, 15 e 16. Tais Figuras mostram que na presença de ativação metabólica o número médio de revertentes induzidos é maior na amostra do grupo exposto que no controle, quando se comparam as doses e linhagens analisadas. Esse resultado é evidenciado mais intensamente na linhagem YG1024. Além disso, observou-se também uma maior variação interindividual no número de revertentes induzidos na TA98 e YG1024 no grupo exposto, uma vez que o DP variou de maneira considerável nas diferentes doses com relação a essas linhagens, mantendo-se constante na YG1021 tanto nas doses analisadas quanto no grupo exposto e controle. A variação interindividual foi maior na linhagem YG1024 em todas as doses, sobretudo nas amostras do grupo exposto.

Na Figura 17, encontra-se ilustrada a comparação da atividade mutagênica entre as linhagens TA98, YG1024 e YG1021, bem como o DP dos extratos urinários do grupo exposto à queima da cana e controles obtida pelo agrupamento das diferentes doses analisadas. Tal Figura, mostra que na ausência de ativação metabólica os números de revertentes induzidos mantiveram-se relativamente constantes quando se observa os dois grupos analisados, embora esse número seja maior na amostra exposta na linhagem YG1021, ao contrário do que ocorre nas Figuras 12, 13, 14, 15 e 16, onde o maior número de revertentes induzidos é na amostra exposta na YG1024. Além disso, observou-se também uma menor variação interindividual no número de revertentes induzidos do que quando na presença da fração S9, tanto no grupo exposto quanto no controle, uma vez que o DP manteve-se praticamente constante em ambos.



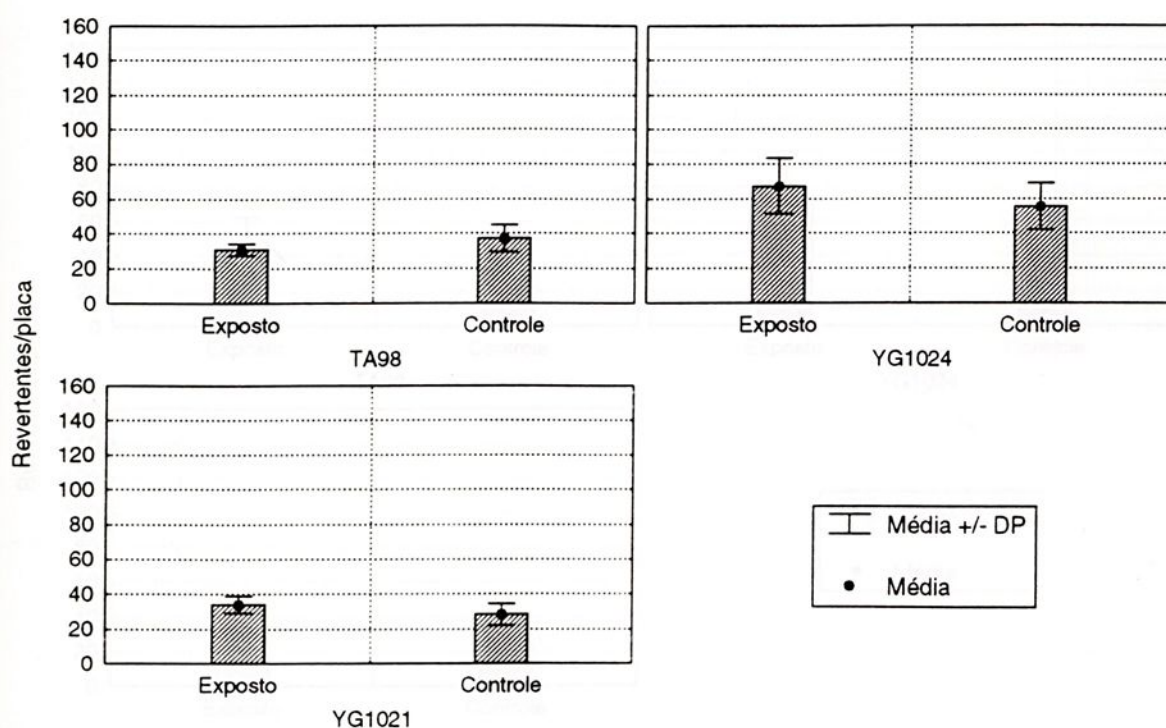


Figura 12 - Comparação da atividade mutagênica nas linhagens TA98, YG1024 e YG1021, obtida na presença de ativação metabólica, utilizando-se o extrato orgânico da urina dos indivíduos do grupo exposto e controle na dose zero $\mu\text{L/placa}$.

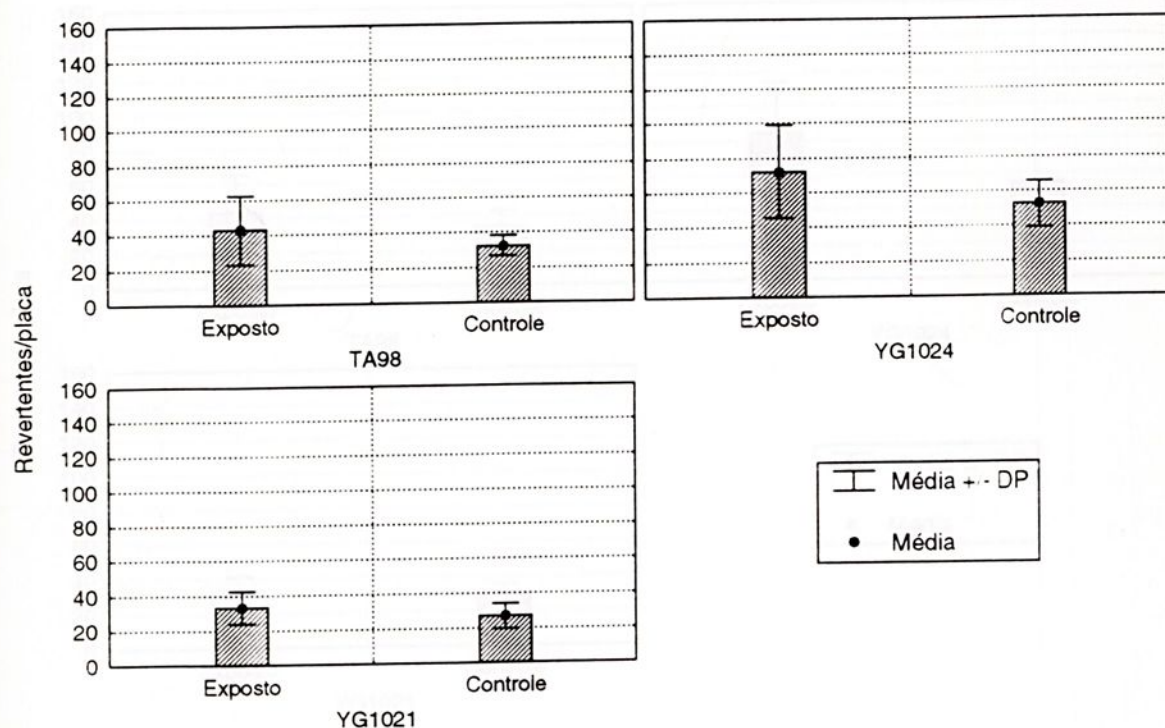


Figura 13 - Comparação da atividade mutagênica nas linhagens TA98, YG1024 e YG1021, obtida na presença de ativação metabólica, utilizando-se o extrato orgânico da urina dos indivíduos do grupo exposto e controle na dose de 6,25 μ L/placa.

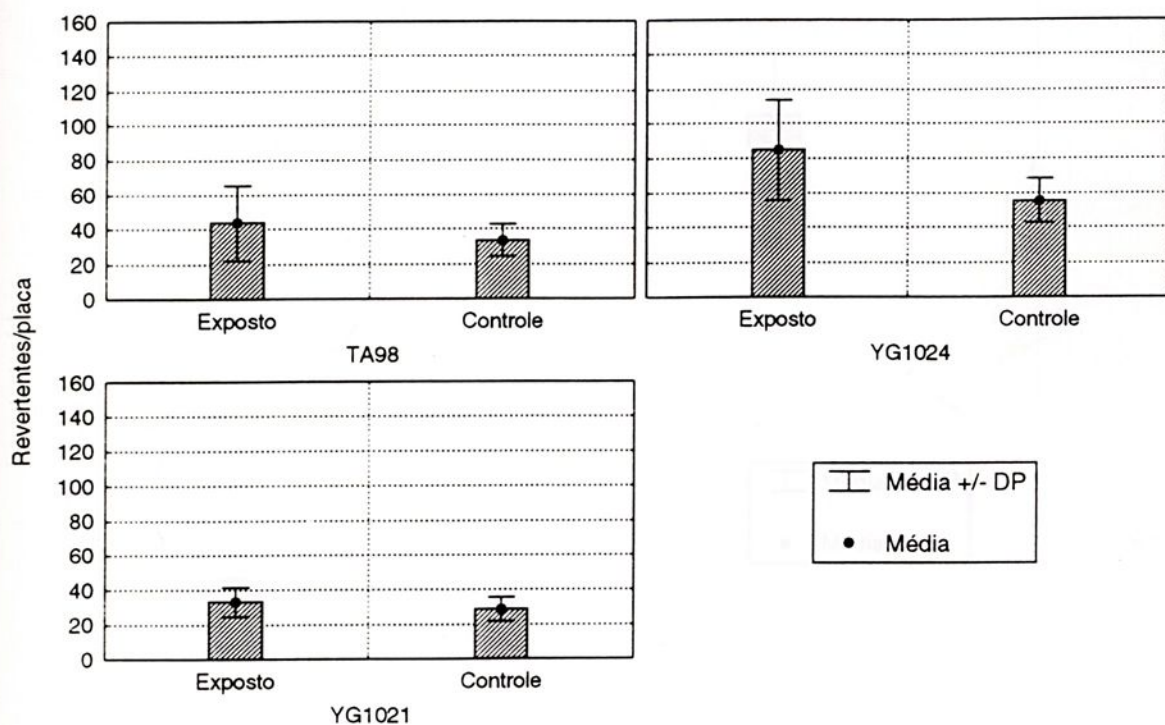


Figura 14 - Comparação da atividade mutagênica nas linhagens TA98, YG1024 e YG1021, obtida na presença de ativação metabólica, utilizando-se o extrato orgânico da urina dos indivíduos do grupo exposto e controle na dose de 12.5 $\mu\text{L/placa}$.

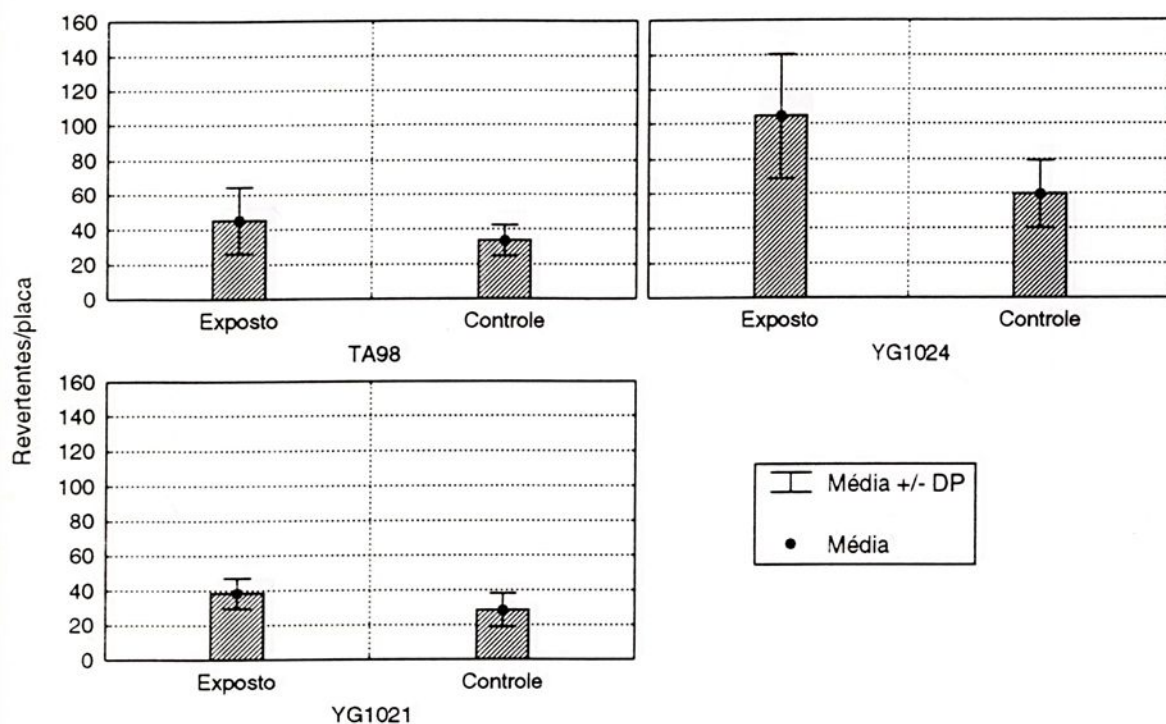


Figura 15 - Comparação da atividade mutagênica nas linhagens TA98, YG1024 e YG1021, obtida na presença de ativação metabólica, utilizando-se o extrato orgânico da urina dos indivíduos do grupo exposto e controle na dose de 25 μL /placa.

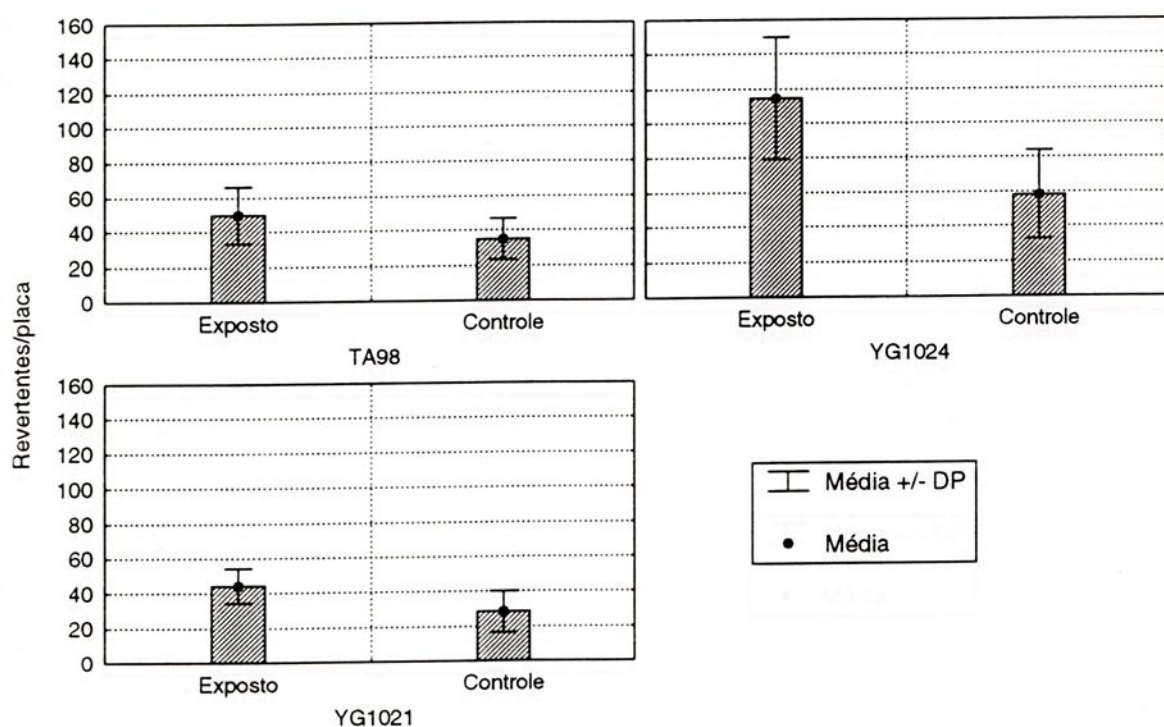


Figura 16 - Comparação da atividade mutagênica nas linhagens TA98, YG1024 e YG1021, obtida na presença de ativação metabólica, utilizando-se o extrato orgânico da urina dos indivíduos do grupo exposto e controle na dose de 50 μ L/placa.

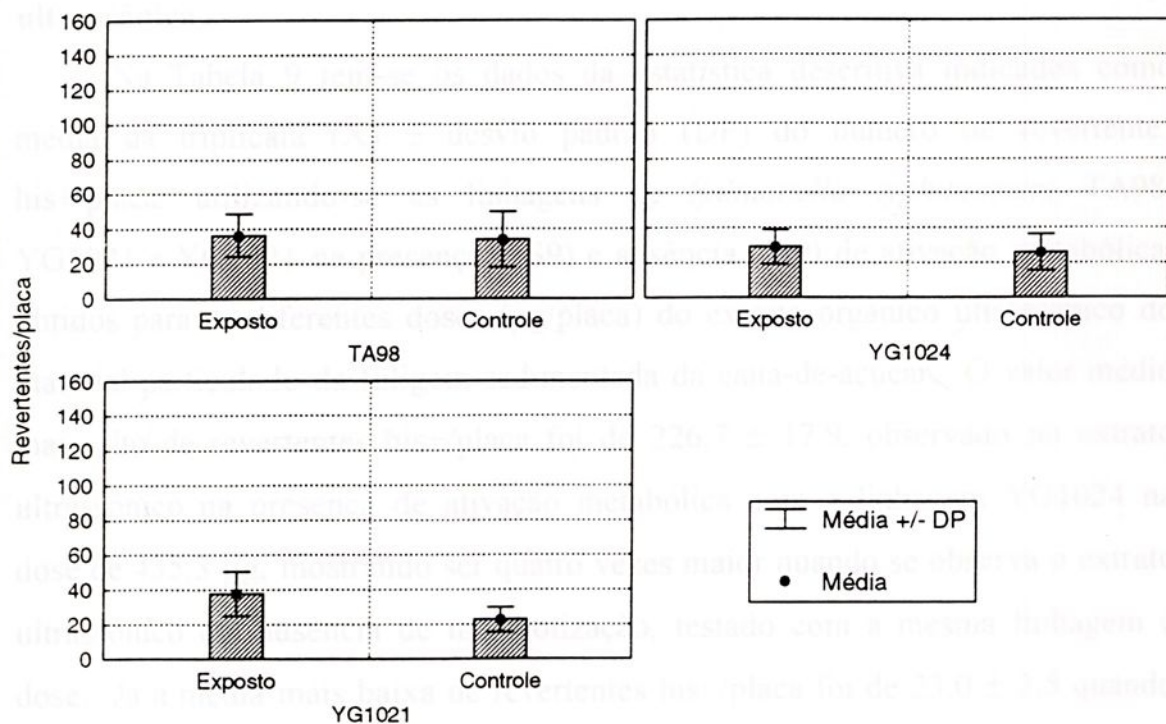


Figura 17 - Comparação da atividade mutagênica nas linhagens TA98, YG1024 e YG1021, obtida na ausência de ativação metabólica, agrupando-se as diferentes doses ($\mu\text{L}/\text{placa}$) utilizadas do extrato orgânico da urina dos indivíduos do grupo exposto e controle.

4.2 - Atividade Mutagênica dos Extratos Orgânicos da Fuligem

A atividade mutagênica dos extratos bruto da fuligem sedimentada da queima da cana-de-açúcar, utilizando os agentes extratores diclorometano/metanol (DCM:MeOH) e tolueno, respectivamente, extração por ultrassonicação e soxhlet, foi avaliada através de ensaios com mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* usando as linhagens TA98, YG1021 e YG1024 tanto na presença quanto ausência de ativação metabólica.

4.2.1 - Atividade Mutagênica do extrato orgânico da Fuligem por extração ultrassônica

Na Tabela 9 tem-se os dados da estatística descritiva indicados como média da triplicata ($\bar{X}$) $\pm$ desvio padrão (DP) do número de revertentes his+/placa, utilizando-se as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, YG1024 e YG1021 na presença (+S9) e ausência (-S9) de ativação metabólica, obtidos para as diferentes doses ($\mu\text{g/placa}$) do extrato orgânico ultrassônico do material particulado da fuligem sedimentada da cana-de-açúcar. O valor médio mais alto de revertentes his+/placa foi de $226,7 \pm 17,9$, observado no extrato ultrassônico na presença de ativação metabólica com a linhagem YG1024 na dose de $435,3 \mu\text{g}$, mostrando ser quatro vezes maior quando se observa o extrato ultrassônico em ausência de metabolização, testado com a mesma linhagem e dose. Já a média mais baixa de revertentes his+/placa foi de $23,0 \pm 3,5$ quando na ausência de ativação metabólica, na linhagem YG1024, na dose de $54,3 \mu\text{g}$. O DP no extrato ultrassônico com ativação metabólica variou de 0,6 a 14,0 na TA98, de 3,5 a 20,0 na YG1024 e de 3,0 a 12,0 na YG1021 entre as doses analisadas. Já na ausência de ativação metabólica, a variação foi de 1,5 a 10,4, de 3,2 a 12,2 e de 3,6 a 9,5, respectivamente TA98, YG1024 e YG1021, revelando que as amostras apresentaram resultados mais homogêneos quando sem metabolização.



TABELA 9 - Estatística descritiva do número de revertentes his+/placa, utilizando-se as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, YG1024 e YG1021 na presença (+S9) e ausência (-S9) de ativação metabólica, obtida para as diferentes doses ($\mu\text{g/placa}$) do extrato orgânico ultrassônico do material particulado da fuligem sedimentada da cana-de-açúcar. Os valores estão apresentados como média de triplicata ($\bar{X}$) $\pm$ desvio padrão (DP).

Cepas	Dose ($\mu\text{g/placa}$)	+S9	-S9
		$\bar{X} \pm \text{DP}$	$\bar{X} \pm \text{DP}$
TA98	0	29,4 $\pm$ 5,0	22,7 $\pm$ 1,5
	27,2	43,7 $\pm$ 2,3	28,0 $\pm$ 10,1
	54,3	34,3 $\pm$ 0,6	37,7 $\pm$ 6,0
	108,8	53,7 $\pm$ 7,6	28,7 $\pm$ 9,1
	217,6	60,0 $\pm$ 8,2	31,0 $\pm$ 10,4
	435,3	78,7 $\pm$ 14,0	45,7 $\pm$ 3,5
YG1024	0	91,3 $\pm$ 3,5	24,2 $\pm$ 4,7
	27,2	111,0 $\pm$ 17,5	29,3 $\pm$ 5,0
	54,3	119,0 $\pm$ 12,5	23,0 $\pm$ 3,5
	108,8	123,0 $\pm$ 20,0	37,3 $\pm$ 5,1
	217,6	151,3 $\pm$ 29,3	41,7 $\pm$ 3,2
	435,3	226,7 $\pm$ 17,9	57,0 $\pm$ 12,2
YG1021	0	33,7 $\pm$ 4,7	45,4 $\pm$ 5,4
	27,2	44,0 $\pm$ 3,0	57,3 $\pm$ 6,4
	54,3	49,7 $\pm$ 3,2	43,0 $\pm$ 8,2
	108,8	62,0 $\pm$ 6,2	52,0 $\pm$ 3,6
	217,6	70,3 $\pm$ 12,0	51,0 $\pm$ 9,5
	435,3	83,0 $\pm$ 11,3	55,0 $\pm$ 7,1

Os valores médios de revertentes his+/placa no controle negativo (DMSO), respectivamente, na presença e ausência de ativação metabólica foram de $29,4 \pm 5,0$ e $22,7 \pm 1,5$ na TA98, $91,3 \pm 3,5$ e $24,2 \pm 4,7$ na YG1024 e $33,7 \pm 4,7$ e $45,4 \pm 5,4$ na YG1021 (Tabela 9), enquanto que as médias de revertentes his+/placa no controle positivo na presença de S9 (2-antramina $3 \mu\text{g/placa}$) foram de $3215,5 \pm 167,6$ na TA98, $723,0 \pm 7,1$ na YG1024 e $2574,0 \pm 339,1$ na YG1021 e $1142,0 \pm 46,7$ na TA98, $2260,3 \pm 32,1$ na YG1024 e $2701,0 \pm 35,4$ na YG1021 quando sem metabolização (4-nitro-o-phenylenediamine $10 \mu\text{g/placa}$).

No ensaio realizado com o branco dessa metodologia os valores médios de revertentes his+/placa foram de $45,7 \pm 1,1$ na TA98, $94,3 \pm 10,1$ na YG1024 e $41,3 \pm 5,5$ na YG1021 quando o extrato foi testado com metabolização e $19,0 \pm 6,2$, $33,0 \pm 7,0$ e $52,7 \pm 13,3$, respectivamente TA98, YG1024 e YG1021, quando sem ativação metabólica.

Os números de revertentes his+/ μg do extrato ultrassônico da fuligem tanto na presença quanto ausência de ativação metabólica foram respectivamente $35,07 \pm 8,5$ e $27,2 \pm 8,1$ para a TA98, $97,0 \pm 17,2$ e $25,5 \pm 6,3$ para a YG1024 e $42,2 \pm 8,8$ e $47,5 \pm 7,9$ para a YG1021, indicando que a linhagem YG1024 teve o maior índice de revertentes his+/ μg quando testada com metabolização e a YG1021 obteve o maior índice quando sem ativação metabólica.

Na figura 18 (A, B e C), tem-se as curvas dose-resposta do extrato ultrassônico da fuligem sedimentada da cana-de-açúcar, na presença e ausência de ativação metabólica com as três linhagens analisadas, TA98, YG1024 e YG1021. Essa Figura ilustra efeito significativo de dose (valor $p < 0,001$), linhagem (valor $p < 0,001$) e metabolização (valor $p < 0,001$) e sugere que tais efeitos seja decorrente da diferença que existe no comportamento da amostra com e sem ativação metabólica e também pelo aumento do número de revertentes com o aumento da dose (+S9), principalmente na linhagem YG1024.



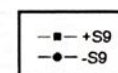
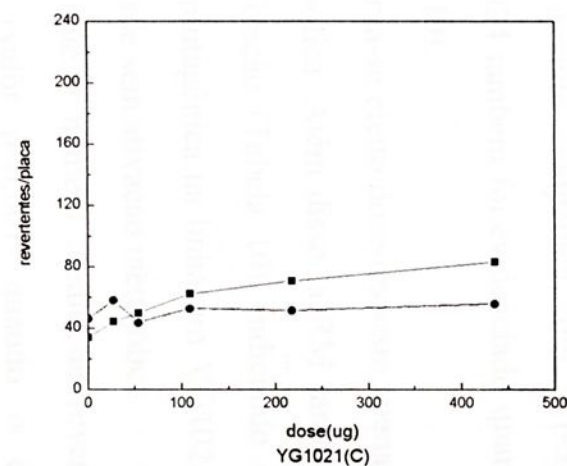
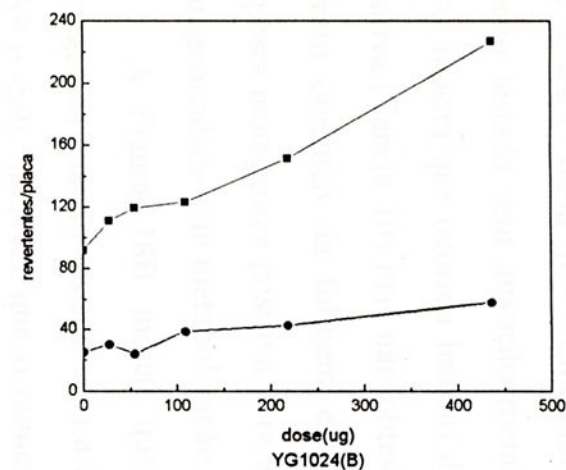
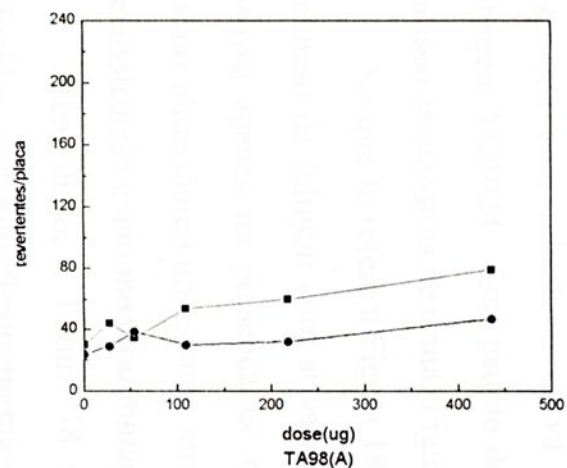


Figura 18 - Curvas dose-resposta do extrato orgânico ultrassônico do material particulado da fuligem sedimentada da cana-de-açúcar nas diferentes doses testadas, utilizando as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, YG1024 e YG1021 tanto na presença quanto ausência de ativação metabólica.

A Figura 18A mostra que o extrato ultrassônico da fuligem induziu atividade mutagênica na linhagem TA98 com ativação metabólica, uma vez que obteve-se o efeito dose-resposta e a RM atingiu o índice dois em pelo menos uma das doses (Tabela 10). Entretanto, a observação da curva dose-resposta do extrato testado sem ativação metabólica referente à mesma linhagem (Figura 18A) mostra que ocorreu indício de atividade mutagênica, dado que a RM foi positiva (Tabela 10) mas não obteve-se o efeito dose resposta, indicando que o extrato orgânico da fuligem extraído pelo processo ultrassônico apresentou resposta mutagênica positiva para a TA98 com ativação metabólica e indício de mutagenicidade sem metabolização.

A Figura 18B indica que o extrato ultrassônico induziu atividade mutagênica quando testado com a linhagem YG1024 com e sem metabolização (+S9 e -S9), uma vez que o número de revertentes induzidos aumentou com o aumento da dose e a RM (Tabela 10) atingiu o índice dois em pelo menos uma das doses. Ademais, na Figura 18B fica bem evidenciado a diferença de comportamento da linhagem YG1024 com relação a YG1021 e TA98, dado que na presença de ativação metabólica as médias de revertentes his+/placa foram bem maiores quando o extrato foi testado com a YG1024 que quando testado com a TA98 e YG1021 com e sem metabolização. Essa diferença também foi observada com relação a curva (+S9) quando comparada com a (-S9) na linhagem YG1024. Esse padrão da YG1024 também foi evidenciado quando se analisou as amostras de urina (Figuras 8 e 10).

No que se refere a Figura 18C observa-se efeito dose-resposta apenas para o extrato da fuligem com ativação metabólica. Além disso, a RM também foi positiva apenas na presença de metabolização (Tabela 10), indicando que o extrato ultrassônico apresentou atividade mutagênica na linhagem YG1021 com metabolização e não mostrou mutagenicidade sem ativação metabólica.

Além disso, a Figura 18 mostra que o número médio de revertentes induzidos foi significativamente maior (valor $p < 0.001$) quando o extrato ultrassônico foi testado com ativação metabólica quando se comparam as doses e



Tabela 10 - Resposta mutagênica do extrato orgânico ultrassônico do material particulado da fuligem sedimentada da cana-de-açúcar expressa em razão de mutagenicidade (RM) nas diferentes doses, utilizando-se as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, YG1024 e YG1021 tanto na presença quanto ausência de ativação metabólica.

Linhagem	Dose ($\mu\text{g/placa}$)	+S9	-S9
TA98	0		
	27,2	1,49	1,23
	54,3	1,17	1,66
	108,8	1,83	1,26
	217,6	2,04	1,37
	435,3	2,68	2,01
YG1024	0		
	27,2	1,22	1,21
	54,3	1,30	0,95
	108,8	1,35	1,54
	217,6	1,66	1,72
	435,3	2,48	2,35
YG1021	0		
	27,2	1,31	1,26
	54,3	1,47	0,95
	108,8	1,84	1,14
	217,6	2,09	1,12
	435,3	2,46	1,21

linhagens analisadas. Esse resultado foi evidenciado mais intensamente na linhagem YG1024 e mantém-se bem mais constantes quando se comparam as linhagens TA98 e YG1021 tanto na presença quanto ausência de ativação metabólica.

4.2.2 - Atividade Mutagênica do Extrato Orgânico da Fuligem por Extração Soxhlet

A concentração de material orgânico extraído (MOE) na amostra de 40 g de fuligem pela extração soxhlet utilizando-se o solvente tolueno foi de 3400 $\mu\text{g/mL}$, já o MOE de 40 g de fuligem pela extração ultrassônica utilizando o solvente DCM:MeOH (4:1) foi de 2600 $\mu\text{g/mL}$, indicando que o procedimento soxhlet-tolueno extraiu mais MOE quando comparado com o procedimento ultrasom-DCM:MeOH (4:1).

Na Tabela 11 tem-se os dados da estatística descritiva indicados como média da triplicata ($\bar{X}$) $\pm$ desvio padrão (DP) do número de revertentes his+/placa, utilizando-se as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, YG1024 e YG1021 na presença (+S9) e ausência (-S9) de ativação metabólica, obtidos para as diferentes doses ($\mu\text{g/placa}$) do extrato orgânico soxhlet do material particulado da fuligem sedimentada da cana-de-açúcar. O valor médio mais alto de revertentes his-/placa foi de $191,5 \pm 33,2$, observado no extrato soxhlet (+S9) com a linhagem YG1024 na dose de 141,7 μg , mostrando ser muito maior que o do extrato soxhlet (-S9) com relação a mesma linhagem e dose. Já a media mais baixa de revertentes his+/placa foi de $12,3 \pm 5,9$ quando na ausência de metabolização, na linhagem YG1021 na dose 141,7 μg . O DP no extrato soxhlet com ativação metabólica variou de 2,6 a 27,1 na TA98, de 5,7 a 33,2 na YG1024 e de 5,8 a 11,7 na YG1021 entre as doses analisadas. Já no extrato soxhlet sem ativação metabólica, a variação foi de 1,5 a 7,6, de 3,2 a 7,0 e de 4,4 a 13,9, respectivamente TA98, YG1024 e YG1021, revelando que as amostras apresentaram resultados mais homogêneos na ausência de metabolização.



TABELA 11 - Estatística descritiva do número de revertentes his+/placa, utilizando-se as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, YG1024 e YG1021 na presença (+S9) e ausência (-S9) de ativação metabólica, obtida para as diferentes doses ($\mu\text{g/placa}$) do extrato orgânico soxhlet do material particulado da fuligem sedimentada da cana-de-açúcar. Os valores estão apresentados como média de triplicata ($\bar{X}$) $\pm$ desvio padrão (DP).

Cepas	Dose ($\mu\text{g/placa}$)	+S9	-S9
		$\bar{X} \pm \text{DP}$	$\bar{X} \pm \text{DP}$
TA98	0	30,3 $\pm$ 5,5	24,2 $\pm$ 4,3
	8,8	38,0 $\pm$ 2,6	27,7 $\pm$ 5,8
	17,7	38,0 $\pm$ 2,6	32,7 $\pm$ 1,5
	35,3	42,7 $\pm$ 6,7	43,0 $\pm$ 3,6
	70,7	46,0 $\pm$ 2,6	34,0 $\pm$ 8,2
	141,7	74,3 $\pm$ 27,1	13,7 $\pm$ 7,6
YG1024	0	86,0 $\pm$ 14,0	35,2 $\pm$ 5,7
	8,8	98,3 $\pm$ 5,7	47,7 $\pm$ 7,0
	17,7	114,0 $\pm$ 11,4	59,3 $\pm$ 3,2
	35,3	130,0 $\pm$ 7,0	82,0 $\pm$ 4,4
	70,7	146,7 $\pm$ 20,0	34,0 $\pm$ 4,6
	141,7	191,5 $\pm$ 33,2	24,3 $\pm$ 4,2
YG1021	0	31,3 $\pm$ 8,7	45,4 $\pm$ 5,4
	8,8	35,0 $\pm$ 6,2	56,0 $\pm$ 13,9
	17,7	47,3 $\pm$ 5,8	61,3 $\pm$ 6,4
	35,3	47,3 $\pm$ 11,7	29,7 $\pm$ 7,5
	70,7	59,7 $\pm$ 6,7	30,0 $\pm$ 4,4
	141,7	77,0 $\pm$ 9,9	12,3 $\pm$ 5,9

Os valores médios de revertentes his+/placa no controle negativo (DMSO) foram de $30,3 \pm 5,5$ na TA98, $86,0 \pm 14,0$ na YG1024 e $31,3 \pm 8,7$ na YG1021 quando o extrato foi testado com metabolização e $24,2 \pm 4,3$, $35,2 \pm 5,7$ e $45,4 \pm 5,4$, respectivamente TA98, YG1024 e YG1021, quando sem ativação metabólica (Tabela 11), enquanto que a média de revertentes his+/placa no controle positivo na presença de ativação metabólica (2-antramina $3 \mu\text{g/placa}$) foi de $3215,5 \pm 167,6$ na TA98, $723,0 \pm 7,1$ na YG1024 e $2574,0 \pm 339,4$ na YG1021 e $1557,5 \pm 30,4$ na TA98, $2828,5 \pm 105,4$ na YG1024 e $1295,5 \pm 143,5$ na YG1021 quando sem metabolização (4-nitro-o-fenilenediamine $10 \mu\text{g/placa}$). No ensaio realizado com o branco dessa metodologia os valores médios de revertentes his+/placa foram de $29,0 \pm 7,0$ na TA98, $95,5 \pm 0,71$ na YG1024 e $35,7 \pm 4,7$ na YG1021 quando o extrato foi testado com metabolização e $33,0 \pm 2,0$, $50,3 \pm 7,5$ e $9,3 \pm 5,0$, respectivamente TA98, YG1024 e YG1021, quando sem ativação metabólica. O número de revertentes/ μg do extrato soxhlet da fuligem tanto na presença quanto ausência de ativação metabólica foram respectivamente $32,4 \pm 10,7$ e $32,2 \pm 9,7$ para a TA98, $98,2 \pm 17,1$ e $51,8 \pm 18,4$ para a YG1024 e $35,6 \pm 8,5$ e $50,7 \pm 11,1$ para a YG1021, indicando que a linhagem YG1024 teve o maior índice de revertentes/ μg .

Na figura 19 tem-se as curvas dose-resposta do extrato soxhlet da fuligem sedimentada da cana-de-açúcar na presença e ausência de ativação metabólica com as três linhagens analisadas, TA98, YG1024 e YG1021. Essa Figura ilustra efeito significativo de dose (valor $p < 0,001$), linhagem (valor $p < 0,001$) e metabolização (valor $p < 0,001$) e sugere que tais efeitos seja decorrente da diferença que existe no comportamento da amostra com e sem ativação metabólica e também pelo aumento do número de revertentes com o aumento da dose na presença de ativação metabólica, principalmente na linhagem YG1024.

A Figura 19A mostra que o extrato soxhlet da fuligem induziu atividade mutagênica na linhagem TA98 com metabolização, uma vez que o número de revertentes aumentou com o aumento da dose, obtendo-se o efeito dose-resposta e a RM atingiu o índice dois em pelo menos uma das doses (Tabela 12).

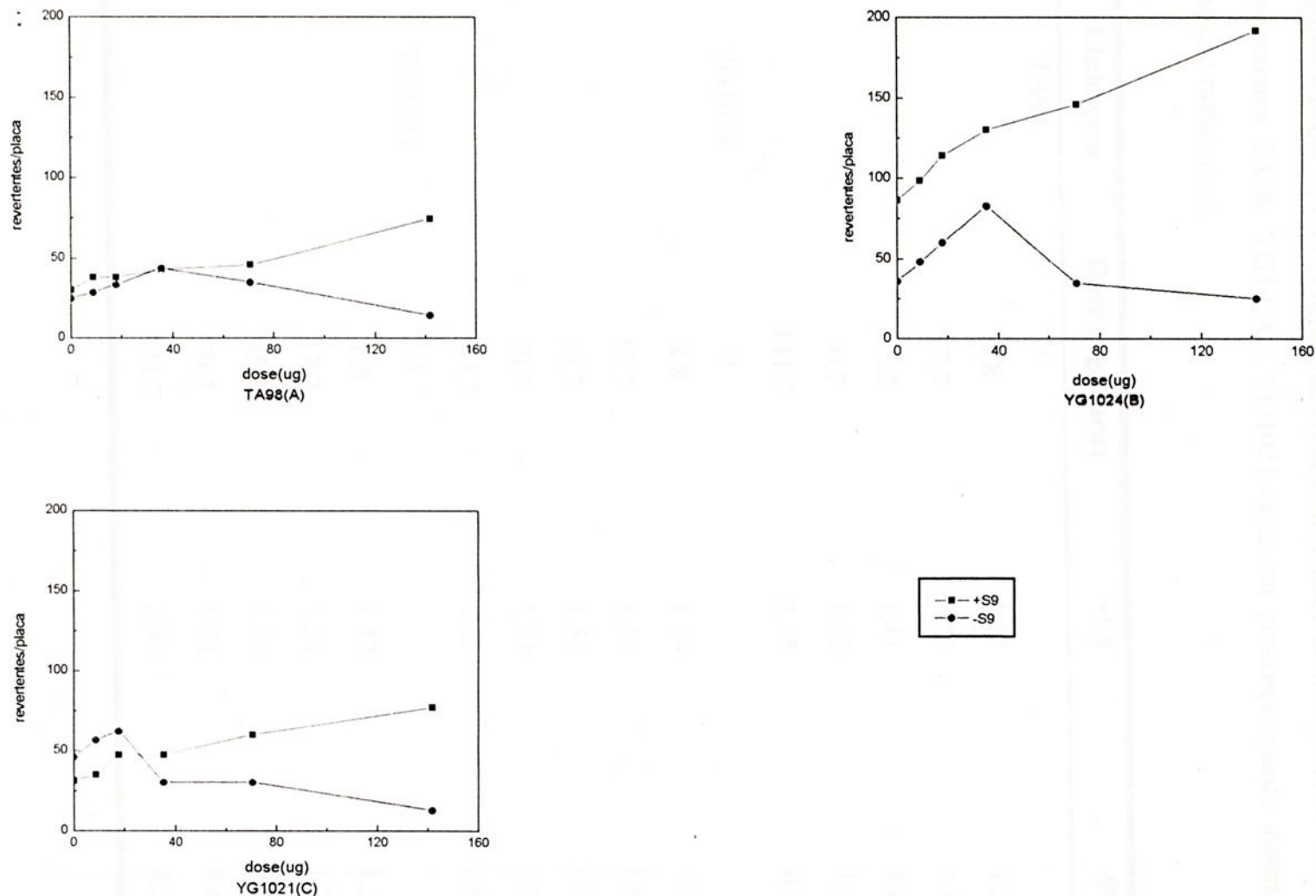


Figura 19 - Curvas dose-resposta do extrato orgânico soxhlet do material particulado da fuligem sedimentada da cana-de-açúcar nas diferentes doses testadas, utilizando as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, YG1024 e YG1021 tanto na presença quanto ausência de ativação metabólica.

Tabela 12 - Resposta mutagênica do extrato orgânico soxhlet do material particulado da fuligem sedimentada da cana-de-açúcar expressa em razão de mutagenicidade (RM) nas diferentes doses, utilizando as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98, YG1024 e YG1021 tanto na presença quanto ausência de ativação metabólica.

Linhagem	Dose (µg/placa)	+S9	-S9
TA98	0		
	8,8	1,25	1,2
	17,7	1,25	1,4
	35,3	1,41	1,8
	70,7	1,52	1,4
	141,7	2,45	0,6
YG1024	0		
	8,8	1,14	1,3
	17,7	1,33	1,68
	35,3	1,51	2,33
	70,7	1,71	0,97
	141,7	2,2	0,69
YG1021	0		
	8,8	1,12	1,23
	17,7	1,51	1,35
	35,3	1,51	0,65
	70,7	1,91	0,66
	141,7	2,46	0,27

Entretanto, na ausência de metabolização o extrato soxhlet da fuligem mostrou indício de mutagenicidade, dado que a RM não atingiu o índice dois mas obteve-se o efeito dose resposta nas três primeiras doses. Observa-se também uma redução no número de revertentes/placa nas doses de 70.7 e 141.7 μg , o que poderia ser justificado pela toxicidade do extrato.

A Figura 19B indica que o extrato soxhlet induziu atividade mutagênica na linhagem YG1024 com e sem metabolização, uma vez que o número de revertentes induzidos aumentou com o aumento da dose, obtendo-se o efeito dose-resposta e a RM (Tabela 12) atingiu o índice dois, embora nas doses 70.7 e 141.7 μg , quando o extrato foi testado sem metabolização (-S9), ocorreu uma diminuição do número de revertentes/placa, como já foi observado no teste com a linhagem TA98. Entretanto, o padrão da diferença de comportamento da linhagem YG1024 com relação a YG1021 e TA98 manteve-se, isto é, na presença de ativação metabólica as médias de revertentes/placa foram bem maiores quando o extrato foi testado com a linhagem YG1024 que as médias quando testado com a TA98 e YG1021 com e sem metabolização. Essa diferença, isto é médias de revertentes/placa maiores, também foi observada com relação a curva com metabolização quando comparada com a sem ativação metabólica na linhagem YG1024.

No que se refere a Figura 19C observa-se efeito dose-resposta apenas para o extrato da fuligem com ativação metabólica. Além disso, a RM também foi positiva apenas na presença de metabolização (Tabela 12), indicando que o extrato soxhlet da fuligem apresentou atividade mutagênica na linhagem YG1021 com metabolização e não foi mutagênico sem ativação metabólica.

A Figura 19 mostra que o número médio de revertentes induzidos foi significativamente maior (valor $p < 0,001$) no extrato soxhlet da fuligem testado com ativação metabólica quando se comparam as doses e linhagens analisadas. No entanto, esse resultado é evidenciado mais intensamente na linhagem YG1024.



5 - DISCUSSÃO

5.1 - Atividade Mutagênica detectada na Urina

Apesar da poluição ambiental ainda persistir em muitos locais, desde o final dos anos setenta estabeleceu-se uma legislação com a finalidade de proteger o meio ambiente o que levou ao surgimento da ecogenotoxicologia, um novo ramo da ciência que tem como objetivo principal a elucidação de indicações de toxicidade. Esses novos conhecimentos poderão ser utilizados na classificação do risco e avaliação do perigo, em relação a compostos químicos potencialmente prejudiciais, com o propósito de prevenir a exposição da população em geral (Calamari, 1992), uma vez que muitos compostos presentes no ambiente podem interagir com o material genético.

Os ensaios de mutagenicidade de curta duração, especialmente aqueles que utilizam linhagens bacterianas, são usados para traçar as propriedades mutagênicas de tais compostos e permitem reconhecer uma variedade de compostos mutagênicos que a população, como um todo, está inevitavelmente exposta, principalmente aquelas ocupacionalmente em contato com esses compostos.

Desse modo, a análise da mutagenicidade urinária, avaliada através de ensaios com mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium*, é bem aceita por ser um método adequado para a demonstração da exposição ocupacional a compostos químicos mutagênicos que são excretados na urina de forma inalterada, ou como conjugados, ou ainda na forma de metabólitos mutagênicos, (Yamasaki e Ames, 1977, Recio *et al.*, 1984, Cerná *et al.*, 1997). Assim sendo, esse biomarcador de exposição interna, tanto na presença quanto ausência de ativação metabólica, foi utilizado para avaliar a atividade mutagênica da urina dos indivíduos que trabalham no corte da cana-de-açúcar, baseando-se na suposição de que eles estão expostos a concentrações mais altas de HAPs e



outros compostos mutagênicos provenientes da combustão incompleta de matéria orgânica, derivados da queima das plantações de cana.

Na tentativa de aumentar a probabilidade de detecção do efeito da exposição aos compostos genotóxicos liberados na queima da plantação da cana, a linhagem TA98, um indicador padrão de mutagênicos que causam mudança na matriz de leitura para compostos mutagênicos urinários (Pasquini *et al.*, 1990), foi complementada com as linhagens YG1024 e YG1021 supostamente mais sensíveis em detectar compostos mutagênicos na urina (Einistö *et al.*, 1990, Kuenemann-Migeot *et al.*, 1997). Vários estudos realizados com amostras de urina de trabalhadores ocupacionalmente expostos à HAPs utilizando a TA98 mostraram resultados negativos, observando-se o contrário apenas em trabalhadores fumantes (Recio *et al.*, 1984, Venier *et al.*, 1985, Clonfero *et al.*, 1995).

Devido ao fato da N-hidroxiarilamina O-acetiltransferase ser uma enzima envolvida na ativação metabólica intracelular das amins aromáticas mutagênicas e dos nitroarenos, o gene da acetiltransferase da *Salmonella typhimurium* TA1538 foi clonado no plasmídeo pBR322 e introduzido na linhagem TA98, resultando numa nova linhagem, a YG1024, que abriga múltiplas cópias do plasmídeo pYG219 e apresenta cerca de cem vezes mais atividade da O-acetiltransferase do que a linhagem controle, mostrando-se extremamente sensível em detectar a atividade mutagênica das arilhidroxilaminas, nitroarenos e amins aromáticas (Watanabe *et al.*, 1990).

Além do gene da O-acetiltransferase, Watanabe *et al.* (1989) clonaram também o gene da nitrorredutase utilizando o mesmo procedimento, resultando na linhagem YG1021, que abriga múltiplas cópias do plasmídeo pYG216 e apresenta cinquenta vezes mais atividade da nitrofurazona-redutase do que sua linhagem original e mostra-se altamente sensível em detectar a mutagenicidade do 2-nitrofluoreno, 1-nitropireno e 2-nitronaftaleno, embora seja insensível para a atividade mutagênica do 1,8-dinitropireno e do 4-nitroquinolina 1-óxido. As nitrorredutases não participam da ativação metabólica das amins aromáticas.



Desse modo, a linhagem YG1021 também é insensível às aminas aromáticas mutagênicas. Por outro lado, a YG1024 é muito sensível não apenas à 2-nitrofluoreno, 1-nitropireno e 2-nitronaftaleno, mas também ao 1,8-dinitropireno e às aminas aromáticas. Portanto, a linhagem YG1024 é mais adequada para o monitoramento geral dos indivíduos expostos à esses compostos (Watanabe *et al.*, 1990). De fato, vários autores já identificaram que a YG1024 foi mais sensível em detectar a mutagenicidade da urina de fumantes (Einistö *et al.*, 1990, Hirvonen *et al.*, 1994, De Flora *et al.*, 1995), dos indivíduos expostos à produtos da combustão de gás de petróleo liquefeito (Yin *et al.*, 1998), assim como para a mutagenicidade de efluentes industriais e água de rios (Cerná *et al.*, 1996) quando comparada a TA98. Além disso, a YG1024 mostrou ser cinco vezes mais sensível aos compostos mutagênicos derivados da fumaça do cigarro (De Flora *et al.*, 1995), indicando a possibilidade de se detectar o efeito mutagênico da urina dos indivíduos que trabalham no corte da cana, utilizando-se essa linhagem.

Realmente os resultados obtidos com a urina dos cortadores de cana, na presença de ativação metabólica, utilizando-se a linhagem YG1024, condizem com os dados dos autores citados anteriormente, pois o número médio de revertentes induzidos foi significativamente maior (valor $P < 0,001$) quando se compara as amostras dos grupos exposto e controle, em relação aos resultados obtidos com a linhagem TA98 (Figura 8). Já para linhagem YG1021 o número médio de revertentes induzidos tanto no grupo exposto quanto no controle foi similar quando comparado com a linhagem TA98 (Figura 8). Esse resultado pode ser atribuído ao fato de que vários compostos liberados na queima da plantação da cana como os HAPs (B(a)P e 7, 12 dimetilbenzo(a)antraceno) podem expressar quase a mesma ou ainda uma mutagenicidade menor nas linhagens específicas para alguns nitroarenos como é o caso da YG1021, quando comparada a linhagem convencional TA98 (Hagiwara *et al.*, 1993). Além disso, essa linhagem não participa na ativação das aminas aromáticas e de alguns nitroarenos, fato esse que pode estar relacionado com o menor número de revertentes observados (Watanabe *et al.*, 1989).



TA98 As maiores médias de revertentes induzidos na amostra do grupo exposto que na do grupo controle nas três linhagens e em todas as doses analisadas (Figuras 12 a 16), assim como, os maiores índices de mutagenicidade (RM) obtidos para a amostra do grupo exposto (Tabela 5 e Figura 9) indicam que a urina dos cortadores de cana apresenta uma prevalência de compostos que necessitam de ativação metabólica, isto é, compostos de ação indireta que causam deslocamento da matriz de leitura, devido ao maior número de revertentes induzidos e maiores índices de mutagenicidade na amostra do grupo exposto observados na TA98, além de compostos hidroxilaminos, nitro aromáticos e aminas aromáticas, o que pode ser deduzido a partir do maior número de revertentes e maiores índices de mutagenicidade na amostra exposta quando comparado ao controle observado nas duas linhagens do grupo YG.

A maior média do número de revertentes e maiores razões de mutagenicidade obtidos principalmente com a urina dos cortadores de cana na linhagem YG1024 enfatiza a melhor capacidade dessa linhagem em detectar mutagenicidade urinária em indivíduos expostos à compostos mutagênicos provenientes da combustão incompleta de matéria orgânica. O fato da urina dos cortadores de cana não mostrar-se mutagênica, quando na presença de ativação metabólica, nas linhagens TA98 e YG1021 pode ser explicado pela capacidade de alguns componentes dos extratos urinários interferirem no ensaio bacteriano, uma vez que alguns compostos presentes na urina já foram relatados inibirem o sistema de metabolização *in vitro* (Granella *et al.*, 1996). O mesmo ocorreu com algumas misturas complexas ambientais. Por exemplo, Granella *et al.* (1995) observaram baixa ou nenhuma atividade mutagênica em alguns óleos minerais ricos em HAPs e demonstraram a grande capacidade de alguns componentes presentes nessas substâncias inibirem a mutagenicidade do B(a)P quando o experimento foi realizado na presença da fração S9. A importância da atividade enzimática da linhagem indicadora usada na análise da mutagenicidade urinária foi mostrada por Ahlborg *et al.* (1988), que observou ser a linhagem TA98NR (resistente ao 1-nitropireno e deficiente em nitrorredutases), menos sensível que a

TA98 em detectar o aumento da mutagenicidade urinária de trabalhadores ocupacionalmente expostos ao trinitrotolueno (TNT).

O trabalho realizado por Cerná *et al.* (1997) utilizou-se de ensaios com *Salmonella typhimurium* a fim de verificar a mutagenicidade urinária como um biomarcador de exposição ambiental. Nesse estudo, foi efetuada a comparação entre mulheres que trabalhavam fora de casa e residiam na cidade de Téplice (Norte da Bohemia - República Tcheca), com níveis altos de poluição ambiental, com mulheres que trabalhavam fora e residiam na cidade de Prachatice (Sul da Bohemia), com baixos níveis de poluição. Verificou-se que a sensibilidade da linhagem TA98 foi insuficiente para determinar baixos níveis de compostos mutagênicos na urina. Ao contrário, o uso da linhagem YG1041, que apresenta níveis elevados de nitrorredutase e O-acetiltransferase permitiu identificar um aumento no número médio de revertentes induzidos, cerca de uma ordem de diferença, quando comparado com os resultados obtidos com a linhagem TA98.

Em nosso trabalho utilizamos a linhagem YG1024 que apresenta níveis elevados apenas para a O-acetiltransferase. Apesar de não podermos fazer uma comparação direta com os resultados descritos por Cerná *et al.* (1997), a linhagem YG1024 também mostrou uma diferença significativa quando comparada com a TA98.

Outros estudos também avaliaram a mutagenicidade urinária de indivíduos expostos à diferentes situações ocupacionais, utilizando as mesmas linhagens usadas neste trabalho.

O estudo realizado por Yin *et al.* (1998) avaliou a mutagenicidade urinária dos indivíduos expostos à produtos da combustão de gás de petróleo liqüefeito, usando as linhagens TA98, YG1021 e YG1024. Embora tenham encontrado resposta positiva nas três linhagens na presença de ativação metabólica, a potência mutagênica das amostras de urina dos indivíduos expostos foi sete vezes maior na YG1024 do que na TA98, mostrando porém uma diferença menor para as mesmas amostras quando da comparação entre a YG1021 e a TA98.

Bos *et al.* (1989) realizaram um estudo utilizando a linhagem TA98, na presença de ativação metabólica, com a finalidade de verificar tanto a mutagenicidade urinária dos trabalhadores de uma fábrica de recauchutagem de pneus quanto a mutagenicidade das amostras de poeira dos vários departamentos da fábrica. Esses pesquisadores puderam constatar que as amostras de urina coletadas no quinto dia da semana mostraram maior mutagenicidade urinária do que aquelas coletadas no domingo, sugerindo desse modo, exposição ocupacional à substâncias mutagênicas. Quanto às amostras ambientais dos vários departamentos, essas também mostraram propriedades mutagênicas.

O estudo de Mielzynska *et al.* (1997) avaliou a exposição dos trabalhadores de forno de carvão de coque à HAPs utilizando, além de outros biomarcadores, a mutagenicidade urinária através do teste de Ames com a linhagem TA98 e observaram que as amostras de urina do grupo exposto, na presença de ativação metabólica, apresentaram maior mutagenicidade quando comparada com a amostra do grupo controle, embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa.

Choi *et al.* (1995), em um estudo caso-controle, avaliaram a mutagenicidade urinária de 37 pacientes (19 com câncer de bexiga e 18 controles) através do teste de Ames usando a linhagem YG1024 com a finalidade de detectar exposição ocupacional perigosa e/ou casos de cânceres de bexiga e verificaram mutagenicidade urinária positiva em 52% dos indivíduos com exposição ocupacional perigosa contra 22% dos indivíduos não expostos. Além disso, também encontraram associação de casos de cânceres de bexiga com exposição ocupacional perigosa.

No que se refere aos resultados obtidos na ausência de ativação metabólica as razões de mutagenicidade foram maiores para as amostras do grupo exposto nas três linhagens principalmente nas últimas doses (Tabela 8 e Figura 11). Com relação Figura 10 observamos que o número médio de revertentes induzidos é praticamente o mesmo nos dois grupos, nas linhagens TA98 e YG1024, mantendo-se constantes com o aumento das doses. Já para a linhagem YG1021



esse número foi maior na amostra da urina dos cortadores de cana, com uma diferença estatisticamente significativa quando comparada a do controle (valor $p < 0.001$), sem entretanto apresentar um efeito dose-resposta, indicando a prevalência de alguns compostos nitroarenos na urina dos indivíduos expostos. Além disso, a urina dos cortadores de cana não mostrou-se mutagênica nas três linhagens analisadas (Figuras 10 e 11 e Tabela 7), o que condiz com o resultado obtido por De Flora *et al.* (1995) que na ausência de metabolização e utilizando a mesma metodologia de concentração com a urina de fumantes, não observou mutagenicidade mesmo com as linhagens que superproduzem nitrorredutase e O-acetiltransferase.

Além da presença dos HAPs, os nitro-HAPs também estão amplamente distribuídos, como resultado do processo de combustão incompleta. Esse fato é sustentado pela descoberta da mutagenicidade de ação direta nas amostras de ar da cidade de Téplice, localizada em uma área poluída por combustão de carvão (Watts *et al.*, 1994). Portanto, é bem possível que os nitro derivados sejam os responsáveis pelo maior número de revertentes induzidos na amostra do grupo exposto quando essa foi avaliada com a linhagem YG1021 na ausência de ativação metabólica, uma vez que os nitroarenos são reconhecidos como potentes mutagênicos bacterianos (Rosenkranz e Mermelstein, 1983).

O teste de mutagenicidade urinária, como qualquer teste de urina, pode detectar apenas exposição muito recente. Por exemplo, Choi *et al.* (1995), não encontraram associação entre níveis de compostos mutagênicos urinários relacionados à exposição ocupacional com histórias anteriores, sabidamente de alto risco para o desenvolvimento de câncer de bexiga. Esse fato é compreensível já que a exposição ocupacional de 10 a 20 anos atrás não pode afetar a mutagenicidade da urina no presente. Por outro lado, esse mesmo trabalho mostra que o teste de mutagenicidade urinária não é sensível o suficiente para detectar variações de um dia para o outro, já que não foi encontrada diferença estatisticamente significativa no nível de mutagenicidade entre as amostras coletadas no trabalho e em casa, sendo que o intervalo entre uma coleta

e outra foi de 24 horas e esse tempo mostrou-se insuficiente para diminuir a atividade mutagênica urinária. Bos *et al.* (1989) relataram uma maior mutagenicidade nas amostras de urina, dos trabalhadores de uma fábrica de borracha, coletadas na terça feira em comparação com a de domingo, todavia eles não testaram a significância da diferença.

Dessa maneira, fica claro que o horário da coleta da urina do presente estudo não interferiu no resultado obtido, uma vez que as amostras não puderam ser coletadas no canavial, condição imposta pelos cortadores de cana que só se propuseram à colaborar sigilosamente, pelo medo de perderem o emprego. A solução encontrada foi realizar a coleta em três dias, logo após o término do trabalho, que se dava por volta das 16 horas prosseguindo-se até a noite, pois os trabalhadores teriam ficado expostos o dia todo no canavial. Esse tempo foi suficiente para coletar o volume adequado (variando de um a dois litros) para se determinar consistentemente a mutagenicidade urinária, já que obviamente quanto mais longa a coleta uma maior quantidade de compostos mutagênicos é esperado. Visto que a mutagenicidade da urina de fumantes coletada no final da tarde foi maior que aquela da manhã seguinte, demonstrando que parece existir muito menos atividade mutagênica na urina após o intervalo de 6 a 8 h de sono (Yamasaki e Ames, 1977, Kado *et al.* 1985).

A fim de resolver o problema da preservação das amostras, cada participante conservaram-nas em refrigerador em casa e essas foram transportadas em caixas térmicas contendo bolsas de gelo.

Devido ao fato da maioria dos compostos mutagênicos e ou carcinogênicos ser provavelmente eficaz em penetrar na membrana celular, eles tendem a ser não polares a menos que sejam absorvidos por sistema de transporte específico. Desse modo, o uso da resina XAD-2 é particularmente conveniente por causa da sua eficácia em adsorver compostos relativamente não polares da urina enquanto impede a passagem da histidina (Yamasaki e Ames, 1977). Doolittle *et al.* (1989) também demonstraram que a extração utilizando essa resina proporciona concentrações baixas de histidina nos extratos urinários.



concentração essa que não interfere na viabilidade do ensaio de modo a se obter um resultado falso positivo. Portanto, essa resina ainda é a mais comumente usada para adsorver os compostos mutagênicos urinários (Connor *et al.*, 1983, Kado *et al.*, 1985, Smith *et al.*, 1996, Granella *et al.*, 1996, Mielzynska *et al.*, 1997, Yin *et al.*, 1998). Einistö *et al.* (1990) utilizaram o procedimento com a raion azul (que adsorve eficientemente compostos com dois ou mais anéis aromáticos) para concentrar amostras de urina e observaram que o aumento da sensibilidade entre as linhagens YG1024 e TA98 foi semelhante ao aumento observado por De Flora *et al.* (1995) que utilizaram a resina XAD-2, confirmando assim, a validação do estudo em questão.

Além disso, uma outra validação do presente estudo foi a utilização das três linhagens que abrangem uma ampla variedade de compostos químicos mutagênicos (Watanabe *et al.*, 1989, 1990) conforme já mencionado. Todavia, tanto o tabagismo quanto o hábito alimentar são considerados confundidores quando a mutagenicidade urinária é usada como um biomarcador interno de exposição ocupacional, uma vez que a contribuição da dieta e da fumaça do cigarro já está bem estabelecida com relação à atividade mutagênica urinária (Yamasaki e Ames, 1977, Baker *et al.*, 1982, Sasson *et al.*, 1985, Sousa *et al.*, 1985, Doolittle *et al.*, 1989, Scherer *et al.*, 1996, Kuenemann-Migeot *et al.*, 1997). Por essa razão, a alimentação foi questionada e os tabagistas foram eliminados da amostra.

Uma variabilidade interindividual foi observada principalmente nas amostras do grupo exposto nas linhagens TA98 e YG1024 na presença de ativação metabólica (Figuras 12 a 16 e apêndice). Esse fato também foi observado por Cerná *et al.* (1997). Essas diferenças interindividuais poderiam ter sido causadas pelas diferentes diluições da urina, uma vez que fatores de correção, tal como a concentração de creatinina, não foram usados, observação também feita por Einistö *et al.* (1990). Essa possibilidade pode ser desprezada, dado que os resultados dos indivíduos do grupo controle mostraram uma variabilidade bem menor tanto na presença quanto ausência de ativação



metabólica (Figuras 12 a 17). Portanto, essas diferenças podem ser explicadas pelos fatores genéticos e ambientais assim como pelo estilo de vida. Os processos de ativação e destoxificação metabólica são cruciais na suscetibilidade individual na exposição de carcinógenos genotóxicos e influenciam a excreção de compostos mutagênicos na urina (Cerná *et al.*, 1997), dado que grande parte dessas substâncias não é prejudicial da maneira que estão presentes no ambiente.

O metabolismo desses compostos é essencial na resposta do organismo à exposição e, certamente, o desequilíbrio no balanço entre os processos de ativação e destoxificação podem explicar as variações individuais nas respostas à exposição aos agentes carcinogênicos (Hirvonen, 1995). Assim, a variação interindividual na resposta à agentes xenobióticos e seus efeitos carcinogênicos potenciais é mediada pela predisposição herdada (Shields, 1994), mostrando que a quantidade de carcinógenos finais produzida, depende da ação competitiva entre os mecanismos de ativação e destoxificação, que envolve as enzimas do citocromo P-450 (CYPs) e as glutathione-S-transferases (GSTs) (Mannervik *et al.*, 1992). A existência de variação na população humana quanto à produção de enzimas que ativam a formação de metabólitos eletrofilicos que têm ligação covalente com o DNA ou que catalisam a destoxificação de carcinógenos químicos já foi estabelecida (Harris, 1989). Várias enzimas do citocromo P450, responsáveis pela ativação metabólica de carcinógenos e cujo código genético foi identificado como polimórfico e ligado ao risco de câncer expressam ampla variação interindividual. (Shields, 1994)

Desse modo, alguns indivíduos podem apresentar risco significativamente maior de câncer quimicamente induzido do que a média populacional devido às diferenças expressivas nos processos de ativação e destoxificação. Em pacientes tratados topicamente com unguento contendo 2% de alcatrão de carvão, os valores da mutagenicidade urinária naqueles com genótipo GSTM1 nulo foram em média maior que daqueles com genótipo GSTM1 positivo (Gabbani, *et al.*, 1999). Assim, os indivíduos com GST deficiente podem apresentar risco aumentado em desenvolver neoplasias, pois apresentam deficiência em seus

processos de destoxificação. Hirvonen *et al.* 1994 demonstraram a dependência da mutagenicidade urinária de fumantes relacionada ao genótipo da GST, uma vez que indivíduos fumantes GSTM1 nulo apresentaram urina mais mutagênica que indivíduos GSTM1 positivo, dado que esse genótipo é importante na destoxificação de vários mutagênicos e/ou carcinogênicos, incluindo os HAPs. A partir disso, fica evidente que esses fatores colaboraram com a variabilidade interindividual observada no presente estudo.

5.2 - Atividade Mutagênica da Fuligem Sedimentável da Cana-de-Açúcar

A utilização de ensaios *in vitro* sensíveis na detecção de compostos mutagênicos, tal como o teste de *Salmonella*/microsomo de mamíferos tornou possível a avaliação de compostos mutagênicos presentes no ambiente que contribuem para o câncer e defeitos genéticos de nascimento. Uma maneira de avaliação é testar as misturas complexas que uma população ingere, inala ou absorve através da pele, principalmente aquela população profissionalmente exposta à misturas complexas perigosas (Yamasaki e Ames, 1977).

Com esse objetivo, a atividade mutagênica dos compostos orgânicos da fuligem sedimentável da queima da cana-de-açúcar foi avaliada através de ensaios de mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* usando as linhagens TA98, YG1024 e YG1021 tanto na presença quanto ausência de ativação metabólica. Para a avaliação da mutagenicidade dos compostos adsorvidos ao material particulado da fuligem foram utilizados dois métodos clássicos de extração que incluem a ultrassonicação e o soxhlet, usando-se diclorometano/metanol (DCM:MeOH / 4:1) e tolueno, respectivamente como agentes extratores. Zamperlini (1997) no estudo da fuligem sedimentável da queima da cana-de-açúcar, por técnicas cromatográficas e espectrofotométricas, verificou que dentre os métodos de extração o ultrassom mostrou-se ineficiente, exceto com o tolueno como solvente, que recuperou a maioria dos HAPs e em



maior quantidade, uma vez que esse solvente é estruturalmente semelhante aos HAPs, isto é, apresentam em sua conformação vários elétrons π (π). Além disso, observou-se que aumentando a polaridade do solvente através da combinação DCM:MeOH (4:1), houve uma melhora em relação ao DCM puro de tal modo que a extração com DCM:MeOH (4:1) favoreceu a recuperação dos HAPs, principalmente fluoranteno e pireno. A extração via soxhlet, mostrou-se mais eficiente que a ultrassonicação, com o solvente DCM:MeOH (4:1), extraindo mais substâncias da fuligem e proporcionando maior recuperação dos HAPs.

O presente estudo foi realizado utilizando-se os dois procedimentos de extração, ultrassom com o agente extrator DCM:MeOH (4:1) e soxhlet com o agente extrator tolueno, uma vez que esse solvente aumentou a seletividade dos poliaromáticos e o soxhlet foi o melhor método de recuperação dos mesmos.

Os resultados do teste de Ames com os extratos da fuligem sedimentável tanto por extração ultrassônica (Figuras 18 A, B e C e Tabela 10) quanto por soxhlet (Figuras 19 A, B e C e Tabela 11) mostraram resposta positiva com relação as três linhagens (TA98, YG1024 e YG1021) quando foram testados com ativação metabólica. O número médio de revertentes induzidos foi significativamente maior (valor $p < 0,001$) na linhagem YG1024. Esse resultado é similar ao obtido quando a urina dos cortadores de cana foi testada na presença de metabolização (Figura 8B). Além disso, esses resultados são condizentes com o resultado obtido por Stamm *et al.* (1994) no extrato nitrosado (extraído com DCM puro) da fuligem do carvão, coletada no município de Harrison (West Viginia - EUA). Esses autores sugeriram a existência de aminas aromáticas uma vez que o extrato mostrou atividade mutagênica consideravelmente maior na linhagem YG1024 na presença de ativação metabólica.

Ademais, Miguel *et al.* (1990) no estudo da mutagenicidade das frações orgânicas de material particulado de ar coletado na cidade do Rio de Janeiro, Brasil; Camden, Nova Jersey e Túnel Caldecott, Califórnia, extraídas sequencialmente com ciclohexano, acetona e DCM por soxhlet, mostraram com

relação a cidade do Rio de Janeiro que a fração de DCM apresentou maior atividade mutagênica específica na presença de metabolização utilizando a linhagem TA98.

Já o trabalho de Cerná *et al.* (1999), que avaliou a mutagenicidade do material particulado do ar na República Tcheca, extraído por DCM puro, revelou uma diminuição da mutagenicidade na linhagem YG1041 que apresenta níveis elevados de O-acetiltransferase e nitrorredutase quando em presença de ativação metabólica, embora, o número de revertentes/ μg foi maior para a YG1041 quando comparada a TA98.

Os resultados do presente trabalho sugerem a prevalência na fuligem de compostos de ação indireta que causam alteração na matriz de leitura devido a resposta positiva na TA98, tais como os HAPs. Além disso, a mutagenicidade observada nos extratos quando testados com as linhagens YG, sugere a presença de nitroarenos e aminas aromáticas. Apesar do estudo de Shah *et al.* (1991) ter mostrado que a mutagenicidade dos compostos nitro-aromáticos é geralmente reduzida pela presença da fração S9, Rosser *et al.* (1996) revelaram que os metabólitos do 1-nitropireno apresentaram mutagenicidade tanto por ação direta quanto dependente da fração S9, dado que o 1-nitropireno-3-ol foi mais mutagênico na ausência de metabolização enquanto que o 1-nitropireno-4-ol, 1-nitropireno-6-ol e 1-nitropireno-8-ol necessitaram de ativação metabólica para a expressão máxima da mutagenicidade.

Todavia, a resposta mutagênica dos nitro-, nitroso- e N-hidroxilamino-arenos testados com a linhagem TA98/1,8-DNP₆ (resistente ao 1,6-dinitropireno e 1,8-dinitropireno, deficientes em nitrorredutases e O-acetiltransferase) mostrou um decréscimo notável com relação a TA98 (McCoy *et al.*, 1983). As respostas mutagênicas de todas as amostras de ar da região metropolitana de São Paulo e área industrial de Cubatão, analisadas com as linhagens TA98/1,8-DNP₆ e TA98NR (resistente ao 1-nitropireno e deficiente em nitrorredutases), mostraram um decréscimo substancial, quando comparadas com a linhagem TA98 parental (Sato *et al.*, 1995). Os extratos de material particulado transportados pelo ar da



cidade de Porto Alegre, Brasil, mostraram um decréscimo de 61 a 91% em sua atividade mutagênica quando foram analisados com as linhagens TA98NR e TA98/1.8-DNP₆ em comparação com a TA98 (Vargas *et al.* 1998). Desse modo, esses resultados indicam a importância da atividade enzimática nas linhagens utilizadas para análise de material particulado.

Os resultados do teste de Ames dos extratos da fuligem extraídos tanto por ultrassonicação (Figura 18 A, B e C e Tabela 10) quanto por soxhlet (Figura 19 A, B e C e Tabela 11) e testados na ausência de ativação metabólica mostraram respostas similares. O extrato da fuligem extraído por ultrassonicação mostrou atividade mutagênica apenas na linhagem YG1024, apresentando ausência de mutagenicidade na YG1021 e indício de mutagenicidade na TA98. O extrato soxhlet, nas mesmas condições, também foi mutagênico para a linhagem YG1024, mostrou indício de mutagenicidade para a TA98 e ausência de mutagenicidade para a YG1021. Esses resultados confirmam a presença de aminas aromáticas na fuligem da cana o que pode ser inferido pela resposta positiva na linhagem YG1024. A resposta negativa na linhagem YG1021, nessas condições, indica a não atuação de alguns nitroarenos, uma vez que essa linhagem é altamente sensível em detectar a mutagenicidade desses compostos. Entretanto, os mesmos podem estar presentes no extrato bruto da fuligem, mas não exercerem o efeito em virtude de poder ter ocorrido interações entre os anéis aromáticos dos HAPs e dos nitro-HAPs ocasionando a supressão da atividade da nitrorredutase. Os HAPs foram considerados por Hayakawa *et al.* (1997) como possíveis supressores do efeito dos nitro-HAPs no extrato bruto do material particulado da exaustão do diesel, quando testado sem metabolização, visto que nesse estudo a atividade total do extrato fracionado por coluna cromatográfica de sílica-gel mostrou-se aproximadamente quatro vezes maior que a do extrato bruto. Ademais, as consequências dessas interações dificilmente podem ser preditas e depende das interações físico-químicas, bem como dos mecanismos de competição entre os componentes individuais da mistura complexa, de modo que, apenas para exemplificar, os compostos mutagênicos indiretos B(a)P e 2-



aminofluoreno perdem sua potência mutagênica quando misturados com extratos de óleo cru derivados do carvão vegetal (Haugen e Peak, 1983, De Flora *et al.*, 1989).

A ausência de mutagenicidade na YG1021, uma linhagem que foi utilizada por ser mais eficiente em detectar alguns nitroarenos mutagênicos, já que promove a nitrorredução, pode ser devida a sua menor sensibilidade à compostos já reduzidos que possam estar presentes na fuligem (Fracasso *et al.*, 1999).

Stamm *et al.* (1994), encontraram uma atividade mutagênica no extrato nitrosado da fuligem do carvão do Novo México e West Virginia, USA, quatro vezes maior na YG1024 do que na TA98 quando na ausência de metabolização mostrando-se concordante com o trabalho de Houk *et al.* (1992) que estudou as amostras de ar, extraídas por DCM puro, coletadas na cidade de Tokyo, Japão. O estudo de Hayakawa *et al.* (1995) realizado com o material particulado transportado pelo ar do centro comercial da cidade de Kanazawa, Japão, também mostrou uma maior mutagenicidade na linhagem YG1024 que na TA98. Realmente, os resultados obtidos com o extrato da fuligem da cana na ausência de metabolização mostrou uma similaridade com os resultados desses autores, dado que tanto pela extração por ultrassonicação quanto por soxhlet os extratos da fuligem mostraram mutagenicidade na linhagem YG1024 e indício de atividade mutagênica na TA98. É importante lembrar que após a extração pelo solvente, os extratos obtidos são misturas complexas que certamente estão sujeitas à interações sinérgicas e antagonísticas entre os diferentes compostos (Miguel *et al.*, 1990, Vargas *et al.*, 1998).

A observação das Figuras 18 e 19 e Tabelas 9 e 11 levando-se em consideração as duas metodologias de extração, mostra ser necessário doses maiores do extrato ultrassônico para se obter curvas dose-resposta quando se compara com as doses necessárias do extrato soxhlet. Essa diferença pode ser atribuída ao procedimento soxhlet-tolueno, uma vez que de acordo com Zamperlini (1997) reuniu-se o solvente que mais aumentou a seletividade dos



HAPs e o equipamento que recuperou a maioria e a maior quantidade desses compostos. Além disso, foi o procedimento em que se obteve a maior quantidade de MOE de acordo com os experimentos do presente estudo. Ademais, essa recuperação pode ser estendida para os compostos nitroarenos e aminas aromáticas, pois apesar deles não terem sido investigados por Zamperlini (1997), a linhagem YG1024 em presença de ativação metabólica foi a que obteve melhor resposta na fuligem da cana e é uma linhagem que se mostra sensível as aminas aromáticas e nitroarenos, não podendo esquecer que a combustão incompleta de matéria orgânica leva a formação de uma fuligem contendo esses compostos (Stamm *et al.* 1994).

Löfroth *et al.* (1988) demonstraram que a mutagenicidade do ar interno de áreas públicas, provavelmente atribuída à fumaça de cigarro, é muito maior que a do ar livre. Além disso, foi calculado que um indivíduo que respira por um ano o ar de uma área poluída, tal como Los Angeles, inala a mesma quantidade de material queimado que um fumante pelo consumo de dois maços de cigarro por dia (Ames, 1983). Claramente a influência do hábito de fumar e outras exposições internas complicam a avaliação epidemiológica do impacto da poluição atmosférica na etiologia do câncer de pulmão. Na verdade, após algumas avaliações atribuiu-se uma responsabilidade de 5-10% da poluição ambiental em cânceres do trato respiratório (De Flora *et al.*, 1989).

Portanto, a inferência da capacidade mutagênica dos compostos bio-ativos presentes na fuligem da queima da cana-de-açúcar baseando-se em ensaios de mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium*, aliado ao estudo químico realizado por Zamperlini (1997), tem um papel importante em alertar as autoridades governamentais acerca do perigo que os mesmos representam ao ambiente, atingindo principalmente os cortadores de cana.



6 - CONCLUSÕES

Esse estudo confirma que a urina analisada dos cortadores de cana, através do teste de Ames, é um biomarcador de exposição interna útil para avaliação da exposição à compostos mutagênicos, provenientes da combustão incompleta de matéria orgânica, tais como a queima dos canaviais. Do mesmo modo, caracteriza-se como ferramenta para a detecção de compostos danosos à saúde, antes mesmo de uma possível manifestação clínica. Assim, infere-se que os maiores índices de mutagenicidade (RM) nas amostras do grupo exposto (Tabela 5 e Figura 9) e as maiores médias de revertentes induzidos obtidas nas amostras de urina dos cortadores de cana, comparadas com as menores médias nas amostras controle, principalmente na presença de ativação metabólica (Figuras 12 a 16), foram causadas pela exposição profissional.

Além disso, conclui-se que a fuligem sedimentável da cana foi mutagênica nas três linhagens utilizadas, quando na presença de ativação metabólica. Na ausência de metabolização, observou-se resposta negativa apenas para a linhagem YG1021. Esses resultados indicam a presença na fuligem, dos compostos danosos ao DNA, como os HAPs, aminas aromáticas e nitro-HAPs.

Este trabalho reforça, portanto, o alerta sobre o perigo das queimadas dos canaviais para o meio ambiente, bem como para os indivíduos profissionalmente expostos.

Ademais, pode-se também concluir que a linhagem YG1024 é a mais indicada para o monitoramento biológico e avaliação da mutagenicidade, uma vez que ela se mostrou mais sensível ao material particulado originado da queima de matéria orgânica.

7 - RESUMO

Anualmente, na época da colheita da cana-de-açúcar, que se estende de maio a novembro, costuma-se queimar previamente a plantação para facilitar o corte, resultando dessa operação uma fuligem que tem sido apontada como responsável pelo aumento de problemas respiratórios na população exposta. Na verdade, não existe informação sobre a atividade biológica e o eventual prejuízo dessa fuligem à saúde e ao meio ambiente. Desse modo, este estudo avaliou a atividade mutagênica da fuligem sedimentável liberada na queima dos canaviais, bem como da urina dos cortadores de cana-de-açúcar, através de ensaios com mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames), utilizando-se a metodologia de pré-incubação e as linhagens TA98 e suas derivadas YG1021 e YG1024, superprodutoras de nitrorredutase e O-acetiltransferase, respectivamente, em presença e ausência de ativação metabólica. Os extratos da fuligem foram obtidos por duas metodologias que incluem ultrasonicação e soxhlet, usando-se os solventes diclorometano/metanol (4:1) e tolueno, respectivamente. Para a extração e concentração dos compostos da urina usou-se a resina XAD-2 e acetona como solvente. Os dados obtidos revelaram que a fuligem foi mutagênica nas três linhagens na presença de ativação metabólica, com resposta negativa apenas para a linhagem YG1021 sem ativação, indicando realmente a presença de compostos danosos ao DNA, como os HAPs, aminas aromáticas e nitro-HAPs. Observou-se indícios de atividade mutagênica para as amostras de urina dos cortadores de cana, na linhagem YG1024 na presença de ativação metabólica, uma vez que ocorreu o efeito dose-resposta. Ademais, o número médio de revertentes nas amostras do grupo exposto foi maior quando comparado ao controle, sugerindo que esse aumento foi causado pela exposição ocupacional. Essa resposta confirma a prevalência na urina dos cortadores de cana dos compostos mutagênicos presentes na fuligem. Desse modo, concluímos que a análise da mutagenicidade urinária dos trabalhadores expostos é uma ferramenta útil para avaliar a exposição à compostos mutagênicos provenientes



da queima dos canaviais, colaborando com a identificação de compostos danosos antes mesmo de uma possível manifestação clínica. Além disso, também foi possível mostrar que a linhagem YG1024 é a mais indicada para o monitoramento biológico e avaliação da mutagenicidade de material particulado originado da queima de matéria orgânica.



8 - SUMMARY

Annually, before the sugar-cane harvest, between May to November, the leaves are burnt in order to make the process of harvesting easier. This burning leads to production of soot that has been responsible for the increased respiratory problem in the exposed workers. Indeed, there is lack of information concerning the biologic activity and its possible harm to health and to the environment. This study evaluated the mutagenic activity of sedimented soot released during the sugar-cane burning and in the exposed workers urine using Ames *Salmonella* assay through strains TA98 and its derivatives YG1021 and YG1024 with higher levels of nitroreductase and O-acetyltransferase, respectively, with and without metabolic activation (S9 mix fraction). Samples were extracted by two methodologies, ultrasonication and soxhlet using the solvents dichloromethane/methanol (4:1) and toluene, respectively. Urinary organics were extracted by XAD-2 resin and acetone solvent. Our results showed that the soot was mutagenic in the three strains with metabolic activation and showed negative response only with the strain YG1021 without activation, indicating the presence of DNA harmful metabolites as polycyclic aromatic hidrocarbons (PAHs), aromatic amines and nitro-PAHs. The urine samples of exposed workers showed indication of mutagenic activity for YG1024 strain with metabolic activation, once it was observed a dose-response effect. Likewise, the mean number of revertants in the exposed group samples was higher in comparison to the control group, suggesting that it was induced by occupational exposure. This confirms the prevalence of mutagenic compounds present in the soot in the exposed workers urine. Furthermore, we conclude that the analysis of the urinary mutagenicity of exposed workers is a useful tool to evaluate the exposure to mutagenic compounds proceeding burning of the sugar-cane fields and elucidating a possible identification of hurtful compounds before clinical disease development. Furthermore, the use of YG1024 tester strain is most convenient for biological monitoring and evaluation of particulates found in burnt organic matter.



9 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABMANN, N., EMMRICH, M., KAMPF, G., KAISER, M. Genotoxic activity of important nitrobenzenes and nitroalines in the Ames test and their structure-activity relationship. *Mutat. Res.*, v.395, p.139-44, 1997
- ACORDO restringe queimadas de cana na região de Araraquara: usinas param queima de canaviais entre as 16-21 h por sugestão da justiça. *Folha de São Paulo, Folha Nordeste*. SP. 15 setembro 1994. Caderno 07, p3.
- AHLBORG, G.Jr., EINISTÖ, P., SORSA, M. Mutagenicity and metabolites in the urine of workers exposed to trinitrotoluene (TNT). *Br. J. Ind. Med.*, v.45, p.353-8, 1988.
- AMES, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. *Science*, v.221, p.1256-64, 1983.
- AMES, B. N., GOLD, L. S., WILLETT, V.C. The causes and prevention of cancer. *Proc. Natl. Acad.*, v.92, p.5258-65, 1995.
- AMES, B. N., McCANN, J., YAMASAKI, E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, v.31, p.347-64, 1975.
- ARNOTT, M.; YAMAUCHI, T., JOHNSTON, D. Aryl hydrocarbon hydroxylase in normal and cancer populations. In: GRIFFIN, C., SHAW, C. (Ed). *Carcinogens: Identification and Mechanisms of Action*. New York:Raven Press, 1979. p.145-156.
- BAKER, R., ARLAUSKAS, A., BONIN, A., ANGUS, D. Detection of mutagenic activity in human urine following fried pork or bacon meals. *Cancer Lett.*, v.16, p.81-9, 1982.
- BELAND, F.A., KADUBLAR, F.F. Metabolic activation and DNA adducts of aromatic amines and nitroaromatic hidrocarbons. In: COOPER, C.S., GROVER, P.L. (Ed.). *Handbook of Experimental Pharmacology: Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis*. Heidelberg: Springer-Verlag, 1990. p.267-325.



- BENET, L.Z., SHEINER, L.B. Farmacocinética: A dinâmica da absorção, da distribuição e da eliminação das drogas. In: GILMAN, A.G., GOODMAN, L.S., RALL, T.W., MURAD, F. (Ed.). *As bases farmacológicas da terapêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. p.2-22.
- BOS, R.P., KROMHOUT, H., IKINK, H., HAAN, W., KOPPEJAN, J., THEUWS, J.L.G. Mutagens in urine of non-smoking and smoking workers in an aircraft tyre retreading plant. Skin exposure as a casual factor? *Mutat. Res.*, v.223, p.41-8, 1989
- BOTKIN, D., KELLER, E. A. Earth as living planet. In:---. *Environmental Science*. New York: John Wiley - Sons, 1995.
- CALAMARI, D. Advances in prediction of exposure for organic chemical. *Toxicol. Lett.*, v.64-65, p.519-25, 1992.
- CAMARGO, J.L.V. Carcinogênese. In:---. *Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e critérios de avaliação*. Brasil: SBG, 1991. p.177-92.
- CANELLA, K., PELTONEN, K., DIPPLE, A. Identification of (+) and (-) anti benzo(a) pyrene dihydrodiol epoxide-nucleic acid adducts by the 32 P-postlabeling assay. *Carcinogenesis*, v.12, p. 1826-31, 1991.
- CERNÁ, M., PASTORKOVÁ, A., MYERS, R.S., RÖSSNER, P., BINKOVÁ, B. The use of a urine mutagenicity assay in the monitoring of environmental exposure to genotoxins. *Mutat. Res.*, v.391, p.99-101, 1997.
- CERNÁ, M., PASTORKOVÁ, A., SMÍD, J., BAVOROVÁ, H., OCADLÍKOVÁ, D., RÖSSNER, P., ZAVADIL, J. Genotoxicity of industrial effluents, river waters, and their fractions using the Ames test and *in vitro* cytogenetic assay. *Toxicol. Letters*, v.88, p.191-7, 1996.
- CERNÁ, M., PASTORKOVÁ, A., VRBÍKOVÁ, V., SMÍD, J., RÖSSNER, P. Mutagenicity monitoring of airborne particulate matter (PM10) in the Czech Republic. *Mutat. Res.*, v.444, p.373-86, 1999.
- CETESB espera reduzir 20% queimadas em 96. *Folha de São Paulo, Folha Nordeste*, SP, 11 junho 1996b. Caderno 05, p5.



- CETESB lança plano contra queimada de cana. *Folha de São Paulo, Folha Nordeste*, SP, 27 março 1996a. Caderno 06, p1.
- CHOI, B.C..K., CONNOLLY, J.G., ZHOU, R.H. Application of urinary mutagen testing to detect workplace hazardous exposure and bladder cancer. *Mutat. Res.*, v.341, p.207-16, 1995.
- CHORAZY M., SZELIGA, J., STROZYK, M., CIMANDER, B. Ambient air pollutants in upper Silesia: partial chemical composition and biological activity. *Environ. Health Perspect.*, v. 4, Suppl. 102. p.61-6, 1994.
- CHRISP, C. E., FISHER, G.L. Mutagenicity of airborne particles. *Mutat. Res.*, v.76, p.143-64, 1980.
- CHRISP, C. E., FISHER, G.L., LAMMERT, J.E. Mutagenicity of filtrates from respirable coal fly ash. *Science*, v.199, p.73-5, 1978.
- CICERONE, R. J. Fires, atmospheric chemistry, and the ozone layer. *Science*, v.263, n.4, p.1243-44, 1994.
- CLIMA e poluição aumentam em 80% os problemas respiratórios no PS. *O Imparcial*, Araraquara, 22 junho 1994, p.3.
- CLONFERO, E., GRANELLA, M., MARCHIORO, M., LEOPARDI BARRA, E., NARDINI, B., FERRI, G., FOÀ, V. Urinary excretion of mutagens in coke over workers. *Carcinogenesis*, v.16, p.547-54, 1995.
- COHEN, L.A. Diet and Cancer. *Sci. Am.*, v.257, p.42-8, 1987.
- CONNOR, T.H., SADAGOPA RAMANUJAM, V.M., WARD, J.B. LEGATOR, M.S. The identification and characterization of a urinary mutagen resulting from cigarette smoke. *Mutat. Res.*, v.113, p.161-72, 1983.
- CORRÊA, C. TJ Cassa Liminar que Proíbe Queimada de Cana: Sentença não permite recurso da Promotoria do Meio Ambiente; decisão depende de julgamento do mérito. *Folha de São Paulo, Folha Nordeste*, SP, 04 abril 1996. Caderno5, p1.
- COSTA, E.A. Veto à queimada eleva custo de usina. *Gazeta Mercantil*, SP, 29 setembro 1997. Caderno C, p.7.



- CRUTZEN, P. J., ANDRAE, M.O. Biomass burning in the tropics: Impact on atmospheric chemistry and biogeochemical cycles. *Science*, v.250, n.21, p.1669-78, 1990.
- CRUTZEN, P. J., HEIDT, L. E., KRANEC, J. P., POLLOCK, W. H., SEILER, W. Biomass burning as a source of atmospheric C), H₂, N₂O, NO, CH₃Cl and COS. *Nature*, v.282, n.15, p.253-256, 1979.
- DAVIDSON, B. J., HSU, T. C., SCHANTZ, S.P. The genetics of tobacco-induced malignancy. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, v.199, p.198-205, 1993.
- De FLORA, S., BAGNASCO, M., IZZOTTI, A., D'AGOSTINI, F., PALA, M., VALERIO, F. Mutagenicity of polycyclic aromatic hydrocarbon fractions extracted from urban air particulates. *Mutat. Res.*, v.224, p.305-18, 1989.
- De FLORA, S., BALANSKY, R., GASPARINI, L., CAMOIRANO, A. Bacterial mutagenicity of cigarette smoke and its interaction with ethanol. *Mutagenesis*, v.10, p.47-52, 1995.
- DECRETO elimina queima de cana. *Jornal de Araraquara*, Araraquara, 17 agosto 1997, p.6.
- DELCLOS, K.B., MANJANATHA, M.G., LI, E.E., NEWTON, R.K. and others. 32P- postlabelling in studies of arylamine and nitroaromatic hydrocarbon activation and mutagenesis. *IARC Sci. Publ.*, v.124, p.79-86, 1993.
- DeMARINI, D.M., BROOKS, L.R., BHATNAGAR, V.K., HAYES, R. B., EISCHEN, B.T., SHELTON, M.L., ZENSER, T.V., TALASKA, G., KASHYAP, S.K., DOSEMECI, M., KASHYAP, R., PARIKH, D.J., LAKSHMI, V., HSU, F., DAVIS, B.B., JAEGER, M., ROTHMAN, N. Urinary mutagenicity as a biomarker in workers exposed to benzidine: correlation with urinary metabolites and urothelial DNA adducts. *Carcinogenesis*, v.18, p.981-88, 1997.
- DEPORTES, I., GUYOD, J. ZMIROU, D. Hazard to man and the environment posed by the use of urban waste compost: a review. *The Sci. of the Total Environ.*, v. 172, p. 197-222, 1995.



- DIPPLE, A., CHAUCHENG, S., BIGGER, A. Polycyclic aromatic hydrocarbon carcinogens. *Mutag. and Carcinog. in the Diet*, p.109-27, 1990
- DIPPLE, A., MOSCHEL, R. Chemistry of DNA alkylation and aralkylation. *Mutat. and the Environ.* p.71-80, 1990.
- DOCUMENTO exclui produtos derivados de cana queimada do selo sócio-ambiental. *O Imparcial*, Araraquara, 05 junho 1998. p.3.
- DOENÇA respiratória é 2ª causa de internação: médico diz que queimada é uma das causas. *Folha Nordeste*, SP, 04 abril 1992. Caderno5, p.1.
- DOERJER, G.; BEDELL, M.A., OESCH, F. DNA adducts and their biological relevance. In: OBE, G. (Ed.). *Mutations in Man*. Berlin: Springer-Verlag., 1984. p.20-34.
- DOOLITTLE, D.J., RAHN, C.A., BURGER, G.T., DAVIS, R., DeBETHIZY, J.D., HOWARD, G., LEE, C.K., McKARNS, S.C., RICCIO, E., ROBINSON, J., REYNOLDS, J., HAYES, A.W. Human urine mutagenicity study comparing cigarettes which burn or only heat tobacco. *Mutat. Res.*, v.223, p.221-232, 1989.
- EINISTÖ, P., NOHMI, T., WATANABE, M., ISHIDATE Jr., M. Sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1024 to urine mutagenicity caused by cigarette smoking. *Mutat. Res.*, v.245, p.87-92, 1990.
- EPA-Environmental Protection Agency, Carcinogen Assessment Group Evaluation and Estimation of Potential Carcinogenic Risks of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, Cincinnati, 1988.
- ESPINOSA-AGUIRRE, J. J., TORRE, R. A., LARES-ASSEFF, I., RUBIO, J., DORADO, V., WONG, M., HERNÁNDEZ, J. M. Bacterial mutagens in the urine of patients under tinidazole treatment. *Mutat. Res.*, v.359, p.133-40, 1996.
- FALCK, K., SOUSA, M., VAINIO, H. Mutagenicity in urine of workers in rubber industry. *Mutat. Res.*, v.79, p.45-52, 1980.



- FRACASSO, M. E., FRANCESCHETTI, P., MOSSINI, E., TIEGHI, S., PERBELLINI, L., ROMEO, L. Exposure to mutagenic airborne particulate in a rubber manufacturing plant. *Mutat. Res.*, v.441, p.43-51, 1999.
- FRIEDBERG, G.C., WALKER, G.C., SIEDE, W. DNA Damage. In:---. *DNA repair and mutagenesis*. Washington: ASM Press, 1995. p.2-58.
- FULIGEM de queimadas de cana podem causar câncer diz pesquisadora da UNESP. *Folha da Cidade*, Araraquara, 14 de agosto 1997. p.1.
- GABBANI, G., PAVANELLO, S., NARDINI, B., TOGNATO, O., BORDIN, A., FORNASA, C.V., BEZZE, G., CLONFERO, E. Influence of metabolic genotype GSTM1 on levels of urinary mutagens in patients treated topically with coal tar. *Mutat. Res.*, v.440, p.27-33, 1999.
- GLOBO REPÓRTER ESPECIAL, REDE GLOBO TELEVISÃO *Documentário Terra de Engenho*, março, 1996.
- GOULART, M.P. Queimada da palha da cana e o autoritarismo do governo. *Folha de São Paulo, Folha Agrofólia*, SP, 19 agosto 1997. Caderno 05, p4.
- GOVERNO tem anteprojeto que dá prazo de vinte anos para o fim da queimada. *O Imparcial*, Araraquara, 26 maio 1998. p.5.
- GRANELLA, M., BALARIN, C., NARDINI, B., MARCHIORO, M., CLONFERO, E. Mutagenicity and contents of polycyclic aromatic hydrocarbons in new high-viscosity naphthenic oils and used and recycled mineral oils. *Mutat. Res.*, v.343., p.145-50, 1995.
- GRANELLA, M., PRIANTE, E., NARDINI, B., BONO, R., CLONFERO, E. Excretion of mutagens, nicotine and its metabolites in urine of cigarette smokers. *Mutagenesis*, v.11, p.207-11, 1996.
- HAGIWARA, Y., WATANABE, M., ODA, Y., SOFUNI, T., NOHMI, T. Specificity and sensitivity of *Salmonella typhimurium* YG1041 and YG1042 strains possessing elevated levels of both nitroreductase and acetyltransferase activity. *Mutat. Res.*, v.291, p.171-80, 1993.



- HARRIS, C.C. Interindividual variations among humans in carcinogen metabolism, DNA adduct formation and DNA repair. *Carcinogenesis*, v.10, p.1563-6, 1989.
- HATJIAN, B.A., EDWARDS, J.W., HARRISON, J., WILLIAMS, F.M., BLAIN, P.G. Ambient, biological and biological effect monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Toxicol. Lett.*, v.77, p.271-79, 1995.
- HAUGEN, D., A., PEAK, M., J. Mixtures of polycyclic aromatic compounds inhibit mutagenesis in the *Salmonella*/microsome assay by inhibition of metabolic activation. *Mutat. Res.*, v.116, p.257-69, 1983.
- HAYAKAWA, K., KAWAGUCHI, Y., MURAHASHI, T., MIYAZAKI, M. Distributions of nitropyrenes and mutagenicity in airborne particulates collected with an Andersen sampler. *Mutat. Res.*, v.348, p.57-61, 1985.
- HAYAKAWA, K., NAKAMURA, A., TERAJI, N., KIZU, R., ANDO, K. Nitroarene concentrations and direct-acting mutagenicity of diesel exhaust particulates fractionated by silica-gel column chromatography. *Chem. Pharm. Bull.*, v.45, p.1820-2, 1997.
- HEFLICH, R.H. Chemical mutagens. In: LI, A.P., HEFLICH, R.H. (Ed.). *Genetic Toxicology*. New Jersey: CRC Press, 1990. p.143-95.
- HEPP, H., SIEGMANN, K., SATTLER, K. New aspects of growth mechanisms for polycyclic aromatic hydrocarbons in diffusion flames. *Chem. Phys. Letters*, v.233, p.16-22, 1995.
- HIRVONEN, A., NYLUND, L., KOCIBA, P., HUSGAFVEL-PURSIAINEN, K., VAINIO, H. Modulation of urinary mutagenicity by genetically determined carcinogen metabolism in smokers. *Mutat. Res.*, v.15, p.813-15, 1994.
- HIRVONEN, A. Genetic factors in individual response to environmental exposures. *Joem*, v.37, p.37-43, 1995.
- HOUK, V. S., GOTO, S., ENDO, O., CLAXTON, L. D., LEWTAS, J., MATSUSHITA, H. Detection of direct-acting mutagens in ambient air: A



- comparison of two highly sensitive mutagenicity assays. *Environ. Mol. Mutagen.*, v.20, p.19-28, 1992.
- JERINA, D.M., LEHR, R.E. The bay region theory: A quantum mechanical approach to aromatic hydrocarbon-induced carcinogenicity. In: ULLRICH, V. (Ed.). *Microsomes and Drug Oxidations*. Oxford:Pergamon Press, 1977. p.709-14.
- JUIZ determina fim das queimadas de cana. *O Imparcial*, Araraquara, 05 março 1998. p.3.
- KADERLIK, K.R., KADLUBAR, F.F. Metabolic polymorphism and carcinogen-DNA adduct formation in human populations. *Pharmacogenetics*, v.5, p.108-17, 1995.
- KADO, N.Y., MANSON, C., EISENSTADT, E., HSIEH, D.P.H. The kinetics of Mutagen excretion in the urine of Cigarette smokers. *Mutat. Res.*, v.157, p.227-33, 1985.
- KIM, S.J.; JAJOO, H.K.; KIM, H.Y.; ZHOU, L.; HORTON, P.; HARRIS, C.M.; HARRIS, T.M. An efficient route to N6 deoxyadenosine adducts of diol epoxide of csrcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Bioorg. Med. Chem.*, v.3, n.6, p.811-22, 1995.
- KUENEMANN-MIGEOT, C., CALLAIS, F., MOMAS, I., FESTY, B. Urinary promutagens of smokers: comparison of concentration methods and relation to cigarette consumption. *Mutat. Res.*, v. 368, p. 141-47, 1996.
- KUENEMANN-MIGEOT, C., CALLAIS, F., MOMAS, I., FESTY, B. Use of *Salmonella typhimurium* TA98, YG1024 and YG1021 and deconjugating enzymes for evaluating the mutagenicity from smokers' urine. *Mutat. Res.*, v.390, p.283-91, 1997.
- LAMBERT, I.B., GORDON, A.J.E., GLICKMAN, B.W., Mc CALLA, D.R. The influence of local DNA sequence and DNA repair background on the mutational specificity of 1-nitroso-8-nitropyrene in *Escherichia coli*: inferences for mutagenic mechanisms. *Genetics*, v.132, p.911-27, 1992.



- LEI-SHENG, Y. Study of the carcinogenic mechanism for polycyclic aromatic hydrocarbons-extended bay region theory and its quantitative model. *Carcinogenesis*, v.6, p.1-6, 1985.
- LÉO, S. Nova lei ambiental permite punir queimadas. Juristas alertam para falhas e omissões da legislação. *Folha de São Paulo*, SP, 31 março 1998. Caderno A, p14.
- LEWIN, B. Oncogenes: gene expression and cancer. In:---. Genes V. Oxford: Oxford University Press, 1993., p.1181-228.
- LEWTAS, J., LEWIS, C., ZWEIDINGER, R., STEVENS, R., CUPITT, L. Sources of genotoxicity and cancer risk in ambient air. *Pharmacogenetics*, v. 2, n. 6, p. 288-96, 1992.
- LOBERT, J. M., SCHARFFE, D. H., HAO, W. M., CRUTZEN, P. J. Importance of biomass burning in the atmospheric budgets of nitrogen-containing gases. *Nature*, v.346, n.9, p.552-4, 1990.
- LÖFROTH, G., LING, P. I., AGURELL, E. Public exposure to environmental tobacco smoke. *Mutat. Res.*, v.202, p.103-10, 1988.
- MANNÉRIK, B., AWASTHI, Y.C., BOARD, P.G., HAYES, J.D., DILLIO, C., KETTERER, B., LITOWSKY, B., MORGENSTERN, R., MURAMATSU, M., PEARSON, W.R., PICKETT, C.B., SATO, K., WIDERSTERN, M., WOLF, C.R. Nomenclature for human glutathione transferases. *Biochem. J.*, v.282, p.305-6, 1992.
- MARON, D. M., AMES, B. N. Revised methods the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.*, v.113, p.173-245, 1983.
- McCOY, E.C., ANDERS, M., ROSENKRANZ, H.S... The basis of the insensitivity of *Salmonella typhimurium* strain TA98/1,8-DNP₆ to the mutagenic action of nitroarenes. *Mutat. Res.*, v.121, p.17-23, 1983.
- MERSCH-SUNDERMANN, V., ROSENKRANZ, H. S., KLOPMAN, G. Structural basis of the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutagenesis*, v. 7, p.211-18, 1992.



- MIELZYNSKA, D., BRASZCZYNSKA, Z., SIWINSKA, E., SMOLIK, E., BUBAK, A., SOKAL, J.A. Exposure of coke-oven workers to polycyclic aromatic hydrocarbons based on biological monitoring results. *American Industrial Hygiene Association Journal*, v.58, p.661-6, 1997.
- MIGUEL, A. G., DAISEY, J. M., SOUSA, J. A. Comparative study of the mutagenic and genotoxic activity associated with inhalable particulate matter in Rio de Janeiro air. *Environ. Mol. Mutagen.*, v.15, p.36-43, 1990.
- 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.
- MOTYKIEWICZ, G., MICHALSKA, J., PENDZICH, J., PERERA, F.P., CHORAZY, M. A cytogenetic study of men environmentally and occupationally exposed to airborne pollutants. *Mut. Res.*, v.280, p.253-59, 1992.
- MURE, K., HAYATSU, H., TAKEUCHI, T., TAKESHITA, T., MORIMOTO, K. Heavy cigarette smokers show higher mutagenicity in urine. *Mutat. Res.*, v.373, p.107-11, 1997.
- OLIVEIRA, R. Estudo da USP mostra que as internações aumentam na região de Ribeirão Preto durante o período da colheita: queimada polui o ar e agrava doenças. *Folha de São Paulo, Folha Agrofolha*, SP, 03 junho 1997. Caderno 5.
- OLIVEIRA, R. Queimada Aumenta Internações em Hospitais: Pesquisa da USP mostra alta de até 124% no número de problemas respiratórios na região de Ribeirão. *Folha de São Paulo, Folha Nordeste*, SP, 13 junho 1996. Caderno5, p.1.
- PADIRRA, A. P. Queimada de Cana Provoca Câncer: pesquisa da UNESP coincide com decisão sobre queimadas amanhã. *Diário de Franca*, Franca, 14 março 1997, p.5



- PAIVA, L.R. "Estão Falando Um Monte de Besteiras": Cientista diz que pesquisa está sendo deturpada, pois em nenhum ponto afirma que queimada provoca câncer". *Jornal da Cana*, SP, agosto 1997. p.1.
- PANDRANGI, R., PETRAS, M., RALPH, S., VRZOC, M. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp. *Environ. Mol. Mut.*, v.26, p.345-56, 1995.
- PASQUINI, R., MONARCA, S., SCASELLAT SFORZOLINI, G., SAVINO, A., FATIGONI, C., PUCETTI, P. urine mutagenicity and biochemical parameters as markers of exposure to petroleum pitch using a rat model. *Environ. Mol. Mutagen.*, v.15, p.56-66, 1990.
- PELTONEN, K., DIPPLE, A. Polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry of DNA adduct formation. *J. of Occup. and Environ. Medicine*, v.37, n.1, p.52-8, 1995.
- PROMOTORES decidem-se unir para combater as queimadas: Ministério Público rompe as negociações com o setor sucroalcooleiro. *Folha de São Paulo Nordeste*, SP, 15 agosto 1997. caderno 5, p.5.
- PULLMAN, A., PULLMAN, B. Eletronic structure and carcinogenic activity of aromatic molecules. *Adv. Canc. Res.*, v.3, p.117-28, 1955.
- RABELLO-GAY, M.N., RODRIGUES, M.A.R., MONTELEONE-NETO, R. Introdução. In:---. *Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese: Métodos e critérios de avaliação*. Brasil: SBG, 1991. p.7-8.
- RAMEL, C. Pollution, carcinogenesis and cancer prevention. *Acta Oncol.*, v.30, p.27-33, 1991.
- RAUNIO, H., HUSGAFVEL-PURSIAINEN, K., ANTTILA, S., HIETANEN, E., HIRVONEN, A., PELKONEN, O. Diagnosis of polymorphisms in carcinogen-activating and inactivating enzymes and cancer susceptibility - a review. *Gene*, v.159, p.113-21, 1995.
- RECIO, L., ENOCH, H.G., HANNAN, M.A, HILL, R. H. Aplicação de urine mutagenicity to monitor coal liquefaction workers. *Mutat. Res.*, v.136, p.201-7, 1984.



- REGIÃO faz "cruzada" contra queimadas: Ministério Público une as outras instituições para combater a prática em canaviais até final da safra. *Folha de São Paulo, Folha Nordeste*, SP, 21 setembro 1997. Caderno 07, p5.
- ROSENKRANZ, H. S. Mutagenic nitroarens. diesel emissions. particulate-induced mutations and cancer: na essay on cancer-causation by a moving target. *Mutat. Res.*, v. 367, p.65-72, 1996.
- ROSENKRANZ, H. S., MERMELSTEIM, R. The mutagenic and carcinogenic properties of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: WHITE, C. M. (Ed). *Nitrated poycyclic aromati hydrocarbons*. 1985. p.267-97.
- ROSENKRANZ, H.S., MERMELSTEIN, R. Mutagenicity and genotoxicity of nitroarenes. All nitro-containing chemicals were not created equal. *Mutat. Res.*, v. 114, p.217-23, 1983.
- ROSSER, P.F., RAMACHANDRAN, R., SANGAIAH, R., AUSTIN, R.N., GOLD, A., BALL, L.M. Role of O-acetyltransferase in activation of oxidised metabolites of the genotoxic environmental pollutant 1-nitropyrene. *Mutat. Res.*, v. 369, p.209-20, 1996.
- SASSON, I.M., COLEMAN, D.T., LA VOIE, E.J., HOFFMANN, D., WYNDER, E. L. Mutagens in human urine: Effects of cigarette smoking and diet. *Mutat. Res.*, v.158, p.149-57, 1985.
- SATO, M. I., VALENT, G. U., COIMBRÃO, C. A., COELHO, M. C., SANCHEZ SANCHEZ, P., ALONSO, C. D., MARTINS, M. T. Mutagenicity of airborne particulate organic material from urban and industrial aresa of São Paulo, Brazil. *Mutat. Res.*, v. 335, p.317-30, 1995.
- SCHERER, G., DOOLITTLE, D.J., RUPPERT, T., MEGER-KOSSIE, I., RIEDEL, K., TRICKER, A. R., ADLKOEFER, F. Urinary mutagenicity and thioethers in nonsmokers: Role of environmental tobacco smoke (ETS) and diet. *Mutat. Res.*, v.368, p.195-204, 1996.
- SCULLY, C. Oncogenes, tumor suppressors and viruses in oral squamous carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.*, v.22, p.337-47, 1993.



- SHAH, A. B., ROWLAND, I. R., COMBES, R. D. Inhibition of dinitropyrene mutagenicity *in vitro* and *in vivo* using *Salmonella typhimurium* and the intrasanguineous host-mediated assay. *Mutat. Res.*, v.253, p.181-91, 1991.
- SHARMA, S., STUTZMAN, J.D., KELLOFF, G.J., STEELE, V.E. Screening of potential chemopreventive agents using biochemical markers of carcinogenesis. *Cancer Res.*, v.54, p.5848-55, 1994.
- SHIELDS, P.G. Pharmacogenetics: Detecting sensitive populations. *Environ. Health Perspect.*, v.102, p.81-7, 1994.
- SINUES, B., PEREZ, J., BERNAL, M.L., SAENZ, M.A., LANUZA, J., BARTOLOME, M. Urinary mutagenicity and N-acetylation phenotype in textile industry workers exposed to arylamines. *Cancer Res.*, v.52, p.4885-9, 1992.
- SMITH, B. A., FULLERTON, N. F., HEFLICH, R. H., BELAND, F. A. DNA adduct formation and T-lymphocyte mutation induction in F344 rats implanted with tumorigenic doses of 1,6-dinitropyrene. *Cancer Res.*, v.55, p.2316-24, 1995.
- SMITH, C. J., MCKARNS, S. C., DAVIS, R. A., LIVINGSTON, S. D., BOMBICK, B. R., AVALOS, J. T., MORGAN, W. T., DOOLITTLE, D. J. Human urine mutagenicity study comparing cigarettes which burn or primarily heat tobacco. *Mutat. Res.*, v. 361, p. 1-9, 1996.
- SOUSA, J., NATH, J., TUCKER, J.D., ONG, T.M. Dietary factors affecting the urinary mutagenicity assay system. Detection of mutagenic activity in human urine following a fried beef meal. *Mutat. Res.*, v.149, p.365-74, 1985.
- STAMM, S. C., ZHONG, B. -Z., WHONG, W.-Z., ONG, T. Mutagenicity of coal-dust and smokeless-tobacco extracts in *Salmonella typhimurium* strains with differing levels of O-acetyltransferase activities. *Mutat. Res.*, v.321, p.253-64, 1994.
- 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.



- USINAS recorrem de proibição à queimadas: recurso dos usineiros da região deve ser apresentadona quarta-feira ao Tribunal de Justiça do Estado. *Folha de São Paulo. Folha Nordeste*, SP, 17 outubro 1995. Caderno 07, p.3.
- USINEIROS iniciam articulação para derrubar ação civil que proíbe a queimada de cana. *O Imparcial*, Araraquara, 15 março 1998. p.4.
- VAN HOUDT, J.J. Mutagenic activity of airborne particulate matter in indoor and outdoor environments. *Atmos. Environ.*, v.24B, p.207-20, 1990.
- VARGAS, V.M.F., HORN, R.C., GUIDOBONO, R.R., MITTELSTAEDT, A.B., AZEVEDO, I.G. Mutagenic activity of airborne particulate matter from the urban area of Porto Alegre, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, v.21, p.247-53, 1998.
- VARGAS, V.M.F., MOTTA, V.E.P., HENRIQUES, J. A. P. Mutagenic activity detected by the Ames test in river water under the influence of petrochemical industries. *Mutat. Res.*, v. 319, p. 31-45, 1993.
- VENIER, P., CLONFERO, E., COTTICA, D., GAVA, C., ZORDAN, M., POZZOLI, L., LEVIS, A.G. Mutagenic activity and polycyclic aromatic hydrocarbon level in urine of workers exposed to coal tar pitch volatiles in an anode plant. *Carcinogenesis*, v.6, p.749-52, 1985.
- VILEGAS, W., SANTIAGO, M.R.R.M. "A importância do ato de ler". *Gazeta Mercantil*, SP, 09 setembro 1997. Caderno A, p.3.
- VO DINH, T. Chemical analysis of polycyclic aromatic compounds. In: VINCENT, J.H. (Ed). *Aerosol Samplin*. New York:John Wiley and Sons, 1989. p.17-21.
- WATANABE, M., ISHIDATE Jr., M., NOHMI, T. A sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes: construction of nitroreductase-overproducing derivatives of *Salmonella typhimurium* strains TA98 and TA100. *Mutat. Res.*, v.216, p.211-20, 1989.
- WATANABE, M., ISHIDATE Jr., M., NOHMI, T. Sensitive method for the detection of mutagenic nitroarenes and aromatic amines: new derivatives of



- Salmonella typhimurium* tester strains possessing elevated O-acetyltransferase levels. *Mutat. Res.*, v.234, p.337-48, 1990.
- WATANABE, T., TAKASHIMA, M., KASAI, T., HIRAYAMA, T. Comparison of the mutational specificity induced by environmental genotoxin nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons in *Salmonella typhimurim* his genes. *Mutat. Res.*, v. 394, p. 103-12, 1997.
- WATTS, R., LEWTAS, J., STEVENS, R., HARTLAGE, T., PINTO, J., WILLIAMS, R., HATTAWAY, K., MISKOVÁ, I., BENES, I., KOTESOVEC, F., SRÁM, R.J. EPA health study: assessment of personal and ambient air exposures to PAH and organic mutagens in the Teplice district of Northern Bohemia. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, v.56, p.271-87, 1994.
- YAHAGI, T., DEGAWA, M., SEINO, Y., MATSUSHIMA, T., NAGAO, M., SUGIMURA, T., HASHIMOTO, Y. Mutagenicity of carcinogenic azo dyes and their derivatives. *Cancer Lett.*, v.1, p.91-6, 1975.
- YAMASAKI, E., AMES, B.N. Concentration of mutagens from urine by adsorption with the nonpolar resin XAD-2: Cigarette smokers have mutagenic urine. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.74, p.3555-9, 1977.
- YAMASAKI, H., ASBY, J., BIGNAMI, M., JONGEN, W., LINNAINMAA, K., NEWBOLD, R.F., NGUYEN-BA, G., PARODI, S., RIVEDAL, E., SCHIFFMANN, D., SIMONS, J.W., VASSEUR, P. Nongenotoxic carcinogens: development of detection methods based on mechanisms: a European project. *Mutat. Res.*, v.353, p.47-63, 1996.
- YIN, X.J., LIU, J.Z., KONG, X.H., CHU, J.H., WANG, H., XIAO, Z.X. Mutagenicity of urine from individuals exposed to LPG combustion products. *Biomed. Environ. Sci.*, v.11, p.251-7, 1998.
- ZAMPERLINI, G.C.M. Investigação da fuligem proveniente da queima de cana-de-açúcar com ênfase nos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Araraquara: Instituto de Química de Araraquara. UNESP, 1997. 93p. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química de Araraquara. Universidade Estadual Paulista, 1997.



ZAR, J.H. Bioestatistical analysis. 2^a ed.. New Jersey: Prentice-Hall, , 1984, p.718.

ZIEGLER, D.M., ANSHIER,S.S., NAGATA, T., KADLUBAR, F.F., JACOBY, W.B. N-Metilaton: Potential mechanism for metabolic activation of carcinogenic primary arilamines. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.85, p.2514-17, 1988.

Dose 1498 - 89							Y01024 - 89							Y01021 - 89						
DL	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM			
0	47	42	46	45,0			4	82	87	91	86,0		6	74	84	87	85,0			
6,25	51	72	34	40,0	1,70	6,25	91	111	124	108,0	1,47	6,25	25	34	16	45,0	1,23			
12,5	83	63	51	74,0	1,62	12,5	130	114	117	119,0	1,47	12,5	47	42	34	41,0	1,31			
25	72	75	76	74,0	1,58	25	146	144	170	154,0	1,53	25	42	34	45	43,0	1,30			
50	64	85	78	75,0	1,61	50	72	121	137	110,0	1,31	72	42	37	39	46,0	1,37			
Resultado: negativo							negativo							negativo						

Dose 1498 - 89							Y01024 - 89							Y01021 - 89						
DL	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM			
0	32	29	-	30,5			0	32	24	24	27,0		0	31	24	23	26,0			
6,25	39	34	33	35,0	0,94	6,25	32	17	16	21,0	0,97	6,25	30	24	19	24,0	0,93			
12,5	31	24	20	25,0	0,82	12,5	27	14	7	14,0	0,70	12,5	40	24	16	26,0	0,74			
25	25	23	-	24,0	0,74	25	28	18	14	21,0	1,14	25	37	27	29	31,0	1,24			
50	21	27	-	24,0	0,74	50	41	16	13	23,0	1,31	50	41	16	24	27,0	1,12			
Resultado: negativo							negativo							negativo						

10 - Apêndice

Resultado do Teste de Ames a partir dos extratos orgânicos da urina dos indivíduos expostos à queima da cana-de-açúcar e dos controles em diferentes doses ($\mu\text{L/placa}$), utilizando-se as linhagens de *Salmonella typhimurium* TA98 YG1024 e YG1021.

Indivíduo Exposto 1.

Dose TA98 + S9						YG1024 + S9						YG1021 + S9					
μL	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM
0	47	45	49	47,0		0	83	87	82	84,0		0	35	34	33	34,0	
6,25	81	73	86	80,0	1,70	6,25	91	133	134	119,3	1,42	6,25	41	39	46	42,0	1,23
12,5	83	65	81	76,3	1,62	12,5	130	114	113	119,0	1,42	12,5	42	43	38	41,0	1,21
25	72	75	76	74,3	1,58	25	148	144	170	154,0	1,83	25	52	36	45	44,3	1,30
50	64	85	78	75,7	1,61	50	73	101	157	110,3	1,31	50	44	37	57	46,0	1,35

Resultado: negativo

negativo

negativo

Dose TA98 - S9						YG1024 - S9						YG1021 - S9					
μL	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM
0	32	29	-	30,5		0	33	26	24	27,7		0	44	39	45	42,7	
6,25	29	24	33	28,7	0,94	6,25	28	17	36	27,0	0,97	6,25	40	49	30	39,7	0,93
12,5	31	24	20	25,0	0,82	12,5	21	14	23	19,3	0,70	12,5	40	43	44	42,3	0,99
25	25	23	-	24,0	0,79	25	28	38	29	31,7	1,14	25	73	62	39	58,0	1,36
50	21	27	-	24,0	0,79	50	41	38	30	36,3	1,31	50	44	49	50	47,7	1,12

Resultado: negativo

negativo

negativo

Indivíduo Exposto 2.

TA98 - S9						YG1024 + S9						YG1021 + S9					
Dose	P1	P2	P3	X	RM	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	34	30	-	32,0		0	61	76	79	72,0		0	31	31	35	32,3	
6,25	59	68	72	66,3	2,07	6,25	103	63	90	85,3	1,18	6,25	33	48	44	41,3	1,28
12,5	78	70	60	69,3	2,16	12,5	138	113	42	97,6	1,36	12,5	45	36	33	41,7	1,29
25	75	68	89	77,3	2,42	25	170	144	157	157,0	2,18	25	44	42	33	39,7	1,23
50	79	69	71	73,0	2,28	50	179	188	178	181,6	2,52	50	44	51	53	49,3	1,53

Resultado: positivo positivo negativo

TA98 - S9						YG1024 - S9						YG1021 - S9					
Dose	P1	P2	P3	X	RM	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	31	24	27	27,3		0	27	35	40	34,0		0	47	46	40	44,3	
6,25	18	23	17	19,3	0,71	6,25	34	24	22	26,6	0,78	6,25	41	36	29	35,3	0,80
12,5	26	29	17	24,0	0,88	12,5	31	29	29	29,6	0,87	12,5	32	36	44	37,3	0,84
25	27	25	27	26,3	0,96	25	28	32	26	28,6	0,84	25	40	63	58	56,7	1,28
50	34	23	21	29,3	1,07	50	27	18	23	22,6	0,66	50	58	40	38	45,3	1,02

Resultado: negativo negativo negativo

Indivíduo Exposto 3.

TA98 + S9						YG1024 + S9						YG1021 + S9					
Dose	P1	P2	P3	X	RM	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	30	33	34	32,2		0	70	78	61	69,7		0	33	41	45	39,7	
6,25	77	67	62	68,7	2,13	6,25	121	110	91	107,3	1,54	6,25	53	55	40	49,3	1,24
12,5	60	88	-	74,0	2,30	12,5	154	131	123	136,0	1,95	12,5	45	60	35	46,7	1,18
25	63	61	63	62,3	1,93	25	175	131	127	144,3	2,07	25	52	40	50	47,3	1,19
50	70	60	60	63,3	1,97	50	154	150	132	145,3	2,08	50	44	53	56	51,3	1,29

indício de

Resultado: mutagenicidade

positivo

negativo

TA98 - S9						YG1024 - S9						YG1021 - S9					
Dose	P1	P2	P3	X	RM	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	27	25	30	27,3		0	35	39	36	36,7		0	46	52	49	49,0	
6,25	54	38	44	45,3	1,66	6,25	32	26	43	33,7	0,92	6,25	42	50	48	46,7	0,95
12,5	42	38	33	37,7	1,38	12,5	40	34	27	33,7	0,92	12,5	35	52	44	43,7	0,89
25	34	59	51	48,0	1,76	25	37	39	41	39,0	1,06	25	36	47	60	47,7	0,97
50	39	48	39	42,0	1,54	50	39	45	34	39,3	1,07	50	46	54	56	52,0	1,06

Resultado: negativo

negativo

negativo

Indivíduo Exposto 4.

TA98 - S9						YG1024 + S9						YG1021 + S9					
Dose	P1	P2	P3	X	RM	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	37	30	37	34,7		0	70	61	-	65,5		0	43	47	35	41,7	
6,25	30	29	34	31,0	0,89	6,25	70	50	50	56,7	0,87	6,25	36	40	-	38,0	0,92
12,5	38	26	28	30,7	0,88	12,5	53	67	66	62,0	0,95	12,5	20	37	26	27,7	0,66
25	20	35	37	30,7	0,88	25	64	92	94	83,3	1,27	25	33	27	40	33,3	0,80
50	45	36	42	41,0	1,18	50	94	58	74	75,3	1,15	50	32	35	-	33,5	0,80

Resultado: negativo

negativo

negativo

TA98 - S9						YG1024 - S9						YG1021 - S9					
Dose	P1	P2	P3	X	RM	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	29	30	35	31,3		0	35	39	37	37,0		0	40	45	39	41,3	
6,25	34	46	38	39,3	1,26	6,25	34	53	37	41,3	1,12	6,25	55	40	64	53,0	1,28
12,5	41	43	50	44,7	1,43	12,5	40	30	37	35,7	0,96	12,5	46	39	51	45,3	1,10
25	64	56	46	55,3	1,77	25	43	55	50	49,3	1,33	25	62	42	37	47,0	1,14
50	34	45	56	45,0	1,44	50	44	57	49	50,0	1,33	50	53	46	40	46,3	1,12

Resultado: de início

Resultado: mutagenicidade

negativo

negativo

negativo

negativo

Indivíduo Exposto 5.

TA98 + S9						YG1024 + S9						YG1021 + S9					
Dose	PI	P2	P3	X	RM	PI	P2	P3	X	RM		PI	P2	P3	X	RM	
0	29	37	28	31,3		0	85	70	79	78,0		0	31	41	32	34,6	
6,25	49	58	72	59,7	1,91	6,25	108	88	88	94,7	1,21	6,25	51	35	31	30,9	1,13
12,5	82	82	55	73,0	0,43	12,5	76	100	103	93,0	1,19	12,5	39	33	43	38,3	1,11
25	78	65	59	67,3	2,15	25	109	127	122	119,3	1,53	25	54	50	54	52,7	1,52
50	67	69	68	68,0	2,17	50	126	115	144	128,3	1,64	50	58	55	-	56,5	1,63

Resultado: positivo

indício de
mutagenicidade

indício de
mutagenicidade

TA98 - S9						YG1024 - S9						YG1021 - S9					
Dose	PI	P2	P3	X	RM	PI	P2	P3	X	RM		PI	P2	P3	X	RM	
0	43	46	-	44,5		0	34	36	-	35,0		0	44	42	-	43,0	
6,25	31	46	-	38,5	0,86	6,25	21	24	-	22,5	0,64	6,25	24	21	-	22,5	0,52
12,5	34	36	-	35,0	0,79	12,5	16	33	-	24,5	1,43	12,5	18	28	-	23,0	0,53
25	29	28	-	28,5	0,64	25	19	18	-	18,5	0,53	25	23	27	-	25,0	0,58
50	39	30	-	34,5	0,77	50	26	34	-	30,0	0,86	50	27	28	-	27,5	0,64

Resultado: negativo

negativo

negativo

Indivíduo Exposto 6.

Dose		TA98 +S9					YG1024 + S9					YG1021 - S9					
μL	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM
0	34	33	27	31,3		0	61	71	-	66,0		0	31	36	41	36,0	
6,25	34	27	21	27,3	0,87	6,25	40	53	55	49,3	0,75	6,25	19	20	21	20,0	0,55
12,5	34	27	16	25,6	0,82	12,5	64	62	70	65,3	1,32	12,5	41	27	30	32,7	0,91
25	37	27	34	32,7	1,04	25	83	77	71	77,0	1,17	25	34	19	23	25,3	0,70
50	29	37	35	33,7	1,08	50	97	68	83	82,7	1,25	50	27	35	30	30,7	0,84

Resultado: negativo índice de mutagenicidade negativo

Dose		TA98 -S9					YG1024 - S9						YG1021 - S9					
μL	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	45	50	37	44,0		0	91	39	42	57,3		0	49	44	41	44,7		
6,25	17	23	30	23,3	0,53	6,25	30	18	19	22,3	0,39	6,25	42	34	53	43,0	0,96	
12,5	14	20	31	21,7	0,49	12,5	22	19	17	19,3	0,34	12,5	49	39	52	46,7	1,04	
25	29	26	24	26,3	0,60	25	20	19	41	26,7	0,46	25	38	51	45	44,7	1,00	
50	30	19	20	23,0	0,52	50	28	34	31	31,0	0,54	50	40	51	-	45,5	1,02	

Resultado: negativo negativo negativo

Indivíduo Exposto 7.

Dose TA98 + S9						YG1024 + S9						YG1021 + S9					
μL	P1	P2	P3	X	RM	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	33	27	25	28,3		0	70	79	-	74,5		0	35	34	36	35,0	
6,25	21	25	31	25,7	0,91	6,25	72	62	68	67,3	0,90	6,25	30	22	30	27,3	0,78
12,5	23	31	41	31,7	1,12	12,5	98	96	93	95,7	1,28	12,5	31	23	27	27,0	0,77
25	39	30	35	34,7	1,22	25	144	121	132	132,3	1,78	25	33	41	46	40,0	1,14
50	35	41	34	36,7	1,30	50	160	143	151	151,3	2,03	50	51	47	50	49,3	1,41

indício de
Resultado: mutagenicidade

indício de
mutagenicidade
positivo

indício de
mutagenicidade
negativo

Dose TA98 - S9						YG1024 - S9						YG1021 - S9					
μL	P1	P2	P3	X	RM	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	45	50	-	47,5		0	36	35	-	35,5		0	31	32	-	31,5	
6,25	58	64	-	61,0	1,28	6,25	21	19	-	20,0	0,56	6,25	31	19	-	25,0	0,79
12,5	47	30	-	38,5	0,81	12,5	25	28	-	26,5	1,34	12,5	30	25	-	27,5	0,87
25	45	42	-	43,5	0,92	25	22	27	-	24,5	0,69	25	25	27	-	26,0	0,82
50	31	28	-	29,5	0,62	50	26	26	-	26,0	0,73	50	25	40	-	32,5	1,03

Resultado: negativo

negativo

negativo

Indivíduo Exposto 8.

Dose		TA98 + S9					YG1024 + S9						YG1021 + S9					
μL	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	25	27	33	28,3			0	86	80	-	83,0		0	35	34	32	33,7	
6,25	23	29	30	27,3	0,97		6,25	59	61	69	63,0	0,76	6,25	28	27	22	25,7	0,76
12,5	23	33	31	29,0	1,02		12,5	89	83	-	86,0	1,04	12,5	35	25	28	29,3	0,87
25	28	39	38	35,0	1,24		25	87	91	82	86,7	1,04	25	27	39	29	31,7	0,94
50	54	57	53	54,7	1,93		50	115	105	93	104,3	1,26	50	57	58	59	58,0	1,72
Resultado: índice de mutagenicidade						Resultado: índice de mutagenicidade						Resultado: índice de mutagenicidade						

Dose		TA98 - S9					YG1024 - S9					YG1021 - S9					
μL	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM
0	43	46	-	44,5		0	32	27	-	29,5		0	30	31	-	30,5	
6,25	36	25	-	30,5	0,68	6,25	28	31	-	29,5	1,00	6,25	23	32	-	27,5	0,90
12,5	41	40	-	40,5	0,91	12,5	21	25	-	23,0	0,78	12,5	33	31	-	32,0	1,05
25	39	52	-	45,5	1,02	25	28	20	-	24,0	0,81	25	36	43	-	39,5	1,29
50	57	73	-	65,0	1,46	50	32	39	-	35,5	1,20	50	27	35	-	31,0	1,02
indício de																	
Resultado: mutagenicidade						negativo						negativo					

Indivíduo Exposto 9.

Dose TA98 + S9						YG1024 + S9						YG1021 + S9					
μL	P1	P2	P3	X	RM	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	27	25	28	26,7		0	70	76	-	73,0		0	32	31	35	32,7	
6,25	30	22	34	28,7	1,07	6,25	68	71	85	74,7	1,02	6,25	22	41	27	30,0	0,92
12,5	28	23	24	25,0	0,94	12,5	95	92	80	89,0	1,22	12,5	26	23	28	25,7	0,78
25	21	27	34	27,3	1,02	25	105	84	99	96,0	1,31	25	39	34	32	35,0	1,07
50	32	37	46	38,3	1,44	50	114	131	131	125,3	1,72	50	29	44	39	37,3	1,14

Resultado: negativo

indício de
mutagenicidade

negativo

Dose TA98 - S9						YG1024 - S9						YG1021 - S9					
μL	P1	P2	P3	X	RM	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	37	29	-	33,0		0	32	27	-	29,5		0	37	39	-	38,0	
6,25	52	49	-	50,5	1,53	6,25	23	26	-	24,5	0,83	6,25	26	38	-	32,0	0,84
12,5	43	38	-	40,5	1,23	12,5	13	14	-	13,5	0,46	12,5	25	26	-	25,5	0,67
25	32	31	-	31,5	0,95	25	25	33	-	29,0	0,98	25	25	30	-	27,5	0,72
50	31	39	-	35,0	1,06	50	17	24	-	20,5	0,69	50	39	24	-	31,5	0,83

Resultado: negativo

negativo

negativo

Indivíduo Exposto 10.

Dose TA98 + S9						YG1024 + S9						YG1021 + S9					
μL	P1	P2	P3	X	RM	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	29	29	30	29,3		0	34	36	-	35,0		0	34	32	33	33,0	
6,25	31	28	26	28,3	0,97	6,25	46	28	30	34,7	0,99	6,25	37	33	30	33,3	1,01
12,5	41	34	35	36,7	1,25	12,5	62	58	48	56,0	1,60	12,5	40	35	33	36,0	1,09
25	35	38	24	32,3	1,10	25	63	49	51	54,3	1,55	25	41	37	45	41,0	1,24
50	30	33	34	32,3	1,10	50	73	96	67	78,7	2,25	50	42	52	46	46,7	1,41
Resultado: negativo						positivo						indício de mutagenicidade					

Dose TA98 - S9						YG1024 - S9						YG1021 - S9					
μL	P1	P2	P3	X	RM	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	27	24	30	27,0		0	40	27	38	35,0		0	27	25	26	26,0	
6,25	37	28	-	32,5	1,20	6,25	24	21	-	22,5	0,64	6,25	22	29	-	25,5	0,98
12,5	34	31	-	32,5	1,20	12,5	20	28	-	24,0	0,69	12,5	26	20	-	23,0	0,88
25	21	32	-	26,5	0,98	25	19	21	-	20,0	0,57	25	39	38	-	38,5	1,48
50	35	49	-	42,0	1,56	50	18	25	-	21,5	0,61	50	24	35	22	27,0	1,04
Resultado: negativo						negativo						negativo					

Indivíduo Exposto 11.

TA98 + S9						YG1024 + S9						YG1021 + S9					
Dose	P1	P2	P3	X	RM	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	33	34	37	34,7		0	73	61	62	65,3		0	32	31	34	32,3	
6,25	33	31	40	34,7	1,00	6,25	59	70	66	65,0	0,99	6,25	36	32	21	29,7	0,92
12,5	23	34	42	33,0	0,95	12,5	78	73	54	68,3	1,05	12,5	28	27	37	30,7	0,95
25	32	33	40	35,0	1,01	25	74	74	90	79,3	1,21	25	48	30	42	40,0	1,24
50	34	30	40	34,7	1,00	50	97	105	97	99,7	1,53	50	50	56	33	43,0	1,33
Resultado: negativo						indício de mutagenicidade						indício de mutagenicidade					

TA98 - S9						YG1024 - S9						YG1021 - S9					
Dose	P1	P2	P3	X	RM	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	35	39	28	34,0		0	23	26	24	24,3		0	27	29	25	27,0	
6,25	36	35	-	35,5	1,04	6,25	18	24	21	21,0	0,86	6,25	27	20	-	23,5	0,87
12,5	26	30	-	28,0	0,82	12,5	18	22	26	22,0	1,05	12,5	20	20	-	20,0	0,74
25	29	22	-	25,5	0,75	25	25	20	19	21,3	0,88	25	28	23	-	25,5	1,06
50	30	27	-	28,5	0,84	50	24	36	18	26,0	1,07	50	24	24	-	24,0	0,89
Resultado: negativo						negativo						negativo					

Indivíduo Exposto 12.

Dose		TA98 +S9					YG1024 + S9						YG1021 + S9					
μL	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	30	31	30	30,3		0	40	36	38	38,0		0	26	21	31	26,0		
6,25	38	45	32	38,3	1,26	6,25	42	44	60	48,7	1,28	6,25	34	33	23	30,0	1,15	
12,5	29	39	33	33,7	1,11	12,5	56	50	61	55,7	1,46	12,5	18	27	35	26,7	1,02	
25	26	43	37	35,3	1,17	25	79	71	59	69,7	1,83	25	33	34	31	32,7	1,26	
50	57	49	41	49,0	1,62	50	71	75	87	77,7	2,04	50	28	32	33	31,0	1,19	

Resultado: negativo

positivo

negativo

Dose		TA98 -S9					YG1024 - S9					YG1021 - S9					
μL	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM
0	43	46	-	44,5		0	27	33	30	30,0		0	23	32	-	27,5	
6,25	42	52	-	47,0	1,06	6,25	33	31	16	26,7	0,89	6,25	39	32	-	35,5	1,29
12,5	64	44	-	54,0	1,21	12,5	19	27	20	22,0	0,73	12,5	33	13	-	23,0	0,84
25	46	48	-	47,0	1,06	25	21	38	26	28,3	0,94	25	22	18	-	20,0	0,73
50	46	62	-	54,0	1,21	50	16	24	22	20,7	0,69	50	21	18	-	19,5	0,71

Resultado: negativo

negativo

negativo

Controle 13.

Dose						TA98 +S9						YG1024 + S9						YG1021 + S9					
μL	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM						
0	34	33	29	32,0		0	63	65	66	64,7		0	31	32	29	30,7							
6,25	20	30	32	27,3	0,85	6,25	64	60	68	64,0	0,99	6,25	27	29	18	24,7	0,80						
12,5	39	30	28	32,3	1,01	12,5	74	58	57	63,0	0,97	12,5	21	27	32	26,7	0,87						
25	27	32	-	29,5	0,92	25	55	66	67	62,7	0,97	25	24	26	-	25,0	0,81						
50	21	12	-	12,5	0,51	50	37	28	31	32,0	0,49	50	12	3	4	6,3	0,21						

Resultado: negativo

negativo

negativo

TA98 -S9						YG1024 - S9						YG1021 - S9						
Dose	μL	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM
0	25	27	25	25,7			0	26	24	25	25,0		0	25	29	-	27,0	
6,25	10	17	20	15,7	0,61		6,25	14	16	22	17,3	0,69	6,25	14	13	7	11,3	0,42
12,5	16	17	19	17,3	0,67		12,5	17	17	18	17,3	0,69	12,5	15	9	-	12,0	0,44
25	5	6	9	6,7	0,26		25	11	15	6	10,7	0,43	25	23	13	18	18,0	0,67
50	6	4	4	4,7	0,18		50	11	8	15	11,3	0,45	50	-	-	-	-	-

Resultado: negativo

negativo

negativo

Controle 14.

TA98 + S9						YG1024 + S9						YG1021 + S9					
Dose	P1	P2	P3	X	RM	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	28	27	30	28,3		0	61	71	63	65,0		0	41	32	31	34,6	
6,25	33	30	27	30,0	1,06	6,25	79	75	65	73,0	1,12	6,25	35	42	40	39,0	1,13
12,5	34	32	26	30,7	1,08	12,5	71	72	79	74,0	1,14	12,5	35	27	36	32,7	0,94
25	34	38	29	33,7	1,19	25	56	63	81	66,7	1,02	25	43	33	34	36,7	1,06
50	41	42	35	39,3	1,39	50	83	68	62	71,0	1,09	50	38	38	40	38,7	1,12

indício de
Resultado: mutagenicidade

negativo

negativo

TA98 - S9						YG1024 - S9						YG1021 - S9					
Dose	P1	P2	P3	X	RM	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	28	29	35	30,7		0	24	32	29	28,3		0	25	29	-	27,0	
6,25	18	19	19	18,7	0,61	6,25	18	17	19	18,0	0,64	6,25	8	17	18	14,3	0,53
12,5	29	15	28	24,0	0,78	12,5	13	21	20	18,0	0,64	12,5	15	15	14	14,7	0,54
25	13	15	13	13,7	0,44	25	14	9	14	12,3	0,43	25	12	16	13	13,7	0,51
50	21	26	21	22,7	0,73	50	7	14	10	10,3	0,36	50	14	19	17	16,7	0,62

Resultado: negativo

negativo

negativo

Controle 15.

Dose TA98 + S9						YG1024 + S9						YG1021 + S9					
μL	P1	P2	P3	X	RM	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	37	33	34	34,7		0	68	69	61	66,0		0	31	35	47	37,7	
6,25	33	31	40	34,7	1,00	6,25	50	67	61	59,3	0,90	6,25	27	35	29	30,3	0,80
12,5	33	28	43	34,6	1,00	12,5	62	62	73	65,7	0,99	12,5	29	37	43	36,3	0,96
25	38	27	33	32,7	0,94	25	88	83	85	85,3	1,29	25	38	35	39	37,3	0,99
50	35	36	30	33,7	0,97	50	93	70	75	79,3	1,20	50	21	17	22	20,0	0,53

Resultado: negativo

negativo

negativo

Dose TA98 - S9						YG1024 - S9						YG1021 - S9					
μL	P1	P2	P3	X	RM	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	30	35	39	34,6		0	31	26	29	28,7		0	24	23	-	23,5	
6,25	11	23	18	17,3	0,50	6,25	14	20	13	15,7	0,54	6,25	10	12	18	13,3	0,57
12,5	16	21	18	18,3	0,53	12,5	17	18	9	14,7	0,51	12,5	25	12	24	20,3	0,86
25	18	16	26	20,0	0,58	25	17	15	15	15,7	0,54	25	18	19	14	17,0	0,72
50	23	27	22	24,0	0,69	50	25	12	15	17,3	0,60	50	15	21	20	18,7	0,79

Resultado: negativo

negativo

negativo

Controle 16.

Dose		TA98 +S9					YG1024 + S9						YG1021 + S9					
μL	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	32	29	33	31,3		0	40	34	36	36,7		0	29	30	-	29,5		
6,25	26	22	23	23,6	0,76	6,25	36	39	45	40,0	1,09	6,25	26	45	44	38,3	1,30	
12,5	23	36	32	30,3	0,97	12,5	30	64	45	46,3	1,26	12,5	22	32	32	28,7	0,97	
25	21	24	14	19,7	0,63	25	14	9	17	13,3	0,36	25	5	4	4	4,3	0,15	
50	11	7	13	10,3	0,33	50	2	6	-	4,0	0,11	50	-	-	-	-	-	

Resultado: negativo

negativo

negativo

Dose		TA98 -S9					YG1024 - S9					YG1021 - S9						
μL	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	27	35	30	30,6			0	32	29	26	29,0		0	29	27	23	26,3	
6,25	26	33	21	26,7	0,87		6,25	23	35	19	25,7	0,88	6,25	19	26	28	24,3	0,92
12,5	34	30	24	29,3	0,96		12,5	23	18	24	21,7	0,75	12,5	20	23	32	25,0	0,95
25	23	23	17	21,0	0,69		25	20	18	19	19,0	0,65	25	28	35	25	29,3	1,11
50	38	18	27	27,7	0,90		50	22	21	30	24,3	0,84	50	19	24	25	22,7	0,86

Resultado: negativo

negativo

negativo

Controle 17.

Dose		TA98 + S9					YG1024 + S9						YG1021 + S9					
μL	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	33	27	36	32,0		0	69	61	71	67,0		0	28	28	23	26,3		
6,25	31	28	32	30,3	0,95	6,25	55	47	43	48,3	0,72	6,25	27	26	27	26,7	1,01	
12,5	17	18	30	22,0	0,69	12,5	55	68	55	59,3	0,88	12,5	25	33	28	28,7	1,09	
25	31	29	29	29,7	0,93	25	73	59	59	63,7	0,95	25	37	26	28	30,3	1,15	
50	22	40	23	28,3	0,88	50	45	52	43	46,7	0,70	50	37	26	13	25,3	0,96	

Resultado: negativo

negativo

negativo

Dose		TA98 -S9					YG1024 - S9						YG1021 - S9					
μL	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	35	33	37	35,0			0	27	26	22	25,0		0	38	23	29	30,0	
6,25	30	33	18	27,0	0,77		6,25	14	22	14	16,7	0,67	6,25	26	17	20	21,0	0,70
12,5	21	23	26	23,3	0,67		12,5	17	14	19	16,7	0,67	12,5	29	25	17	23,7	0,79
25	23	22	31	25,3	0,72		25	16	27	18	20,3	0,81	25	19	22	21	20,7	0,69
50	26	14	33	24,3	0,69		50	14	23	16	17,7	0,71	50	16	19	19	18,0	0,60

Resultado: negativo

negativo

negativo



Controle 18.

TA98 + S9						YG1024 + S9						YG1021 + S9					
Dose	P1	P2	P3	X	RM	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	34	33	32	33,0		0	36	40	34	36,7		0	29	26	-	27,5	
6,25	33	28	30	30,3	0,92	6,25	44	48	41	44,3	1,21	6,25	30	31	34	31,7	1,15
12,5	30	20	19	23,0	0,70	12,5	44	54	61	53,0	1,44	12,5	37	39	40	38,7	1,41
25	31	28	29	29,3	0,89	25	60	52	54	55,3	1,51	25	42	37	35	38,0	1,38
50	32	31	31	31,3	0,95	50	54	71	66	63,7	1,73	50	37	38	38	37,7	1,37
Resultado: negativo						indício de mutagenicidade						negativo					

TA98 - S9						YG1024 - S9						YG1021 - S9					
Dose	P1	P2	P3	X	RM	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	31	39	37	35,7		0	25	33	35	31,0		0	38	23	29	30,0	
6,25	26	22	23	23,7	0,66	6,25	29	21	30	26,7	0,86	6,25	16	26	25	22,3	0,74
12,5	29	33	19	27,0	0,76	12,5	20	23	13	18,7	0,60	12,5	19	30	19	22,7	0,75
25	21	19	24	18,0	0,50	25	20	31	18	23,0	0,74	25	19	22	25	22,0	0,73
50	17	24	34	25,0	0,70	50	16	22	20	19,3	0,62	50	20	17	20	19,0	0,63
Resultado: negativo						negativo						negativo					

Controle 19.

TA98 + S9						YG1024 + S9						YG1021 + S9					
Dose	P1	P2	P3	X	RM	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	26	35	38	33,0		0	75	70	79	74,7		0	26	21	31	26,0	
6,25	28	36	38	34,0	1,03	6,25	75	62	58	65,0	0,87	6,25	28	29	28	28,3	1,09
12,5	29	22	47	32,7	0,99	12,5	66	72	68	68,7	0,92	12,5	18	31	34	27,7	1,06
25	44	42	49	45,0	1,36	25	78	74	83	78,3	1,05	25	35	42	39	38,7	1,49
50	42	41	48	43,7	1,32	50	104	87	112	101,0	1,35	50	37	43	39	39,7	1,53

Resultado: negativo

indício de
mutagenicidade

negativo

TA98 - S9						YG1024 - S9						YG1021 - S9					
Dose	P1	P2	P3	X	RM	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	44	51	-	47,5	RM	0	31	29	33	31,0	RM	0	23	32	-	27,5	
6,25	52	52	-	52,0	1,09	6,25	26	32	-	29,0	0,93	6,25	26	31	-	28,5	1,04
12,5	54	52	-	53,0	1,12	12,5	23	28	-	25,5	0,82	12,5	15	24	-	19,5	0,71
25	53	51	-	52,0	1,09	25	28	23	-	25,5	0,82	25	18	20	-	19,0	0,73
50	68	55		61,5	1,29	50	33	38	-	35,5	1,14	50	27	14	-	20,5	0,74

Resultado: negativo

negativo

negativo

Controle 20.

Dose		TA98 + S9					YG1024 + S9						YG1021 + S9					
μL	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	52	46	46	48,0		0	60	61	63	61,3		0	17	22	16	18,3		
6,25	38	36	-	37,0	0,77	6,25	59	54	-	56,5	0,92	6,25	15	23	22	20,0	1,09	
12,5	30	42	31	34,3	0,71	12,5	54	53	40	49,0	0,80	12,5	26	35	24	28,3	1,55	
25	43	49	42	44,7	0,93	25	52	44	49	48,3	0,79	25	27	28	29	28,0	1,53	
50	46	30	45	40,3	0,84	50	49	50	54	51,0	0,83	50	45	46	21	37,3	2,04	

Resultado: negativo

negativo

positivo

Dose		TA98 -S9					YG1024 - S9						YG1021 - S9					
μL	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	44	51	-	47,5			0	37	36	32	35.0		0	23	32	-	27,5	
6,25	36	61	-	48,5	1.02		6,25	43	35	-	39.0	1,11	6,25	20	16	-	18,0 0,65	
12,5	37	38	-	37,5	0,79		12,5	26	27	-	26.5	0,76	12,5	15	25	-	20,0 0,73	
25	42	56	-	49,0	1,03		25	30	33	-	31.5	0,90	25	14	24	-	19,0 0,69	
50	47	40	-	43,5	0,92		50	27	35	-	31.0	0,89	50	21	12	-	16,5 0,60	

Resultado: negativo

negativo

negativo

Controle 21.

Dose		TA98 + S9					YG1024 + S9					YG1021 + S9					
μL	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM
0	52	46	46	48,0		0	61	40	34	45,0		0	29	22	24	25,0	
6,25	37	40	40	39,0	0,81	6,25	51	74	57	60,7	1,35	6,25	23	21	22	22,0	0,88
12,5	37	43	51	43,7	0,91	12,5	37	39	-	38,0	0,84	12,5	26	34	-	30,0	1,20
25	22	22	24	22,7	0,47	25	88	70	56	71,3	1,58	25	29	30	30	29,7	1,19
50	57	32	40	43,0	0,90	50	73	57	74	68,0	1,51	50	23	16	24	21,0	0,84

Resultado: negativo

negativo

negativo

Dose		TA98 -S9					YG1024 - S9						YG1021 - S9					
μL	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	44	51	-	47,5		0	32	29	35	32,0		0	23	32	-	27,5		
6,25	49	44	-	46,5	0,98	6,25	31	37	-	34,0	1,06	6,25	17	21	-	19,0	0,69	
12,5	55	39	-	47,0	0,99	12,5	42	33	-	37,5	1,17	12,5	24	19	-	21,5	0,78	
25	30	32	-	31,0	0,65	25	27	35	-	31,0	0,97	25	19	15	-	17,0	0,62	
50	44	45	-	44,5	0,94	50	27	15	-	21,0	0,66	50	20	22	-	21,0	0,76	

Resultado: negativo

negativo

negativo

Controle 22.

TA98 + S9						YG1024 + S9						YG1021 + S9					
Dose	P1	P2	P3	X	RM	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	51	46	53	50,0		0	40	42	46	42,7		0	22	28	29	26,3	
6,25	20	31	41	30,7	0,61	6,25	31	42	46	39,7	0,93	6,25	15	22	19	18,7	0,71
12,5	28	52	46	42,0	0,84	12,5	46	32	49	42,3	0,99	12,5	25	29	12	22,0	0,84
25	30	37	40	35,7	0,71	25	54	52	59	55,0	1,29	25	27	22	26	25,0	0,95
50	42	42	48	44,0	0,88	50	31	44	37	37,3	0,87	50	25	25	31	27,0	1,03

Resultado: negativo

negativo

negativo

TA98 - S9						YG1024 - S9						YG1021 - S9					
Dose	P1	P2	P3	X	RM	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	44	51	-	47,5		0	39	37	34	36,7		0	23	32	-	27,5	
6,25	66	58	-	62,0	1,30	6,25	55	74	-	64,5	1,76	6,25	51	24	-	37,5	1,36
12,5	50	45	-	47,5	1,00	12,5	38	54	-	46,0	1,25	12,5	23	42	-	32,5	1,18
25	58	48	-	53,0	1,16	25	26	46	-	36,0	0,98	25	36	33	-	34,5	1,25
50	36	49	-	42,5	0,89	50	32	31	-	31,5	0,86	50	33	35	-	34,0	1,24

Resultado: negativo

negativo

negativo

Controle 23.

TA98 + S9						YG1024 + S9						YG1021 + S9					
Dose	P1	P2	P3	X	RM	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	43	40	38	40,3		0	59	61	58	59,3		0	28	28	29	28,0	
6,25	32	34	40	35,3	0,88	6,25	52	44	45	47,0	0,79	6,25	29	24	18	23,7	0,84
12,5	35	31	42	36,0	0,89	12,5	58	54	66	59,3	1,00	12,5	26	27	19	24,0	0,85
25	34	53	43	43,3	1,07	25	66	77	73	72,0	1,21	25	18	33	26	25,7	0,91
50	43	47	39	43,0	0,99	50	97	85	100	94,0	1,58	50	29	45	36	36,7	1,30
Resultado: negativo						indício de mutagenicidade						negativo					

TA98 - S9						YG1024 - S9						YG1021 - S9					
Dose	P1	P2	P3	X	RM	P1	P2	P3	X	RM		P1	P2	P3	X	RM	
0	46	47	-	46,5		0	37	40	38	38,3		0	28	24	23	25,0	
6,25	62	49	-	55,5	1,19	6,25	27	46	-	36,5	0,95	6,25	23	36	-	29,5	1,18
12,5	44	50	-	47,0	1,01	12,5	32	37	-	34,5	0,90	12,5	32	29	-	30,5	1,22
25	46	50	-	48,0	1,03	25	26	33	-	29,5	0,77	25	37	19	-	28,0	1,12
50	45	47	-	46,0	0,99	50	43	31	-	37,0	0,97	50	16	35	-	25,5	1,02
Resultado: negativo						negativo						negativo					

Controle 24.

TA98 - S9						YG1024 + S9						YG1021 + S9					
Dose	PI	P2	P3	X	RM	PI	P2	P3	X	RM		PI	P2	P3	X	RM	
0	31	39	33	34,3		0	48	46	49	47,7		0	38	23	29	30,0	
6,25	37	40	35	37,3	1,00	6,25	32	39	29	33,3	0,70	6,25	25	20	20	21,7	0,72
12,5	38	39	45	40,7	1,10	12,5	38	52	39	43,0	0,90	12,5	21	25	19	21,7	0,72
25	37	41	31	36,3	1,06	25	39	48	42	43,0	0,90	25	19	26	23	22,7	0,75
50	47	36	36	39,7	1,16	50	46	42	48	45,3	0,95	50	21	24	22	22,3	0,74

Resultado: negativo

negativo

negativo

TA98 - S9						YG1024 - S9						YG1021 - S9					
Dose	PI	P2	P3	X	RM	PI	P2	P3	X	RM		PI	P2	P3	X	RM	
0	53	51	-	52,0		0	30	29	27	28,7		0	28	24	23	25,0	
6,25	44	41	-	42,5	0,82	6,25	30	22	-	26,0	0,91	6,25	27	33	-	30,0	1,20
12,5	58	60	-	59,0	1,13	12,5	34	39	-	36,5	1,27	12,5	38	22	-	30,0	1,20
25	72	74	-	73,0	1,40	25	26	27	-	26,5	0,92	25	26	22	-	24,0	0,96
50	82	65	-	73,5	1,41	50	43	53	-	48,0	1,67	50	40	19	-	29,5	1,18

Resultado: negativo

negativo

negativo

11 - ANEXOS

11.1 - Anexo 1

UNESP UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DO RIO PRETO
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS, LETRAS E CIÊNCIAS EXATAS

**CONSENTIMENTO PARA PARTICIPAÇÃO EM
PESQUISA CIENTÍFICA**

Estou ciente de haver concordado em participar, voluntariamente, da pesquisa que vem sendo realizada pelo Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, IBILCE-UNESP de São José do Rio Preto - SP juntamente com o Instituto de Química, UNESP Araraquara - SP. Para tanto, responderei um questionário e fornecerei urina para análise.

Fui informado também de que os resultados a serem obtidos só serão válidos quando analisados em conjunto, nunca individualmente. Esse estudo poderá ser apresentado em publicações científicas sem a minha identificação.

São José do Rio Preto, ____ de ____ de 199__.

nome

assinatura



Para Uso do Pesquisador

Número Código Data/...../.....

QUESTIONÁRIO DE SAÚDE PESSOAL

Por favor, leia as seguintes questões cuidadosamente e responda-as o mais completo e corretamente possível. A informação dada não será associada com seu nome em nenhum documento público e será revelada somente ao investigador responsável por este estudo. As respostas que você fornecer podem ter um papel direto na interpretação de nossos resultados.

HISTÓRIA PESSOAL

1.Nome:

2.Idade:

3.Data de Nascimento:

Dia

Mês

Ano

4. Sexo: () Masculino () Feminino

5. Grupo Étnico:

a) cor da pele:

b) descendência:

6. Estado Civil: () Casado(a) () Solteiro(a) () Divorciado(a)

() Separado(a) () Viúvo(a)

7. Quantos filhos naturais? (não incluir adotados ou enteados e considerar as crianças naturais que moram separadamente)

HISTÓRIA PROFISSIONAL PRESENTE E PASSADA

8. Trabalha atualmente? () Sim () Não



9. Qual o nome da empresa que você trabalha agora, se não, o nome da última que trabalhou.....

10. Quanto tempo você trabalha nessa companhia?.....

11. Se menos do que 10 anos, qual companhia trabalhou previamente e por quanto tempo?.....

12. Que tipo de trabalho você fez ou faz?
.....
.....
.....

HISTÓRICO DE EXPOSIÇÃO

13. Você tem sido exposto, em seu emprego, a algum dos seguintes compostos químicos?

13.1. Quando você foi exposto pela primeira vez? (meses ou anos)

13.2. Quando você foi exposto pela última vez? (meses ou anos)

13.3. Quanto tempo em termos de dias, meses ou anos, no total, você foi exposto?

Asbestos	() sim	1.....
(amianto)	() não	2.....
		3.....
Radiação	() sim	1.....
	() não	2.....
		3.....
Produtos	de () sim	1.....
Carvão	() não	2.....
		3.....
Cinzas	(de () sim	1.....
madeira, couro ou	() não	2.....
partículas finas de		3.....
metal)		
Pesticidas	() sim	1.....
/Herbicidas	() não	2.....
		3.....

Produtos	de	() sim	1.....
petróleo		() não	2.....
			3.....
Tintura		() sim	1.....
		() não	2.....
			3.....
Solventes		() sim	1.....
		() não	2.....
			3.....
Outros químicos		() sim	1.....
(especificar no		() não	2.....
item 15)			3.....

14. Listar os nomes de algumas substâncias específicas às quais você sabe ter sido exposto por aspiração ou contato direto com a pele no trabalho ou no último ano ou dentro dos últimos dez anos.

14.1. Nos últimos 12 meses:

.....

.....

.....

14.2. Qual a frequência mensal de exposição?

.....

.....

14.3. Dentro dos últimos 10 anos?

.....

.....

14.4. Com que frequência mensal nesses últimos 10 anos?

.....

.....

15. Listar alguma exposição a agentes químicos ou físicos que você se submeteu nos últimos 10 anos enquanto praticava um passatempo ou qualquer outra atividade em casa ou em outro ambiente não profissional. Consulte na lista da questão nº13 mas não limite suas respostas somente àquelas substâncias.

15.1. Nos últimos 12 meses:

.....

.....



15.2. Qual a frequência mensal de exposição?

.....

.....

15.3. Dentro dos últimos 10 anos?

.....

.....

15.4. Com que frequência mensal nesses últimos 10 anos?

.....

.....

.....

HISTÓRIA DE CIGARRO

16. Você fuma constantemente? ☐ sim ☐ não Se **não** vá para a questão 17

Se **sim**:

a) Há quanto tempo você fuma.....

b) Você fuma atualmente? ☐ sim ☐ não

Se **sim** proceda em diante.

Se **não**, quando parou de fumar?

.....

Há quanto tempo parou de fumar?

.....

Proceda para a questão 16f

c) Você usualmente fuma cigarros? ☐ sim ☐ não

Se **sim**, quantos maços por dia ☐ menos que meio/dia

☐ meio a um maço/dia

☐ mais que um:

quantos/dia ?

Você fuma cigarros com filtro? ☐ sim ☐ não

Qual sua marca usual?.....

d) Você fuma frequentemente charutos? ☐ sim ☐ não

Se **sim**, quantos charutos/dia? ☐ 1 charuto?

☐ 2 -3 charutos/dia?

☐ 4 ou mais charutos?

e) Você fuma frequentemente cachimbo? ☐ sim ☐ não

Se **sim**, quantos/dia? ☐ 1/dia?

() 2-3/dia?

() 4 ou mais?

f) O que fumou no passado?

() cigarro?

() charuto?

() cachimbo?

g) Você mastiga fumo frequentemente? () sim () não

h) Você usualmente usa rapé? () sim () não

17. Você tem usado algum medicamento prescrito por um médico nos últimos 12 meses (por exemplo: comprimidos para pressão sanguínea, antibióticos, antiinflamatórios, antidepressivos, insulina, tranquilizantes, relaxantes musculares e etc.)?

() sim

() não

Se sim, qual o tipo de medicação, a dose, a quantidade/dia e o período de tempo (mês de início e de término)?

.....

.....

.....

.....

18. Você usou alguma medicação não prescrita nos últimos meses (por exemplo: aspirina, antiácidos, antihistamínicos, sedativos, ou outras drogas)?

() sim

() não

Se sim, qual o tipo de medicação, a dose, a quantidade/dia e o período de tempo (mês de início e de término)?

19. Você toma alguma vitamina frequentemente ou tomou nos últimos 6 meses?

() sim

() não

Se sim, que tipo de vitamina, qual a dose e a quantidade por semana?

.....

.....

.....

.....

20.a. Você já teve ou tem alguma das seguintes enfermidades?

- () Câncer
() Hepatite
() Mononucleose
() Herpes
() Aids
() Meningite
() Infecção bacteriana ou viral
() Doença cardiovascular
() Diabetes
() Outras enfermidades

b. Se teve outras enfermidades, por favor especifique qual, quando adoeceu e qual o tratamento indicado.

Doença(s).....

Período de Enfermo

Tratamento.....

c. Listar algumas outras doenças e os tratamentos que você se submeteu dentro dos últimos 12 meses (estes devem incluir gripes, resfriados etc.)

Doença(s).....

Período de Enfermo

Tratamento.....



d. Listar algumas vacinações que você recebeu nos últimos 12 meses.

Tipo de Vacina.....

Data administrada.....

e. Listar qualquer raio X diagnóstico ou terapêutico que você recebeu nos últimos 10 anos.

Reação ao raio X

Ano Recebido

f. Você já fez algum raio X dentário? () sim () não

- Se sim, () no último mês
() nos últimos 6 meses
() nos últimos 6-12 meses
() mais de um ano atrás

g. Você fez alguma cirurgia no ano passado? () sim () não

Se sim, relacione o motivo e a data.

h. Você teve alguma febre alta durante o ano passado? () sim () não

Data

Doença Associada

Medicação utilizada

HISTÓRIA DA DIETA

(deve refletir somente hábitos frequentes)

21. Você come vegetais?

() sim () não

22. Você come carne?

() sim () não



22.a. Se sim, como você come frequentemente os seguintes alimentos:

Dias/semana

nunca

1-2

3-4

5-6

todo dia

Bife.....

Peixe.....

Frango.....

Porco.....

Outros.....

b. Como você prefere o bife?

() mau passado () no ponto () bem passado

23.a. Você usa adoçante? () sim () não

b. Quanto por dia?.....

24.a. Você toma bebida dietética? () sim () não

b. Quanto por dia?.....

25. Comente a respeito de uma dieta específica não citada nas questões acima, por exemplo, dieta especial tal como, altas doses de proteínas, baixos níveis de carboidratos, etc.

26.a. Você toma café? () sim () não

b. Se sim, quanto por dia ?

c. Descafeinado? () sim () não

b. Se sim, quanto por dia ?

27.a. Você toma chá? () sim () não

b. Se sim, quanto por dia ?

28.a. Você toma cerveja? () sim () não



b. Se sim, por favor indique sua média de consumo semanal:

☐ 1-6 garrafas ou canecas/semana

☐ 7-12 garrafas/semana

☐ 13-24 garrafas/semana

☐ mais do que 24 garrafas/semana; se esta categoria for escolhida, qual é a sua média de consumo de cerveja por semana? garrafas ou canecas/semana.

29. Você bebe vinho? ☐ sim ☐ não

Se sim, por favor indicar a media de vinho consumido semanalmente:

☐ 1-4 copos/semana

☐ 5-8 copos/semana

☐ 9-16 copos/semana

☐ mais do que 16 copos por semana. Se esta categoria for escolhida, qual a média de consumo de vinho semanal? copos por semana.

30. Você bebe outra bebida alcoólica? (excluindo cerveja e vinho). ☐ sim ☐ não

Se sim, por favor indicar a média consumida semanalmente.

☐ 1-4 copos/semana

☐ 5-8 copos/semana

☐ 9-16 copos/semana

☐ mais do que 16 copos por semana. Se esta categoria for escolhida, qual a média de consumo semanalmente? copos por semana.

31. Você frequenta usualmente a sauna ou faz banhos quentes? ☐ sim ☐ não

Quão frequentemente?

Quão recentemente?

HISTÓRIA GENÉTICA

32. Você tem conhecimento de algum defeito de nascimento ou outra doença genética ou doença herdada que afeta seus pais, irmãos, irmãs ou seus filhos?

☐ sim ☐ não

Se sim, por favor especificar

33.a. Você ou a sua esposa já tiveram dificuldade em engravidar (por um período de pelo menos 12 meses) ou já foram diagnosticados como inférteis?

() sim

() não

Se sim, por favor especificar (indicar quando ocorreu a dificuldade ou quando recebeu o diagnóstico):

.....

.....

.....

33.b. Você já fez uma análise de sêmen? () sim () não

34. Você ou sua esposa já tiveram crianças com defeitos de nascimento ou outras doenças genéticas ou doenças herdadas? () sim () não

Se sim, por favor especificar (indicar quando a criança nasceu e a natureza da doença):

.....

.....

.....

35. Você ou sua esposa podem relatar a ocorrência de algum tipo de aborto?

() sim

() não

36. Você tem um casal de gêmeos vivos?

() sim

() não

37. Sua esposa (ou mãe de um filho) apresentou parto tranquilo?

() sim

() não



11.2 - Anexo 2

Procedimento de Lavagem de Material

Toda vidraria utilizada na metodologia de extração foi imersa em solução 5% de detergente Extran neutro e ultrassonicada por 20 minutos. Em seguida enxaguadas por várias vezes em água de torneira, água destilada e água Milli - Q e secadas em estufa. Os frascos foram envolvidos em papel alumínio e guardados.

As vidrarias utilizadas nos ensaios de mutagenicidade foram esterilizadas em autoclave a 121° C por 1 hora. Foram imersas em solução 5% de detergente Extran neutro por 24 horas e em seguida enxaguadas seqüencialmente, por várias vezes, com água de torneira, água destilada e água Milli - Q. Após a secagem em estufa e devidamente embrulhadas foram esterilizadas em forno a 180° C por 1 hora.



