

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

**“AVALIAÇÃO DE APOPTOSE INDUZIDA POR EXTRATO ORGÂNICO DE
MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO, RICO EM
HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS, NA REGIÃO
URBANA DE ARARAQUARA DURANTE A SAFRA E ENTRESSAFRA DE
CANA-DE-AÇÚCAR.”**

**Dissertação apresentada ao curso de Pós-
Graduação em Biociências e Biotecnologia
Aplicadas à Farmácia da Faculdade de Ciências
Farmacêuticas – UNESP- Araraquara como
pré-requisito para obtenção do título de mestre.**

Mestranda: Isabel Cristiane da Silva
Orientadora: Prof^a Christiane Pienna Soares

ARARAQUARA
2009

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

**“AVALIAÇÃO DE APOPTOSE INDUZIDA POR EXTRATO ORGÂNICO DE
MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO, RICO EM
HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS, NA REGIÃO
URBANA DE ARARAQUARA DURANTE A SAFRA E ENTRESSAFRA DE
CANA-DE-AÇÚCAR.”**

Mestranda: Isabel Cristiane da Silva
Orientadora: Prof^a Christiane Pienna Soares

ARARAQUARA
2009

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

Silva, Isabel Cristiane da

S586a Avaliação de apoptose induzida por extrato orgânico de material particulado atmosférico, rico em hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, na região urbana de Araraquara durante a safra e entressafra de cana-de-açúcar / Isabel Cristiane da Silva. – Araraquara, 2009.
113 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista.
“Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia

Orientador: Christiane Pienna Soares

1. Poluição do ar. 2. Queima de cana-de-açúcar. 3. HPAs. 4. Apoptose. 5. Necrose. I. Soares, Christiane Pienna, orient. II. Título.

CAPES: 40300005

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a.Dr^a. Christiane Pienna Soares (orientadora e presidente)

Prof^a.Dr^a. Mary Rosa Rodrigues de Marchi (membro titular)

Prof^a.Dr^a. Eliana Aparecida Varanda (membro titular)

Prof^a.Dr^a.Raquel Alves dos Santos (membro suplente)

Prof^a.Dr^a.Ana Marisa Fusco Almeida (membro suplente)

Araraquara, 04 de dezembro de 2009

“ O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis.”

Fernando Pessoa

Dedico este trabalho aos meus queridos pais Ana e Edevaldo, ao meu irmão Fernando e ao Bruno.

AGRADECIMENTOS

Este espaço é dedicado a todos que participaram direta ou indiretamente e que estiveram ao meu lado durante realização deste trabalho. A todos eles deixo aqui o meu sincero agradecimento.

À Prof^a. Dr^a. **Christiane Pienna Soares**, minha orientadora, pela motivação, dedicação, apoio e conhecimento com que me conduziu ao longo desse trabalho.

À Prof^a. Dr^a **Mary Rosa de Marchi** por disponibilizar seu laboratório e pelas sugestões, e ao seu aluno **Flavio** por me acompanhar em alguns experimentos e me ajudar sempre que precisei.

À Prof^a. Dr^a **Eliana Aparecida Varanda** por todas as suas proveitosas sugestões.

Ao Dr **Marcos Arbex** e sua secretária **Marisa** pela disponibilização dos filtros.

À Prof^a **Maria José Mendes Gianini** por disponibilizar alguns equipamentos de seu laboratório para a execução deste trabalho.

Às meninas do laboratório de micologia **Ju e Roberta**.

À **Fabiana** de Ribeirão pela ajuda com o citômetro.

Ao pessoal do laboratório que de alguma maneira colaboraram para a realização deste trabalho, com críticas e sugestões sempre construtivas. Obrigada pela amizade e convivência: **Aline, Angélica, Camilinha, Dani, Elaine, Helô, Jamile, Mauro, Maura, Roberta, Rochane e Tarsia**.

Ao técnico **Max** pelos divertidíssimos ensinamentos de vida rsrs.

Aos queridos amigos que fiz no decorrer deste trabalho: **Ana, Andréa, Flávio e Juninho** pelos momentos de descontração pós-trabalho sempre muito divertidos.

Às secretárias da pós-graduação: **Claudia, Laura e Sônia**

Às secretárias do departamento **Eliana e Tirene**.

Aos meus queridos amigos que começaram a trilhar o mesmo caminho junto comigo. Meus olhos não mais podem vê-los sempre, mas carrego-os sempre no meu pensamento e coração: **Amana, Andressa, Bruna, Dani, Danilo e Livia** e **Rafinha** (onde quer que você esteja).

À minha família que sempre me apoiou e torceu muito por mim: **Tia Zilda, Tio Luís, Tio Lauro, Tia Rosana, Tio Ivo, Tia Ana**.

Ao meu irmão **Fernando** pelo carinho, atenção e por ser meu “personal tecnólogo” em informática.

Ao **Bruno**, pelo seu apoio incondicional, pela paciência nos dias mais difíceis, pelas horas de espera intermináveis, pelos fins de semana perdidos, pelo seu colo, pela sua companhia e por todos os incentivos. Obrigada por me mostrar que era eu capaz.

Aos *meus pais*, pela constante força, carinho e amor durante toda a vida. Sem eles nada disto seria possível. Mesmo nas situações mais complicadas o apoio de vocês foi muito importante para que conseguisse concluir o objetivo a que me propus.

À **CAPES** pela concessão da bolsa de mestrado e ao **CNPq** pelo apoio financeiro que foi fundamental para a execução deste trabalho.

SUMARIO

LISTA DE FIGURAS.....	09
LISTA DE TABELAS.....	11
ABREVIATURAS.....	12
ABSTRACT.....	14
RESUMO.....	16
1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Poluição Atmosférica.....	19
1.2 Material Particulado (PM).....	20
1.3 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.....	24
1.3.1 Formação e propriedades físicas dos HPAs na atmosfera.....	28
1.4 Padrões de qualidade do ar.....	30
1.5 Cana-de-açúcar.....	35
1.6 Morte Celular Programada.....	39
1.6.1 Necrose.....	40
1.6.2 Apoptose.....	40
1.7 Ensaio Anexina V/ FITC.....	45
1.8 Ensaio Hoechst 33342.....	46
2 OBJETIVOS.....	47
2.1 OBJETIVO GERAL.....	48
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1 Caracterização meteorológica do local de Amostragem.....	50
3.2 Coleta do material particulado atmosférico total (PTS).....	51
3.3 Extração do material particulado total.....	53

3.4 Análise Cromatográfica dos extratos orgânicos.....	54
3.5 Cultura de células.....	56
3.6 Ensaio de MTT.....	57
3.7 Anexina V.....	58
3.8 Hoechst 33342 e Iodeto de Propídeo.....	59
3.9 Análise Estatística.....	60
4 RESULTADOS.....	61
4.1 Concentração de PTS.....	62
4.2 Análise Cromatográfica dos extratos	63
4.3 Concentração de HPAs.....	66
4.4 Ensaio de Citotoxicidade.....	71
4.5 Ensaio de Anexina V.....	74
4.6 Ensaio de Hoechst 33342.....	80
5 DISCUSSÃO.....	87
6 CONCLUSÕES.....	95
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Partículas grossa, fina e ultrafina.....	21
FIGURA 2. Representação esquemática dos eventos hipotéticos após exposição a partículas ultrafinas e finas.....	22
FIGURA 3. Estruturas dos HPAs considerados prioritários pelo NIOSH.....	26
FIGURA 4. Características morfológicas de apoptose e necrose.....	41
FIGURA 5. Ativação da Apoptose pelas vias Extrínseca e Intrínseca.....	42
FIGURA 6. Imagem obtida por satélite (Google Earth) do centro da cidade de Araraquara.....	51
FIGURA 7. Aparelho portátil HANDI-VOL que foi instalado na sacada do edifício localizado no centro da cidade.....	52
FIGURA 8. Imagem obtida por satélite (Google Earth) de Araraquara e os canais que circundam a cidade.....	52
FIGURA 9A. Cromatograma obtido nas análises por HPLC/Flu dos extratos das amostras de material particulado atmosférico na época de (A) safra.....	64
FIGURA 9B. Cromatogramas obtidos nas análises por HPLC/Flu dos extratos das amostras de material particulado atmosférico nas épocas de (B) entressafra.....	65
FIGURA 10. Imagem em microscopia ótica comum da linhagem A549 May Grunwald Giemsa.....	69

FIGURA 11. Imagem em microscopia ótica comum da linhagem A549 May Grunwald Giemsa.....	70
FIGURA 12. Ensaio de Citotoxicidade (MTT) em células A549.....	72
FIGURA 13. Ensaio de Citotoxicidade (MTT) Ajuste das retas segundo modelo sigmoidal de Weibul 2.....	73
FIGURA 14. Avaliação de apoptose e necrose em células A549, utilizando o método de AnexinaV com FITC e Iodeto de Propídeo.....	75
FIGURA 15. Avaliação de apoptose precoce e tardia/necrose em células A549, utilizando o método de AnexinaV com FITC e Iodeto de Propídeo.....	77
FIGURA 16. Avaliação de células vivas em células A549, utilizando o método de AnexinaV.....	79
FIGURA 17. Análise Morfológica do ensaio de apoptose e necrose pelo método de Hoechst.....	80
FIGURA 18. Avaliação de apoptose e necrose em células A549, utilizando o método de Hoechst.....	82
FIGURA 19. Avaliação de apoptose precoce e tardia em células A549, utilizando o método de Hoechst.....	84
FIGURA 20. Avaliação de células vivas em células A549, utilizando o método de Hoechst.....	86

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Classificação de 17 HPAs segundo os grupos de potencial carcinogênico	27
TABELA 2. Características físico-químicas dos HPAs.....	29
TABELA 3. Padrões Nacionais de Qualidade do Ar.....	32
TABELA 4. Critérios para Episódios Agudos de Poluição do Ar.....	33
TABELA 5. Comparação dos Padrões de Qualidade ao redor do mundo.....	34
TABELA 6. Parâmetros meteorológicos da cidade de Araraquara – SP no ano de 2008.....	50
TABELA 7. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para o sistema HPLC/Flu.....	55
TABELA 8. Concentração ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) de PTS coletado durante os períodos de safra e entressafra.....	62
TABELA 9. Concentração (ng/m^3) de HPAs no material particulado atmosférico.....	67

ABREVIATURAS

% - porcentagem

µg – micrograma

BaP – Benzo(a)pireno

cm – centímetro

CV – coeficiente de variação

DAF – Diacetato de Fluoresceína

DCM – Diclorometano

DMSO – Dimetilssulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

FITC – Isotiocianato de Fluoresceína

Flu – Fluorescência

HO - Hoechst

HPA – Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Performance

IP – Iodeto de Propídeo

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

Km – quilômetro

LD – limite de detecção

LQ – Limite de Quantificação

MEOH – metanol

Mg – miligrama

mL – mililitro

Mm – milímetro

Nm – nanômetro

°C – grau Celsius

PBS – Tampão Salina Fosfato

PM₁₀ – Material Particulado com diâmetro de 10µm

PM_{2,5} - Material Particulado com diâmetro de 2,5 µm

PTS – Particulado Total em Suspensão

R² – coeficiente de correlação

SFB – Soro Fetal Bovino

VAC- α – Proteína vascular anticoagulante α

ABSTRACT

The incomplete combustion of sugar cane biomass generates organic compounds rich in polycyclic aromatic hydrocarbons, which are the most important mutagenic and carcinogenic pollutants. The aim of the present study was to evaluate the cytotoxicity and apoptosis induced by the organic extracts of suspended particles from sugar cane harvesting and non-harvesting seasons. The cellular cytotoxicity to A549 cell line was determined using the MTT assay and the cell death (apoptosis and necrosis) was analyzed using the dyes Hoechst 33342 by epifluorescence microscopy and Annexin V-FITC/propidium iodide by flow cytometry. According to the cytotoxicity test, it was observed a dose-response curve, demonstrating a higher cytotoxicity induced by the organic extract from the harvesting season. Both staining assays Annexin V and Hoechst 33342 demonstrated a high percentage of cell death by apoptosis in both harvesting and non-harvesting seasons ($p < 0.0001$). However, the extracts isolated during the harvest induce more apoptosis than the non-harvest season. In the treatment with total suspended particle, a higher percentage of cell deaths induced by early apoptosis in harvesting and non-harvesting seasons were observed. Moreover, a higher cellular viability was found in non-harvesting, in Annexin V and Hoechst 33342 assays, ($p < 0.001$). Our results indicate that the organic extracts isolated from total suspended particulate demonstrate an important toxic effect in cell, inducing early apoptosis in harvesting and non-harvesting season.

Key Words: air pollution, sugar cane burning, PAHs, apoptosis; necrosis.

RESUMO

A combustão incompleta da biomassa de cana-de-açúcar gera compostos orgânicos ricos em hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, os quais são os mais importantes poluentes mutagênicos e carcinogênicos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a citotoxicidade e a apoptose induzida pelos compostos orgânicos de partículas em suspensão na atmosfera durante as estações de safra e entressafra de cana-de-açúcar. A citotoxicidade celular na linhagem celular A549 foi determinada usando o ensaio de MTT; e a morte celular (apoptose e necrose) foi analisada usando os corantes Hoechst 33342 por microscopia de epifluorescência e AnexinaV FITC/ iodeto de propídeo por citometria de fluxo. De acordo com o teste de citotoxicidade, foi observada uma curva dose-resposta, demonstrando maior citotoxicidade induzida por extratos orgânicos extraídos durante a estação de safra. Ambos os ensaios de coloração Anexina V e Hoechst 33342 demonstraram alta porcentagem de mortes celulares por apoptose em ambos os períodos (safra e entressafra) ($p < 0,0001$). No tratamento com partículas totais em suspensão, uma maior porcentagem de mortes celulares induzidas por apoptose precoce foi observada. Além disso uma viabilidade celular maior foi encontrada durante a entressafra nos ensaios de Anexina V e Hoechst 33342 ($p < 0,001$). Nossos resultados indicam que os extratos orgânicos obtidos do particulado total em suspensão demonstram um importante efeito tóxico celular induzindo apoptose precoce nas estações de safra e entressafra.

Palavras-Chave: poluição do ar, queima de cana-de-açúcar, HPAs, apoptose, necrose.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Poluição Atmosférica

A poluição atmosférica pode ser definida como a presença de substâncias estranhas na atmosfera resultantes da atividade humana ou de processos naturais (Elson 1992) sendo o impacto ambiental definido pelo Artigo 1º da Resolução CONAMA 1/86, como:

[...], qualquer alteração das propriedades físicas, químicas e biológicas do meio ambiente, causada por qualquer forma de matéria ou energia resultante das atividades humanas que, direta ou indiretamente, afetam: I. a saúde, a segurança e o bem-estar da população; II. as atividades sociais e econômicas; III. a biota; IV. as condições estéticas e sanitárias do meio ambiente; V. a qualidade dos recursos ambientais.

A poluição atmosférica representa uma complexa mistura que consiste de algumas centenas de substâncias que ocorrem em baixas concentrações no ar e que podem estar presentes tanto na forma gasosa quanto na forma de material particulado ou ambos (ŠKAREK *et al.*, 2007). Embora uma quantidade de atividades naturais (ex.vulcões) possam liberar diferentes poluentes no ambiente, atividades antropogênicas são a principal causa de poluição ambiental. A determinação de que uma substância apresenta ou não riscos a saúde humana é baseada em estudos clínicos, epidemiológicos e/ou animais (KAMPA *et al.*, 2008).

A queima de biomassa, em ambientes externos e internos, utilizada desde a pré-história para produção de energia, e tem sido uma das importantes fontes

antropogênicas de poluição atmosférica. A partir da Revolução Industrial, surgiram novas fontes de poluição do ar resultantes da queima de combustíveis fósseis nos motores a combustão e nas indústrias siderúrgicas. Mais recentemente, nos veículos

automotivos, além dos produtos químicos (CANÇADO *et al.*, 2006).

1.2 Material Particulado (PM)

É um termo genérico usado para um tipo de poluentes atmosféricos, consistindo de uma mistura complexa e variada de partículas suspensas no ar, que variam em tamanho e composição, são produzidas por uma grande variedade de atividades naturais e antropogênicas (POSCHL *et al.*, 2005). Sua composição e tamanho dependem das fontes de emissão. No entanto, seus componentes principais são metais, compostos orgânicos, materiais de origem biológica, íons, gases reativos.

As partículas podem ser divididas em três grupos: a) Partículas grandes com diâmetro maior que 2,5µm emitidas através de combustão descontrolada, dispersão mecânica do solo ou outros materiais da crosta terrestre (polen, esporos e materiais biológicos também se encontram nesta faixa de tamanho); b) partículas finas, com diâmetro entre 0,1 e 2,5µm emitidas pela combustão de fontes móveis e estacionárias, como automóveis, incineradores e termoelétricas; c) partículas ultrafinas com diâmetro menor que 0,1µm (ARBEX, 2001; CANÇADO *et al.*, 2006a). As partículas finas e grandes são definidas pelos seus mecanismos de formação, tamanho, fontes, composição química e processos de remoção, e também por outros aspectos como concentração, exposição, dosimetria (relação entre quantidade de PM exposto e a dose inalada de PM retida no sítio alvo), toxicologia e epidemiologia (US EPA, 2003).

O material particulado é constituído em seu maior percentual (94%) por partículas finas e ultrafinas (Figura 1.; DONALDSON *et al.*, 2001). O tamanho das partículas determina o sítio do trato respiratório em que elas irão se depositar: Partículas grandes (com diâmetro maior que 2,5 µm) se depositam principalmente na parte superior do trato

respiratório enquanto partículas finas $PM_{2,5}$ são capazes de alcançar os alvéolos pulmonares. (KAMPA *et al.*, 2008). À medida que vão se depositando no trato respiratório, essas partículas passam a ser removidas pelos mecanismos de defesa. O primeiro deles é o espirro, desencadeado por grandes partículas que, devido ao seu tamanho, não conseguem ir além das narinas, onde acabam se depositando. Outros importantes mecanismos de defesa são a tosse e o aparelho mucociliar. As partículas finas e ultrafinas atingem as porções mais distais das vias aéreas transpõem a barreira epitelial, atingem o interstício pulmonar e são responsáveis pelo desencadeamento do processo inflamatório (Figura 2.; DONALDSON *et al.*, 2001). O mecanismo de defesa desencadeado por essas partículas é a fagocitoses pelos macrófagos alveolares, e em seguida a remoção via aparelho mucociliar ou sistema linfático (CANÇADO *et al.*, 2006a).

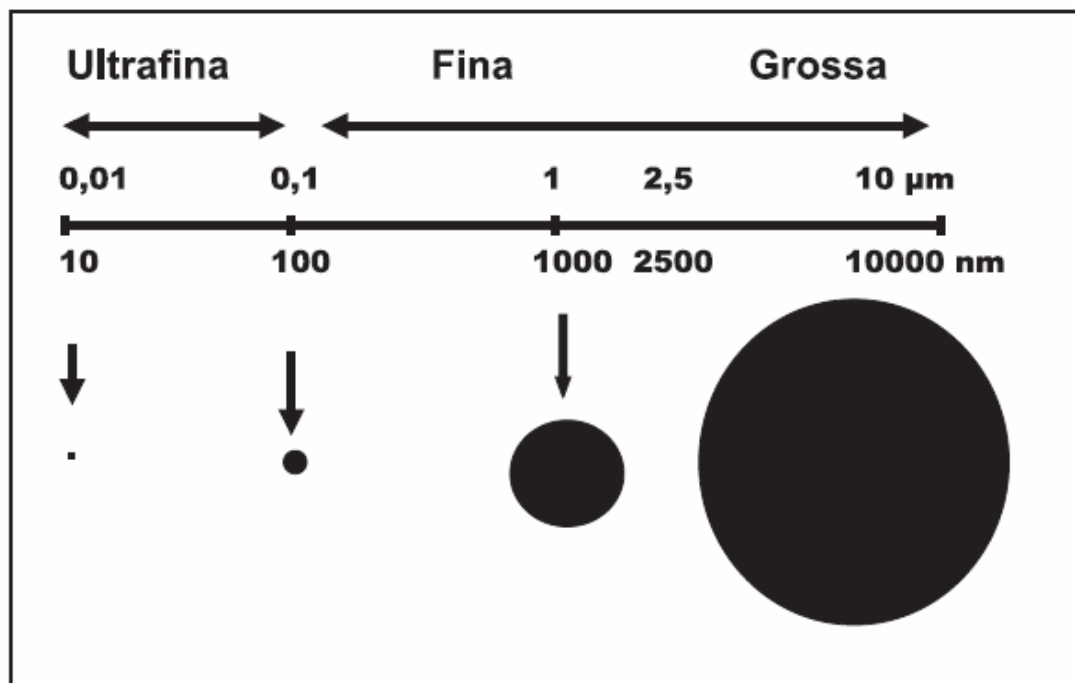


Figura 1. Partículas grossa, fina e ultrafina. Extraído de DONALDSON *et al.* , 2001

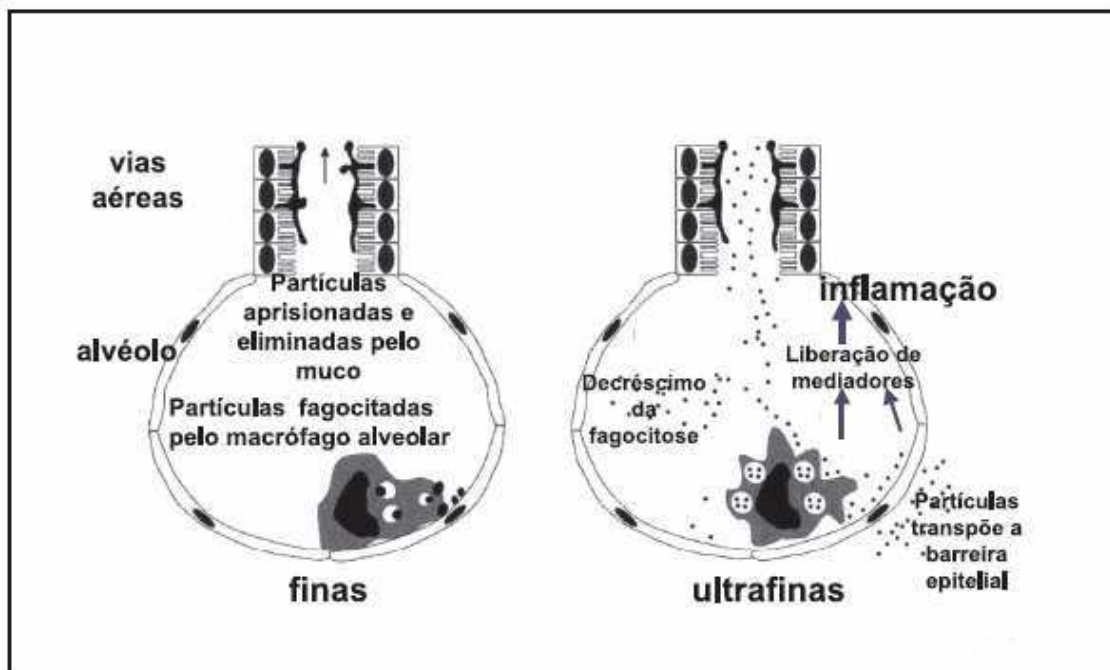


Figura 2. Representação esquemática dos eventos hipotéticos após exposição a partículas ultrafinas (direita) quando comparado com a exposição a partículas finas (esquerda). O elemento essencial à resposta ultrafina é um grande número de partículas fora e dentro dos macrófagos. Há liberação de mediadores pelo macrófago e pela célula epitelial devido à ativação de vias mediadas por stress oxidativo, que conduzem à inflamação. Extraído de Donaldson *et al.*, 2001

O material particulado pode ser primário ou secundário: São denominados de PM primário se estão na mesma forma química em que foram emitidos na atmosfera e são denominados de PM secundário se são formados a partir de reações químicas na atmosfera. As partículas primárias grandes são usualmente formadas por processos que incluem: poeira carregada pelo vento, sal marinho, poeira da estrada e combustão gerada por cinzas e fuligem. Partículas finas primárias são emitidas diretamente tanto

como partículas como por vapores que rapidamente se condensam, isto inclui fuligem de motores à diesel, uma grande variedade de compostos orgânicos condensados a partir de combustão incompleta, e compostos de As, Se, Zn, etc, que se condensam a partir do vapor formada na combustão. O PM secundário é formado por reações químicas termodinâmicas e não termodinâmicas adsorvidas, ou gases dissolvidos. A maioria dos PM secundários finos é formada a partir de vapores condensáveis gerados por reações químicas de precursores de fase gasosa. A formação secundária pode resultar em processos de formação de novas partículas ou a adição de material particulado à partículas pré-existentes. A maior parte do sulfato e nitrato e uma porção de partículas de compostos orgânicos na atmosfera são formadas por reações químicas na atmosfera (US EPA, 2003).

Em relação ao transporte e destino das partículas em suspensão no ar, as partículas finas possuem uma longa vida na atmosfera (dias a semanas) percorrendo grandes distâncias (centenas a milhares de quilômetros) apresentando distribuição uniforme sobre áreas urbanas e como resultado, não podem ser facilmente identificadas as suas fontes individuais; por outro lado partículas grandes têm uma duração menor na atmosfera (minutos a horas) sendo transportadas por distâncias pequenas (menos de 10 quilômetros), portanto, tendem a ser distribuídas desigualmente sobre áreas urbanas apresentando efeitos mais localizados (US EPA, 2003).

A genotoxicidade e mutagenicidade da fração orgânica do material particulado especialmente PM₁₀ e PM_{2,5}, tem sido objeto de alguns estudos (CHAKRA *et al.*, 2007; SHARMA *et al.*, 2007; SOARES *et al.*, 2003; ZHAO *et al.*, 2003) e presume-se que a mutagênese presente nas células expostas contribui para o aparecimento e desenvolvimento do câncer (BOFFETTA, 2006; BÖSTROM *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2006).

1.3 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) são uma grande classe de compostos orgânicos que ocorrem como poluentes no ar, nos alimentos e na água. Estão presentes em todos os processos de combustão sendo conhecidos pelos seus intensos efeitos mutagênicos e carcinogênicos. São atualmente considerados como uma das mais importantes causas de efeitos adversos à saúde relacionados à poluição atmosférica (ŠKAREK *et al.*, 2007). Os HPAs constituem uma família de compostos de anéis aromáticos fundidos, mas também podem ser formados por compostos insaturados de 4, 5 e 6 anéis, dentro do grupo, os compostos variam de moléculas semi-voláteis a moléculas com alto ponto de ebulição (BÖSTROM *et al.*, 2002). Suas principais fontes são: processos industriais (ex. produção de alumínio, gaseificação de carvão, produção de coque e fundição de aço e ferro), emissões do tráfego rodoviário e combustíveis domésticos (WHO, 1998). Outras fontes incluem incêndios naturais, agrícola e tabaco, sendo que a fumaça do cigarro é a maior fonte individual de exposição aos HPAs, e também constituem uma importante fonte de contaminação em alimentos podendo estar presentes durante o processamento e preparo (PUFULETE *et al.*, 2004).

As emissões provenientes da queima biomassa como madeira, papel, lixo, floresta são consideradas como grandes concentradoras de carbono orgânico e as taxas de emissão de partículas são comparáveis a alta eficiência das fontes de combustíveis fósseis. A queima de biomassa inclui queima de florestas, queima controlada e descontrolada de culturas agrícolas, esses produtos de combustão vegetal também emitem os HPAs mutagênicos e carcinogênicos tal como fazem todas as fontes de combustão incompleta (IARC, 2006).

Dezesseis HPAs estão incluídos como poluentes prioritários pela Agência de Proteção Ambiental - EPA (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY,1998), enquanto o Instituto Nacional de Saúde e Segurança Ocupacional – NIOSH (NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH, 1998) prioriza dezessete HPAs para investigação. O composto adicional na lista NIOSH é o Benzo[e]pireno. A Figura 3 apresenta as estruturas dos dezessete HPAs tidos como poluentes prioritários pelo NIOSH.

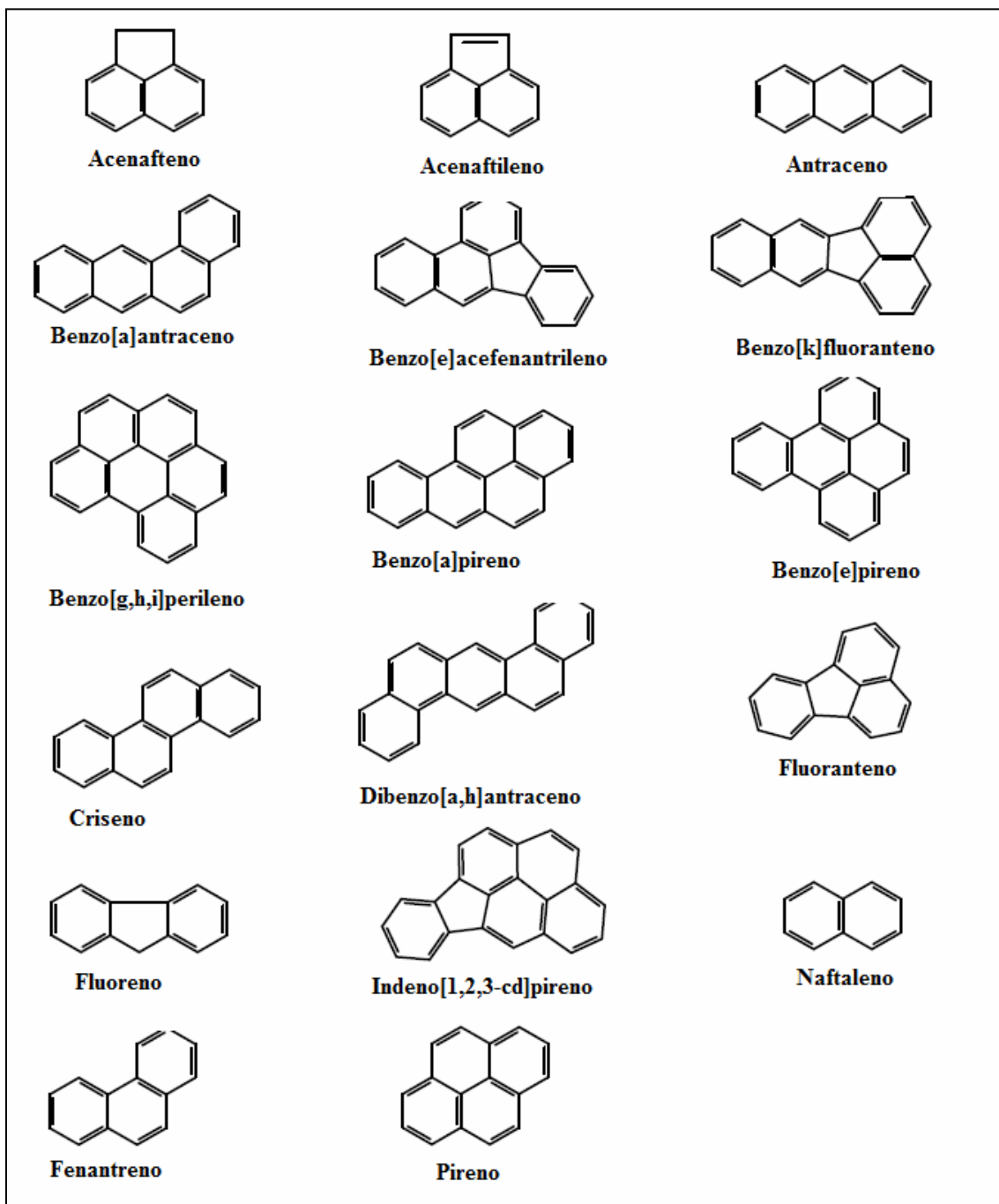


Figura 3. Estruturas dos HPAs considerados prioritários pelo NIOSH (National Institute of occupational Safety and Health, 1998)

A Agência para pesquisa em Câncer (IARC) classifica alguns HPAs de acordo com seu potencial carcinogênico em grupos (IARC, 2006, IARC 2009):

- Grupo 1: o composto é carcinogênico aos humanos.
- Grupo 2: o composto é provavelmente carcinogênico. Este grupo compreende
 - Subgrupo 2A: probabilidade de ser carcinogênico aos humanos.
 - Subgrupo 2B: possibilidade de ser carcinogênico aos humanos.
- Grupo 3: não classificado quanto à carcinogenicidade aos humanos.
- Grupo 4: o composto provavelmente não é carcinogênico aos humanos.

A Tabela 1 apresenta os 17 HPAs prioritários agrupados, segundo a classificação do IARC.

Tabela 1. Classificação de 17 HPAs segundo os grupos de potencial carcinogênico (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2008)

Grupo 1	Grupo 2 A	Grupo 2B	Grupo 3
			Acenaftileno
			Acenafteno
		Naftaleno	Antraceno
		Benzo[e]acefenantrileno	Fluoreno
Benzo[a]pireno	Dibenzo[a,h]antraceno	Benzo[a]antraceno	Fenantreno
		Benzo[k]fluoranteno	Fluoranteno
		Criseno	Benzo[e]pireno
		Indeno[1,2,3cd]pireno	Pireno
			Benzo[g,h,i]perileno

O risco de desenvolvimento de câncer de pulmão pela inalação a uma mistura de HPA pode ser estimada pela concentração individual de determinado HPA como o BaP (GUSTAFSON *et al.*, 2008). Os HPAs são metabolizados via oxidativa para produzir produtos (Ex. epóxi) que reagem covalentemente com os centros nucleofílicos do DNA que resultam em aductos e mutações, iniciando um processo de muitas etapas que desencadeiam efeitos genéticos, danos cardiovasculares e efeitos reprodutivos (LEWTAS *et al.*, 2007).

1.3.1 Formação e propriedades físicas dos HPAs na atmosfera

Os HPAs são formados em processos de combustão incompleta, a altas temperaturas e, deste modo, são essencialmente emitidos por todos os tipos de combustão. Quando a matéria orgânica é queimada, em geral é formada uma grande variedade de HPAs em diferentes níveis de concentração, e a complexidade das misturas de HPAs dependem das fontes emissoras (YUNKER *et al.*, 2002).

Quando os HPAs são lançados na atmosfera, seja devido às atividades antropogênicas ou naturais, eles podem estar presentes em fase gasosa ou adsorvidos a material particulado, e essa distribuição depende da pressão de vapor dos compostos e da temperatura do ambiente. A Tabela 2 apresenta algumas propriedades físicas dos 16 HPAs tidos como poluentes prioritários segundo a Environmental Protection Agency (1998).

Tabela 2. Características físico-químicas dos HPAs

HPA	FM	MM	PF/°C	PE/°C	Sinônimos
Naftaleno	C ₁₀ H ₈	128,17	80,2	218	Nafteno
Acenaftileno	C ₁₂ H ₈	152,20	92,5	280	Acenaftaleno
Acenafteno	C ₁₂ H ₁₀	154,21	93,4	279	
Fluoreno	C ₁₃ H ₁₀	166,22	115	295	
Fenantreno	C ₁₄ H ₁₀	178,23	99,2	340	
Antraceno	C ₁₄ H ₁₀	178,23	215	340	
Fluoranteno	C ₁₆ H ₁₀	202,26	108	384	Benzo[j,k]fluoreno
Pireno	C ₁₆ H ₁₀	202,26	151	404	Benzo[d,e,f]fenantreno
Benzo(a)antraceno	C ₁₈ H ₁₂	228,29	167	435	1,2-benzantraceno; benzo[b]fenantreno; 2,3- benzofenantreno; tetrafeno
Criseno	C ₁₈ H ₁₂	228,29	258	448	1,2-benzofenantreno; benzo[a]fenantreno
Benzo(e)acefenantrileno	C ₂₀ H ₁₂	252,32	168	-	Benzo[b]fluoranteno; 3,4-benzofluoranteno; 2,3-benzofluoranteno
Benzo(k)fluoranteno	C ₂₀ H ₁₂	252,32	217	480	11,12benzofluoranteno
Benzo(a)pireno	C ₂₀ H ₁₂	252,32	177	495	3,4-benzopireno; 6,7-benzopireno
Dibenzo(a,h)antraceno	C ₂₂ H ₁₄	278,35	270	524	1,2,5,6dibenzantraceno
Benzo(g,h,i)perileno	C ₂₂ H ₁₂	276,34	278	-	1,12-benzoperileno
Indeno(1,2,3-cd)pireno	C ₂₂ H ₁₂	276,34	164	-	2,3-fenilenopireno

FM: Fórmula Molecular; MM: Massa Molar (g/mol); CAS- Chemical Abstracts Service; PE: Ponto de Ebulição; PF: Ponto de Fusão.

As emissões das queimadas variam com o tipo de combustível utilizado, intensidade do fogo e fase da combustão (*smoldering* ou *flaming*). A fase *flaming* é caracterizada pela combustão com chamas altas (temperatura de 340°C ou maiores); a fase *smoldering*, com temperaturas mais baixas, é caracterizada pela combustão incompleta, sem chamas ou com pequenas chamas onde a conversão pirolítica da biomassa sem oxigênio, predomina. Os HPAs são emitidos principalmente na forma gasosa, mas uma porção significativa, os HPAs mais pesados, estão associados às

partículas finas carbonadas. A combustão se processa em três estágios: ignição, *flaming*, e *smoldering*. A ignição é o processo inicial no qual se tem pequenas chamas. No segundo estágio a combustão é mais eficiente e há emissão de CO₂, H₂O, N₂, NO_x e SO₂. No terceiro estágio, processo de baixa temperatura e ausência de chama, há emissão de grandes quantidades de compostos oxidados incompletamente: CO, CH₄ e outros hidrocarbonetos particulados. A quantidade de emissão de produtos durante a combustão de biomassa é fortemente dependente da razão da combustão *flaming/smoldering* (CRUTZEN *et al.*, 1990).

Quanto a distribuição gás-partícula, aproximadamente 90% dos HPAs com poucos anéis aromáticos (2 a 3) ocorrem na fase gasosa enquanto que HPAs mais pesados com 5 e 6 anéis são adsorvidos a partículas e HPAs com 4 anéis distribuem-se entre as duas fases (RE-POPPI & SANTIAGO-SILVA, 2005; WHO, 1998). VAN VAECK *et al.*, (1979), mostraram que aproximadamente 80% dos HPAs do material particulado estão associados a partículas menores que 1µm. MIGUEL & FRIEDLANDER (1978) demonstraram que 75% do benzo(a)pireno está associado com partículas menores que 0,26µm

1.4 Padrões de qualidade do ar

Um padrão de qualidade do ar define legalmente as concentrações máximas de um componente atmosférico para garantir a proteção da saúde e do bem estar das pessoas. No Brasil os padrões de qualidade são estabelecidos pelo MMA através da Portaria Normativa nº 348 de 14/03/90 e Resolução CONAMA nº 03/90 estabelecendo dois tipos de padrões de qualidade do ar: os primários e secundários.

Os **Padrões primários** de qualidade do ar são as concentrações de poluentes que, ultrapassadas poderão afetar a saúde da população. Podem ser entendidos como níveis máximos toleráveis de concentração de poluentes atmosféricos, constituindo-se em metas de curto e médio prazo.

São **padrões secundários** de qualidade do ar as concentrações de poluentes atmosféricos abaixo das quais se prevê o mínimo efeito adverso sobre o bem estar da população, assim como o mínimo dano à fauna e à flora, aos materiais e ao meio ambiente em geral. Podem ser entendidos como níveis desejados de concentração de poluentes, constituindo-se em meta de longo prazo.

Os parâmetros regulamentados pelo CONAMA são os seguintes: partículas totais em suspensão (PTS), fumaça, partículas inaláveis (PM_{10}), dióxido de enxofre - SO_2 , monóxido de carbono - CO, ozônio - O_3 e dióxido de nitrogênio - NO_2 . Os padrões nacionais de qualidade do ar fixados na Resolução CONAMA nº 3 de 28/06/90 são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Padrões Nacionais de Qualidade do Ar (Resolução CONAMA nº 3 de 28/06/90)

POLUENTE	TEMPO DE AMOSTRAGEM	PADRÃO PRIMÁRIO	PADRÃO SECUNDÁRIO
		$\mu\text{g}/\text{m}^3$	$\mu\text{g}/\text{m}^3$
Partículas Totais em Suspensão	24 horas (1)	240	150
	MGA (2)	80	60
Dióxido de Enxofre	24 horas	365	100
	MAA (3)	80	40
Monóxido de Carbono	1 hora (1)	40.000	40.000
	8 horas	35 ppm	35 ppm
		10.000 (9 ppm)	10.000 (9 ppm)
Ozônio	1 hora (1)	160	160
Fumaça	24 horas (1)	150	100
	MAA (3)	60	40
Partículas Inaláveis	24 horas (1)	150	150
	MAA (3)	50	50

(1) Não deve ser excedido mais que uma vez ao ano.

(2) Média geométrica anual.

(3) Média aritmética anual.

A mesma resolução estabelece ainda os critérios para episódios agudos de poluição do ar. Esses critérios são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Critérios para Episódios Agudos de Poluição do Ar (Resolução CONAMA nº 3 de 28/06/90)

PARÂMETROS	NÍVEIS		
	ATENÇÃO	ALERTA	EMERGÊNCIA
Dióxido de Enxofre ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) - 24 h	800	1.600	2.100
Partículas Totais em Suspensão (PTS) ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) 24 h	375	625	875
SO₂ X PTS ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)x($\mu\text{g}/\text{m}^3$) - 24 h	65.000	261.000	393.000
Monóxido de Carbono (ppm) - 8 h	15	30	40
Ozônio ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) - 1 h	400	800	1.000
Partículas Inaláveis (PM₁₀; $\mu\text{g}/\text{m}^3$) - 24h	250	420	500
< Fumaça ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) - 24 h	250	420	500
Dióxido de Nitrogênio ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) - 1 h	1.130	2.260	3.000

O Brasil ainda não valores estabelecidos para exposição máxima de Dióxido de Nitrogênio, Chumbo, Partículas PM_{2,5} e HPAs e apresenta a maior concentração permitida de PM₁₀ em relação as localidades apresentadas na tabela 5. Apenas a Europa apresenta regulamentação para emissão de HPAs sendo que a média anual permitida é de $1\text{ng}/\text{m}^3$

Tabela 5. Comparação dos Padrões de Qualidade ao redor do mundo

Poluente	Tempo de Amostragem	Concentração Máxima			
		Brasil (1)	EUA (2)	Austrália (3)	Europa (4)
Monóxido de Carbono	8 horas	10.000µg/m ³	10.000µg/m ³	10.000µg/m ³	10.000 µg/m ³
Dióxido de Nitrogênio	1 hora	SR	-	215,9 µg/m ³	200 µg/m ³
	1 ano		100 µg/m ³	54 µg/m ³	-
Ozônio	1 hora	160 µg/m ³	235 µg/m ³	196,3 µg/m ³	120 µg/m ³
	8 hora		147 µg/m ³		
Dióxido de Enxofre	1 dia	365 µg/m ³	366 µg/m ³	209,4 µg/m ³	125 µg/m ³
Chumbo	1 ano	SR	-	0,5 µg/m ³	0,5 µg/m ³
	Média 3 meses		0,15 µg/m ³	-	-
Partícula PM ₁₀	1 dia	240 µg/m ³	150 µg/m ³	50 µg/m ³	50 µg/m ³
Partícula PM _{2,5}	1 dia	SR	35 µg/m ³	25 µg/m ³	-
	1 ano		15 µg/m ³	8 µg/m ³	25 µg/m ³
HPAs	1 ano	SR	SR	SR	1ng/m ³

SR: Sem Regulamentação

(1) Resolução CONAMA nº 3 de 28/06/90)

(2) United States Environment Protection Agency. Disponível em: <http://www.epa.gov/ttn/naaqs/>. Acesso em 12 de dezembro de 2009.

(3) Australian Department of Environment Disponível em: <http://www.environment.gov.au/atmosphere/airquality/standards.html>. Acesso em 12 de Dezembro de 2009.

(4) European Comission Environment. Disponível em: <http://ec.europa.eu/environment/air/quality/standards.htm>. Acesso em 12 de dezembro de 2009.

1.5 Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar (*Saccharum* sp) é certamente a gramínea mais importante economicamente para o Brasil. É cultivada há quatro séculos no litoral do Nordeste. Mais recentemente, através do álcool etílico, essa cultura disseminou-se por quase todos estados brasileiros, estabelecendo-se nos mais diferentes tipos de solos (EMBRAPA, 2009).

O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de cana-de-açúcar ao longo da história. O setor de açúcar e álcool movimenta 6% do PIB e, vista as demandas internacionais e o crescimento da tecnologia flexfuel que segundo projeções da indústria sucroalcooleira, apontam um aumento na produção 50% até o ano de 2010 (MIGUEL, 2005). Segundo dados da Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) para a safra 2008/2009, o total da matéria-prima processada será de 571,4 milhões de toneladas, correspondendo a 13,9% a mais do que a safra passada com uma área utilizada de 7 milhões de hectares (CONAB, 2008).

No estado de São Paulo, 3.890.414 hectares são destinados ao plantio de cana-de-açúcar, correspondendo a 60% da produção nacional com 392,6 milhões de toneladas (IBGE, 2007).

De toda a safra, a maior parte (55%) é destinada à produção de álcool e subprodutos, o que torna o Brasil um grande produtor de etanol: 250 mil barris diários, o equivalente a 3% da produção diária de petróleo da Arábia Saudita, ou ainda 25% da produção do Iraque antes da guerra (MIGUEL, 2005).

Em relação à capacidade industrial, o país dispõe de 393 usinas em operação cadastradas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento até julho de 2008, sendo assim distribuídas: 252 unidades mistas (produzem açúcar e álcool), 126

produzem apenas álcool e 15 produzem somente açúcar (MAPA, 2008).

Em 1975, foi criado o Programa Nacional do Álcool – Proálcool com a finalidade de reduzir a grande dependência do petróleo importado e criar um mercado adicional para os produtores de açúcar, incentivando a indústria automobilística no desenvolvimento e fabricação de carros movidos exclusivamente a álcool. Na primeira fase do Programa, o seu principal objetivo consistia na produção de álcool anidro para a mistura com gasolina.

Em 2003, surge no mercado nacional o veículo *flex-fuel* ou bicombustível, cuja tecnologia permitia o uso de álcool hidratado ou gasolina C, em qualquer proporção da mistura destes, desta maneira, o *flex-fuel* permitiu que o etanol pudesse competir com a gasolina em todo Brasil. Em junho de 2008, o álcool hidratado já era o combustível mais viável economicamente em 19 estados. De janeiro a junho de 2008, os veículos bicombustíveis representaram 87,4 % nas vendas totais de veículos leves (EPE, 2008).

A milenar técnica da queimada é utilizada para agilizar e facilitar o trabalho de corte e desponte manual da cana. Quando a cana amadurece sua folhagem seca possibilita o risco de incêndios acidentais com os trabalhadores no interior do canavial, sendo este, além disso, habitat de animais peçonhentos e também visando aumentar o conteúdo de açúcar devido a evaporação de água (MARINHO & KIRCHHOFF, 1991; ZAMPERLINI *et al.* , 2000).

As queimadas de cana-de-açúcar emitem para a atmosfera uma grande quantidade de gases entre eles o dióxido de carbono (CO₂), e o monóxido de carbono (CO), gases reativos e tóxicos. As queimadas também produzem efeitos significantes na composição e acidez da água da chuva devido à emissão de aerossóis (LARA *et al.*, 2001). Os aerossóis que podem causar prejuízos à saúde humana. Estudos têm mostrado que populações expostas a altos níveis desses poluentes podem aumentar o risco de

desenvolvimento de infecções respiratórias agudas, doença pulmonar obstrutiva crônica, e câncer de pulmão. (SMITH *et al.*, 1999).

O Brasil desempenha um importante papel na queima de biomassa com cerca de 1.734 pontos de queimadas do estado de São Paulo em 2008 (CPTEC, 2008). A maioria das queimadas no Brasil ocorre durante a estação seca, de maio a outubro coincidindo com o período de baixas precipitações pluviométricas e piores condições de dispersão dos poluentes atmosféricos, aumentando dessa forma, as chances de as queimadas terem impactos negativos sobre a qualidade do ar e sobre a saúde das pessoas que vivem nas regiões canavieiras (CANÇADO *et al.*, 2006 b; RIBEIRO, 2008). Aproximadamente 20 toneladas de material seco de cana-de-açúcar são queimadas por hectare, contribuindo para uma emissão global de aproximadamente 0,48 Tg de carbono por ano (LARA *et al.*, 2005). A qualidade do ar nas cidades localizadas em áreas de plantações de cana-de-açúcar no estado de São Paulo se deteriora dramaticamente durante a estação de queima, os níveis de partículas no ambiente aumentam de duas a quatro vezes durante a safra (CANÇADO *et al.*, 2006 b).

Segundo dados de COELHO *et al* (2008), durante o período da safra a concentração média de carbono orgânico dissolvido na água da chuva aumenta cerca de 62% em Araraquara e 144% em Ribeirão Preto. Em contraste com os incêndios acidentais das florestas que são usualmente breves e com alta concentração de material particulado, populações que vivem em áreas rodeadas por plantações de cana-de-açúcar são expostas às partículas geradas pela queima de biomassa continuamente por no mínimo seis meses (ARBEX *et al.*, 2007).

Estudos nas cidades de Araraquara e Piracicaba revelaram uma associação positiva significativa entre o número de inalações diárias em serviço de saúde e a concentração de material particulado gerado pela queima de cana-de-açúcar, além de

aumento da poluição atmosférica, dessa forma, concluiu-se que a queima da palha da cana-de-açúcar é uma importante fonte de poluição atmosférica e que leva a um aumento na morbidade respiratória, sendo este efeito é maior em crianças e idosos de forma semelhante à poluição atmosférica produzida por combustíveis fósseis, em grandes centros urbanos. (ARBEX *et al.*, 2000; CANÇADO *et al.*, 2006 b).

Em um estudo realizado por UMBUZEIRO *et al* (2008) foi possível observar o potencial mutagênico de partículas coletadas durante a safra da cana-de-açúcar pelo teste de mutação reversa com *Salmonella typhimurium* que demonstrou possuir o mesmo grau de mutagenicidade das partículas coletadas nas áreas metropolitanas de São Paulo.

MAZZOLLI-ROCHA *et al* (2008) demonstraram que uma única dose de partículas produzidas pela queima de cana-de-açúcar foi capaz de induzir alterações significantes na mecânica pulmonar e parâmetros histológicos em camundongos Balb/c e também houve mudanças parenquimais similares as encontradas nos animais expostos à partículas coletadas no tráfego, no entanto a mecânica de funcionamento das vias aéreas foi mais afetada pelas partículas da queima de biomassa. Dessa forma as partículas da queima de cana-de-açúcar foram no mínimo tão tóxicas quanto às provenientes do tráfego de São Paulo.

ZAMPERLINI *et al* (2000) mostraram a identificação de 38 compostos originados da fuligem de cana-de-açúcar: Entre eles HPAs presentes na lista de poluentes prioritários da Agência de Proteção Ambiental (EPA), alguns alquil HPAs e derivados tiofenos.

Diante dessas informações, em 19 de setembro de 2002, o governo do Estado de São Paulo publicou a Lei nº 11.241 que dispõe sobre a eliminação do uso do fogo, como método despalhador e facilitador do corte de cana-de-açúcar. Esta lei foi regulamentada

pelo decreto nº 47.700, de 11 de março de 2003, que apresenta em seu artigo 2º uma tabela de eliminação gradativa, com término para o ano de 2031. Entretanto, em junho de 2007, a União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA) e a Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo assinaram um protocolo agroambiental que antecipa os prazos para extinção da queima da palha da cana nos canaviais paulistas (Secretaria do Meio Ambiente, 2007). Os prazos estabelecidos foram: 2014 para áreas mecanizáveis e 2017 para áreas não mecanizáveis, sendo que 85% das usinas do Estado de São Paulo aderiram ao protocolo. No mesmo sentido, em março de 2008, a Organização de Plantadores de Cana da Região Centro-Sul do Brasil (ORPLANA) também aderiu ao protocolo. Ao aderir ao protocolo, o Governo do Estado concede um certificado de Conformidade agroambiental aos produtores de cana.

No entanto, a mecanização do processo de trabalho da cultura de cana-de-açúcar expõe outro problema, o desemprego. A cultura da cana-de-açúcar atualmente é a atividade agropecuária paulista que mais emprega mão-de-obra na colheita. Estima-se um total de aproximadamente 163 mil trabalhadores, empregados na safra 2006/07 com mais de 90% formalizados (FREDO *et al.*, 2008). Infelizmente a grande maioria deste contingente certamente encontrará grandes dificuldades de conseguir outro emprego formal, uma vez que quem trabalha na colheita corresponde à uma população menos qualificada (IEA, 2002).

1.6 Morte Celular Programada

A morte celular programada é um fenômeno biológico que desempenha um papel importante durante o desenvolvimento, preservação da homeostase e eliminação

de células danificadas. Os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas (OKADA & MAK, 2004).

1.6.1 Necrose

A característica principal da necrose é o inchaço e perda da integridade da membrana com um influxo de água e extravasamento de conteúdo celular no ambiente causando dano as células adjacentes (Figura 1.). O metabolismo energético é finalmente interrompido e as organelas celulares se desintegram. Nos tecidos, este tipo de morte celular pode levar a resposta inflamatória (BOUJRAD *et al.*, 2007).

1.6.2 Apoptose

O desenvolvimento e manutenção de um sistema biológico dependem de uma sofisticada interação entre as células que formam o organismo, e algumas vezes parece envolver um comportamento altruístico de células individuais em favor do organismo como um todo. Durante o desenvolvimento, muitas células são produzidas em excesso que eventualmente sofrem morte programada e assim contribuem no desenvolvimento de órgãos e tecidos (MEIER *et al.*, 2000).

A morte programada por apoptose tem sido descrita como uma seqüência de eventos que se inicia com o a retração celular que faz com que a célula perca o contato com as células vizinhas, no núcleo o DNA se condensa formando uma camada ao longo da membrana nuclear interna. Uma célula apoptótica pode se dividir em característicos “corpos apoptóticos” que são vesículas que contém parte do conteúdo celular e que são englobados por macrófagos sem que ocorra resposta inflamatória (Figura 4)

(BOUJRAD *et al.*, 2007; HAIL *et al.*, 2006). Essas mudanças morfológicas são consequência de eventos moleculares e bioquímicos que ocorrem no interior da célula apoptótica, mais notavelmente a ativação de enzimas proteolíticas que são capazes de mediar a clivagem do DNA em fragmentos, bem como a clivagem de substratos protéicos (GEWIES, 2003).

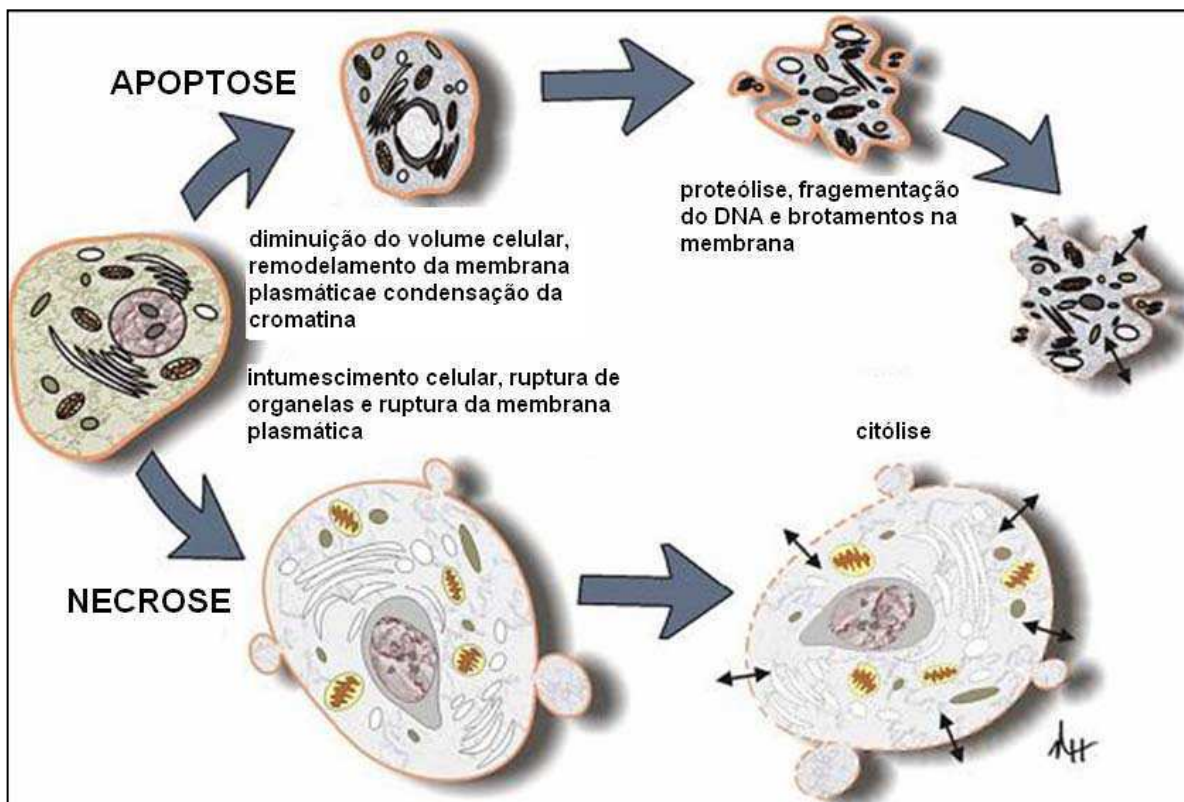


Figura 4. Características morfológicas de apoptose e necrose. Figura adaptada de HAIL *et al.*, 2006.

A maquinaria celular responsável pela apoptose é de uma família de proteases com uma cisteína em seu sítio ativo que clivam as proteínas denominadas caspases. As caspases são divididas em duas categorias: i) caspases iniciadoras que incluem caspases 2, 8, 9 e 10 e, ii) caspases efetoras que incluem: caspases 3, 6 e 7. Todas as caspases são

sintetizadas como um zimógeno inativo, denominadas de procaspases que necessitam de ativação proteolítica durante a apoptose (SHI, 2002). Através de seus prodomínios, as caspases iniciadoras são recrutadas e ativadas para um complexo de sinalização e indução de morte em resposta aos receptores de morte na superfície da célula (via extrínseca de apoptose) ou em resposta a sinais originados no interior da célula (via intrínseca de apoptose) (GREEN & REED, 1998; SUN & PENG, 2009).

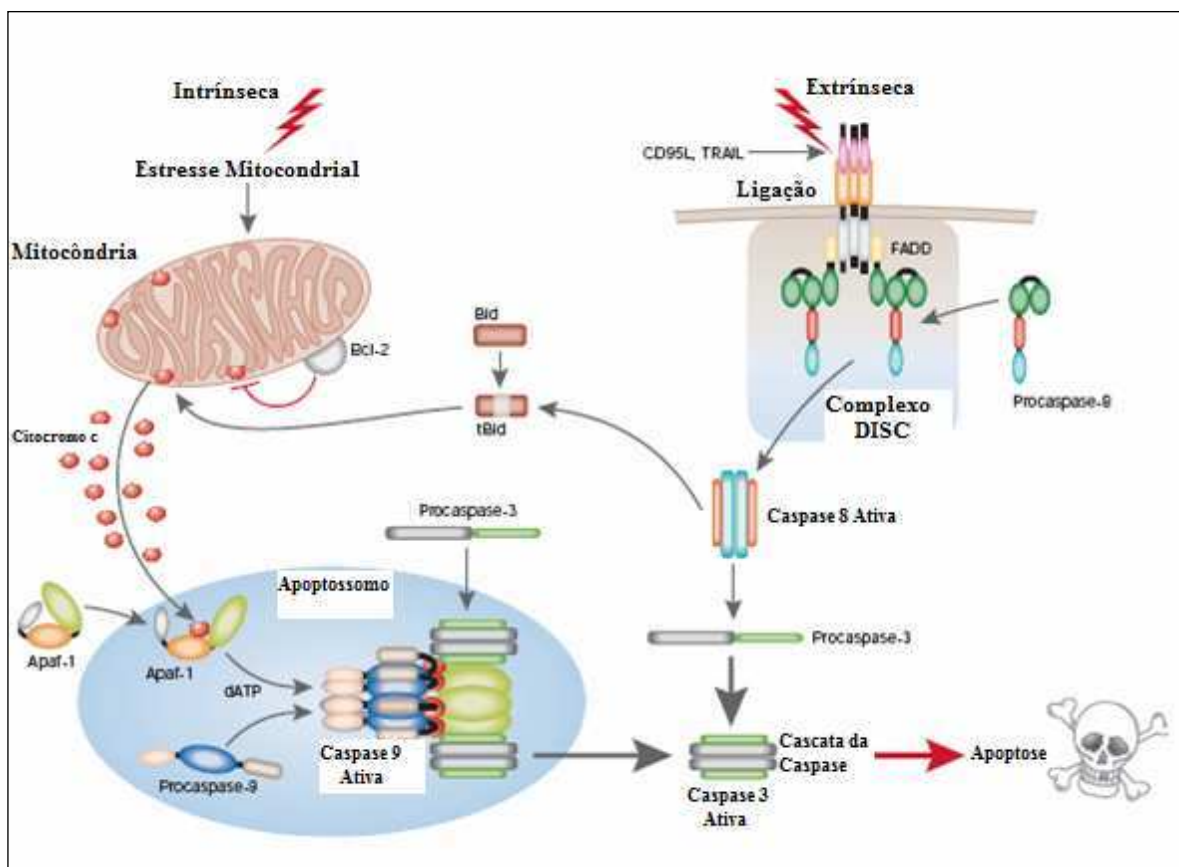


Figura 5. Ativação da Apoptose pelas vias Extrínseca e Intrínseca. Modificado de MACFARLANE & WILLIAMS, 2004.

A via intrínseca é ativada a partir de sinais gerados no interior da célula como dano no DNA, estresse oxidativo, radiação e quimioterapia que levam a ativação de

proteínas pró-apoptóticas (Bax, Bak e tBid). Em seguida, ocorre a ruptura do potencial transmembrânico mitocondrial, também conhecido como permeabilidade de transição, fazendo com que ocorra um influxo de íons e ao mesmo tempo a liberação de proteínas pró-apoptóticas como o citocromo *c* para o citosol. Uma vez liberado, o citocromo *c* se liga a APAF-1 que facilita a ligação de dATP e a procaspase 9, formando o apoptossomo que ativa a caspase 9 que é um iniciador da cascata de caspases e finalmente ativando a caspase 3 (Figura 5) (GEWIES, 2003; MACFARLANE & WILLIAMS, 2004).

Outro fator mitocondrial pró-apoptótico é o Smac/DIABLO que atua inibindo as IAPs de bloquear a atividade das caspases. As IAPs são uma família de proteínas com atividade anti-apoptótica que atuam inibindo as caspases. Após dano mitocondrial, a Smac/DIABLO é liberada do espaço intermembrana para o citoplasma, juntamente com o citocromo *c*. Enquanto o citocromo *c* liga-se à APAF-1 e ativa diretamente a caspase-9, Smac/DIABLO remove as IAP de sua ligação inibitória com as caspases (GRIVICICH, 2007).

Com central importância ainda estão os membros da família anti-apoptótica Bcl-2 como Bcl-2 e Bcl-XL que neutraliza a ação de proteínas Bh3 como Bid, mas também as proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak e assim pode inibir os eventos mitocondriais pró-apoptóticos. Danos no DNA muitas vezes resultam na ativação do fator de transcrição p53 que promove a expressão de membros Bcl-2 pró-apoptóticos e suprime os membros anti-apoptóticos Bcl-2 e Bcl-XL (GEWIES 2003).

A via extrínseca é iniciada por associação de monômeros de diferentes receptores de morte na membrana plasmática que, ao se agruparem, promovem o recrutamento de proteínas adaptadoras. Dentre os receptores na membrana plasmática (Figura 2), o receptor fas/CD95 recruta procaspase 8 e/ou procaspase 10, e a

conseqüente elevação de seus níveis nas proximidades da membrana garantem interação dessas caspases inativas com proteínas adaptadoras associadas a fas/CD95. Após a ligação com seu respectivo ligante, os receptores de morte triméricos recrutam moléculas adaptadoras e a procaspase 8, formando o complexo DISC. A procaspase-8 sofre clivagem autoproteolítica, tornando-se a caspase 8 ativa que é outro iniciador das caspases efetoras para a execução da apoptose (GEWIES, 2003).

Algumas vezes o sinal vindo do receptor ativado não gera uma sinalização de caspase forte o bastante para a execução da morte celular por si só. Neste caso, o sinal precisa ser amplificado pela via de apoptose mitocondrial. A ligação entre a cascata de sinalização de caspase e a mitocôndria é realizada por um membro da família Bcl-2, Bid. A proteína Bid é clivada pela caspase 8 e sua forma truncada (tBid) se transloca para a mitocôndria, onde age em conjunto com outros membros da família BCL-2 as proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak para induzir a liberação do citocromo c e outros fatores pró-apoptóticos para o citosol (GEWIES, 2003).

Uma disfunção ou desregulação no processo de apoptose é implicada em uma variedade de condições patológicas. Defeitos na apoptose podem resultar em câncer, doenças auto imunes e espalhamento de infecções virais, enquanto desordens neurodegenerativas, AIDS e doenças isquêmicas são causadas ou aumentadas por excessivas apoptoses (FADELL *et al.*, 1999).

1.7 Ensaio de Anexina V/FITC

A anexina V é um membro da família das anexinas que contém mais de 160 proteínas e foi isolada pela primeira vez no final de 1970 a partir de placenta humana e poucos anos depois foi descoberta independentemente em vasos sanguíneos e nomeadas como proteína vascular anticoagulante- α (VAC- α) (BOERSMA *et al.*, 2005). As anexinas têm a propriedade biológica de se ligar fortemente ao fosfolípido fosfatidilserina em uma via dependente de Ca^{2+} em uma superfície carregada negativamente. A fosfatidilserina é um fosfolípido aniônico normalmente presente na face interna da membrana celular (FADELL *et al.*, 1999). Quando o sinal de morte celular ocorre, a fosfatidilserina é translocada para a face externa da membrana. A exposição da fosfatidilserina parece começar durante as fases precoces da apoptose - enquanto a membrana celular continua intacta - até os estágios finais, nos quais a célula se fragmenta, formando os corpos apoptóticos (ENGELAND *et al.*, 1998). A anexina V pode ser conjugada com fluorocromos como o FITC que serve como uma sonda sensível para análises por citometria de fluxo das células que estão sofrendo apoptose. A necrose, por outro lado, é acompanhada pela perda da integridade da membrana celular dessa forma ao se adicionar o corante vital iodeto de propídeo (IP) pode distinguir as células em apoptose precoce (FITC positivas) das células em necrose (IP positivas). As células viáveis também são diferenciadas por serem FITC e IP negativas. No entanto, células em apoptose tardia se coram com ambos FITC e IP devido ao estágio final de desintegração celular não havendo como diferenciar células em necrose de células em apoptose tardia por este ensaio (BOERSMA *et al.*, 2005). Dessa forma é de todo necessário que o ensaio de Anexina V seja executado simultaneamente com um teste de coloração como teste de exclusão para se detectar células em apoptose e diferenciá-las entre apoptose tardia e necrose (VERMES *et al.*, 1995).

1.8 Ensaio Hoechst 33342

Corantes fluorescentes como o Hoechst 33342 são amplamente utilizados para determinar a concentração de DNA e para corar núcleos avaliados por microscopia de fluorescência e citometria de fluxo que emite fluorescência azul quando se liga ao DNA. A bisbenzidina Hoechst 33342 é permeável nas membranas celulares e se une a ligações adenina-timina, sendo utilizados para avaliação de ciclo celular, apoptose e quantificação de células viáveis. Este corante é frequentemente incubado na presença de substâncias indutoras de apoptose, juntamente com células vivas por minutos até horas (KIECHLER & ZHANG 2003). Este corante é rapidamente absorvidos pelas células durante as fases iniciais da apoptose, enquanto a membrana citoplasmática íntegra está impermeável ao IP. Fases tardias da apoptose apresentam corpos apoptóticos e são acompanhadas pelo aumento da permeabilidade da membrana celular, o que permite a entrada de IP nas células. Desta forma, a combinação do Hoechst 33342 e o IP têm sido intensamente utilizadas para a diferenciação dos estágios de apoptose precoce, apoptose tardia e necrose. Pode-se também adicionar o corante diacetato de fluoresceína (DAF) que marca células com membrana celular intacta, mesmo as apoptóticas de verde, sendo um ensaio de 3 espectros coloridos diferentes. Assim as células são avaliadas de acordo com a coloração e morfologia em citoplasma verde e núcleo azul intacto (células viáveis), núcleo azul condensado e fragmentado (apoptose precoce), núcleo vermelho condensado e fragmentado (apoptose tardia) e núcleo intacto vermelho (necrose) (HASHIMOTO *et al.*, 2003).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a concentração, o efeito citotóxico e apoptótico dos extratos orgânicos do material particulado em suspensão no ar atmosférico, colhidos durante os períodos de safra e entressafra de cana-de-açúcar na região urbana de Araraquara, em linhagem de carcinoma pulmonar A549, no ano de 2008.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a concentração do Particulado Total em Suspensão (PTS), assim como a concentração de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) no ar atmosférico por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) nos extratos de material particulado colhidos durante a safra e entressafra de Araraquara;
2. Avaliar a citotoxicidade celular utilizando o método de MTT, em linhagem de carcinoma de pulmão A549 tratadas com extrato de material particulado obtidos durante o período de safra e entressafra;
3. Avaliar quantitativamente a apoptose e necrose celular, utilizando o ensaio de Anexina V, por citometria de fluxo, em linhagem de carcinoma de pulmão A549 tratadas com extrato de material particulado coletado durante o período de safra e entressafra;
4. Avaliar qualitativa e quantitativamente a apoptose e necrose celular, para diferenciação de apoptose total, apoptose precoce e tardia, bem como necrose, utilizando o método do Hoechst 33342 e Iodeto de Propídeo em microscopia de epifluorescência, em linhagem de carcinoma de pulmão A549 tratadas com extratos de material particulado colhidos durante a safra e entressafra.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização Meteorológica do local de amostragem

Os dados meteorológicos (Tabela 6) foram obtidos a partir do banco de dados da Defesa Civil do Estado de São Paulo e Aeroporto Estadual de Araraquara Bartolomeu de Gusmão Latitude. 21°48'11" S, Longitude. 048° 08' 25" W e Altitude 708/2323 6 km SE. O clima regional é subtropical com picos de radiação solar variando de 500 a 900Wm³ e temperatura máxima entre 20 a 30 °C, os ventos são leves sem diferença de velocidade durante as estações. Durante a estação chuvosa (Dezembro a Março), fortes chuvas ocorrem no fim da tarde e início da noite que são rapidamente absorvidos durante a noite (ALLEN *et al.*, 2004). No entanto, entre Abril a Novembro períodos que coincidem com a estação de safra, o clima é seco. A temperatura média no ano de 2008 nos períodos amostrados foi de respectivamente de 21,94 °C e 17,95 °C na entressafra e safra e a precipitação foi de 162,5 e 34,3 mm.

Tabela 6. Parâmetros meteorológicos da cidade de Araraquara – SP no ano de 2008. (Latitude. 21°48'11" S, Longitude 048° 08' 25" W e Altitude 708/2323 6Km SE)

	Direção do Vento (Graus)	Velocidade do Vento (Nos)	Temperatura (°Celsius)	Temp. Mínima (Celsius)	Temp. Máxima (Celsius)	Umidade (%)	Dias		Precipitação Total (mm)
							Com Chuva	Sem Chuva	
Março/2008	159,96 ± 2,83	3,87 ± 0,09	21,94 ± 0,14	15,2	30,8	74,17 ± 0,59	4	7	162,8
Junho/2008	147,42 ± 2,81	3,71 ± 0,08	17,95 ± 0,15	13	25	71,23 ± 0,57	2	8	34,3

Dados obtidos da Defesa Civil do Estado de São Paulo (Disponível em: <http://www.defesacivil.sp.gov.br/novo/paginas.asp?pagina=meteorologia>. Acessado em 11 de dezembro de 2009) e do Aeroporto Estadual de Araraquara Bartolomeu de Gusmão. Média ± Erro Padrão.

3.2 Coleta do Material Particulado Atmosférico Total (PTS)

A coleta do material particulado do ar atmosférico foi feita através do filtro de fibra de vidro (Energética, Rj, Brasil) com 10cm de diâmetro não tratados, com vazão média de 3L/min utilizando o equipamento portátil HANDI_VOL que foi instalado em ponto estratégico no centro da cidade de Araraquara na sacada de um edifício a 50m do solo (Figura 6) longe de outros edifícios e com altura superior a das árvores (Figura 7) e aproximadamente oito a dez quilômetros de distância dos canaviais (Figura 8). Os filtros foram coletados 30 filtros durante o mês de março (entressafra) e 30 filtros durante o mês de junho (safra) de 2008 sendo recolhido um filtro a cada 24 horas.



Figura 6. Imagem obtida por satélite (Google Earth) do centro da cidade de Araraquara, a seta aponta o edifício onde o aparelho para coleta do material particulado foi instalado.



Figura 7. Aparelho portátil HANDI-VOL que foi instalado na sacada do edifício localizado no centro da cidade.

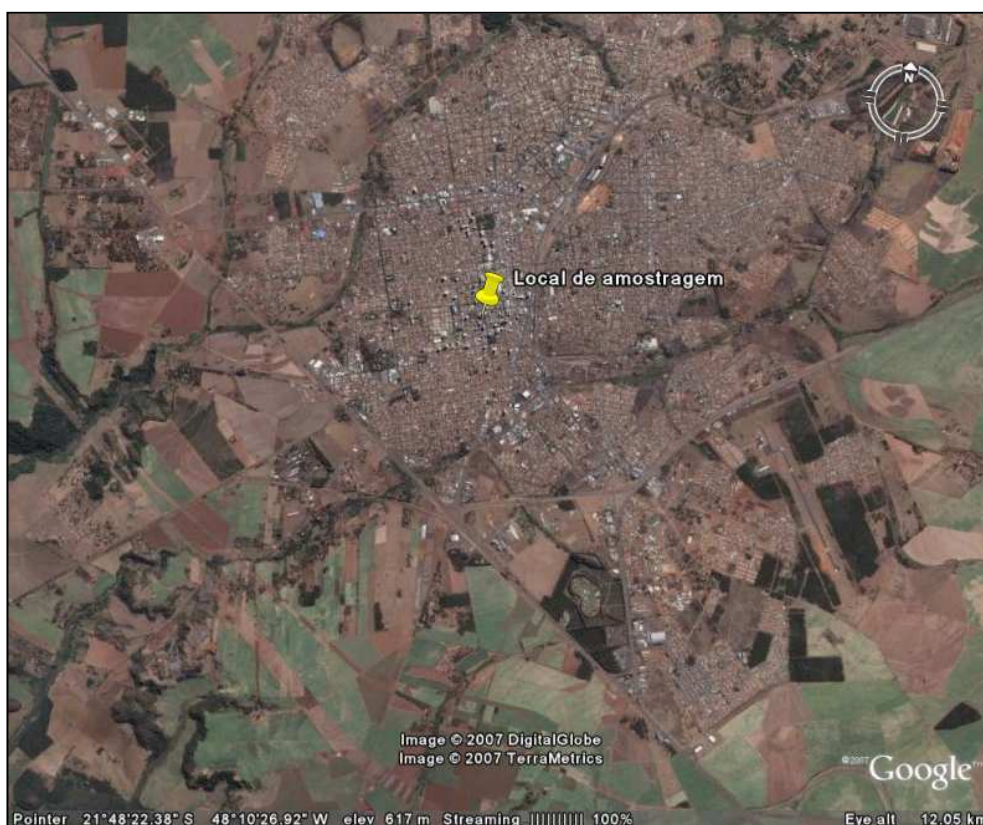


Figura 8. Imagem obtida por satélite (Google Earth) de Araraquara e os canais que circundam a cidade, a seta aponta o local onde os filtros foram coletados.

Os filtros foram pesados antes e depois da amostragem para a determinação da massa do particulado que foi aspirada. O volume de ar amostrado, corrigido pelas condições padrão (25°C, 760 mmHg), foi determinado a partir da vazão medida e do tempo de amostragem. A concentração do material particulado em suspensão em $\mu\text{g}/\text{m}^3$ foi obtida utilizando a seguinte equação: $PC = \Delta M / TV_{24h}$, onde PC é a concentração de PTS ($\mu\text{g}/\text{m}^3$), ΔM é a diferença da massa do filtro pesado antes e após o uso e TV_{24h} é o volume total (m^3) do ar amostrado durante o intervalo de 24h (ARBEX *et al.*, 2007).

O material particulado total foi colhido nos períodos de safra e entressafra, os quais são considerados respectivamente, períodos de queima e de não-queima de cana-de-açúcar.

3.3 Extração do material particulado total

O material particulado contido nos filtros foi processado para extração em diclorometano (DCM): metanol (MeOH) (4:1). Os 30 filtros de cada período foram fracionados em pequenos pedaços e colocados em um Erlenmeyer com 50mL DCM: MeOH 4:1 (RÉ-POPPI 2000; ZAMPERLINI *et al.*, 2000). A extração com diclorometano é preferencialmente usada por ser o solvente para extração de mutágenos em particulado mais efetivo (MONTREUIL *et al.*, 1982) e também por excluir componentes não-orgânicos que poderiam influenciar na toxicidade observada (CLAXTON *et al.*, 2007; MARVIN *et al.*, 2007).

O Erlenmeyer foi colocado no banho de ultra-som por 30 minutos e posteriormente foi realizada a filtração em filtro de seringa 0,45 μm . O filtrado foi concentrado em rota-evaporador à 40°C até o volume aproximado de 5mL, sendo posteriormente evaporado até a secura, sob fluxo leve de nitrogênio. O resíduo obtido

foi ressuspensionado em 1 mL de dimetilssulfóxido (DMSO) e diluído para avaliação dos efeitos dos compostos orgânicos extraídos. Os filtros foram acondicionados ao abrigo da luz a temperatura de -20°C.

3.4 Análise Cromatográfica dos extratos orgânicos

As análises foram efetuadas 1 mês após a coleta utilizando os equipamentos HPLC Varian com detector de fluorescência LC920 (safra) e HPLC Varian detector de fluorescência Pro Star 360 (entressafra). As curvas de calibração foram construídas após a injeção da mistura dos 13 HPAs estudados. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do sistema analítico utilizado podem ser vistos na Tabela 7. Estes limites foram calculados segundo o preconizado pela IUPAC (CURRIE, 1999). As curvas analíticas para todos os HPAs apresentaram $R^2 > 0,99$ e CV do fator de resposta menor que 10%.

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

Acetonitrila: 60%(5 min)-----20min-----100%(15 min), vazão: 1,5 mL/min, fase estacionária: Supelcosil C₁₈ LC PAH (250mm x 4,6mm x 5 mm), os comprimentos de ondas de excitação e emissão utilizados são: Naftaleno, Acenafteno e Fluoreno (220 e 322 nm), Fenantreno ao Benzo[g,h,i]perileno (240 e 398 nm) e Indeno(1,2,3-cd)pireno (300 e 498 nm).

Tabela 7. Limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) para o sistema HPLC/Flu (SILVA, 2006).

HPAs	Equação da reta (LC920)	R ²	LD LC920 (ng mL ⁻¹)	LQ LC920 (ng mL ⁻¹)	LD Pro Star (ng mL ⁻¹)	LQ Pro Star (ng mL ⁻¹)
Naftaleno	Y= 38,64x-341	0,9997	0,21	0,67	0,70	2,24
Acenafteno	Y= 43,29x-27,4	0,9984	0,05	0,16	0,17	0,54
Fluoreno	Y= 19,65x+73,0	0,9998	0,16	0,51	1,10	3,52
Fenantreno	Y= 2,38x-10,72	0,9999	0,59	1,89	1,89	6,05
Antraceno	Y= 27,19x+0,64	0,9935	0,02	0,06	0,12	0,38
Fluoranteno	Y= 0,81x-0,04	0,9983	1,71	5,47	5,52	17,6
Pireno	Y= 14,73x-23,81	0,9948	0,14	0,45	0,91	2,91
Benzo[a]antraceno	Y= 7,66x+2,39	0,9863	0,11	0,35	0,32	1,02
Criseno	Y= 3,13x-5,23	0,9972	0,45	1,44	1,42	4,54
Benzo[e]pireno	Y= 2,74x-8,48	0,9931	0,30	0,96	0,99	3,17
Benzo[e]acenanftrileno	Y= 2,89x-0,71	0,9963	0,18	0,58	0,52	1,66
Benzo[k]fluoranteno	Y= 28,53x+0,99	0,9953	0,02	0,06	0,07	0,22
Benzo[a]pireno	Y= 20,86x-9,78	0,9962	0,05	0,16	0,27	0,86
Dibenzo[a,h]antraceno	Y= 0,84x-6,15	0,9919	1,43	4,58	4,54	14,53
Benzo[g,h,i]perileno	Y= 0,64x-22,3	0,9823	2,29	7,33	7,31	23,39
Indeno[1,2,3-cd]pireno	Y= 0,30x+49,63	0,9781	2,22	7,10	3,14	10,05

3.5 Cultura de células

Para os ensaios biológicos foi utilizada a linhagem de carcinoma pulmonar A549 obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meio Ham F12, acrescido de HEPES, 100µL de penicilina e estreptomicina, bicarbonato de sódio e 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab). As células foram cultivadas em garrafas e mantidas a 5% de CO₂ e à temperatura de 37°C até a formação de monocamada celular. Em seguida, as células foram submetidas à tripsinização. Para isso foram lavadas com 5 mL Hanks que foi em seguida descartado, e as linhagens submetidas à 3 mL de tripsina 0,5% EDTA (INVITROGEN, EUA) até o desprendimento do fundo das garrafas. Foi adicionado 5 mL de meio acrescido de 10% de soro fetal bovino para a neutralização da tripsina e então as células foram centrifugadas por 3 minutos a 1200 rpm. O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 20 mL de meio de cultura com 10% de SFB. O volume da suspensão celular obtido em uma garrafa foi transferido para outras duas garrafas, de modo a obter quantidade celular adequada para os experimentos. As células plaqueadas na concentração de $2,5 \times 10^5$ células/mL foram tratadas com diferentes concentrações (750, 375, 300, 187 e 90 µg/mL) de PTS de safra (queima) e entressafra (não queima) diluídos em 1% de DMSO. Foram realizados 2 experimentos independentes com concentrações em triplicatas. Como controle positivo, todas as linhagens celulares foram tratadas com doxorubicina na concentração de 15µg/mL. Como controle negativo, as linhagens não foram tratadas com os extratos orgânicos de PTS. Como controle de veículo as células foram tratadas com meio acrescido de DMSO 1%.

3.6 Ensaio de MTT

A citotoxicidade celular foi avaliada pelo ensaio de MTT, que mede a habilidade das células vivas reduzirem o sal de MTT a cristais de formazana de cor violeta após o tratamento. As células (A549) foram cultivadas com Ham F12 contendo 10% de SFB em placas de 96 poços, até a aderência das células (24 horas). As células foram então tratadas com os extratos orgânicos obtidos do PTS do período de safra e entressafra em diferentes concentrações (3000, 1500, 750, 375, 300, 187, 90 e 46 µg/mL) por 24 horas de tratamento em meio sem SFB. O meio livre de SFB com os tratamentos foi removido e as células foram incubadas com 10µL de MTT por três horas, a 37°C, o meio foi descartado e os cristais de formazana foram solubilizados com isopropanol. O ensaio de MTT foi realizado em 2 experimentos independentes com concentrações em triplicatas e a absorbância foi medida na faixa de 540nm no leitor de placas Bio-Tek Powerwave X (BioTek Instruments, Inc.,USA). Cada tratamento foi acompanhado de controle positivo (doxorubicina 15µg/mL), controle negativo (células não-tratadas) e controle de veículo (DMSO 1%). A citotoxicidade de cada tratamento foi expresso pela porcentagem de morte celular, calculada em relação ao controle negativo, segundo proposto por ZHANG *et al*, 2004:

Células

$$\text{Mortas (\%)} = \frac{\text{Absorbância do Controle Negativo} - \text{Absorbância do Teste}}{\text{Absorbância do Controle Negativo}} \times 100$$

A partir do teste de MTT foi obtido o IC₅₀ (concentração citotóxica para 50 % das células) e a partir deste estabelecidas as concentrações (750, 375, 300, 187 e 90

$\mu\text{g/mL}$) a serem utilizadas para os ensaios de apoptose. Sendo escolhidas duas concentrações acima e duas abaixo do IC_{50} .

3.7 Anexina V

As células A549 ($2,5 \times 10^5 \text{ cel/mL}$) foram cultivadas em placas de 12 poços por 24 horas e tratadas com os extratos orgânicos obtidos dos períodos de safra e entressafra. Após o tratamento as células foram tripsinizadas, transferidas para eppendorfes estéreis e centrifugadas por 10 minutos. As células foram lavadas com meio Ham F12 com 10% de SFB e centrifugadas novamente. Para o ensaio da anexina V foi utilizado o Kit de detecção de apoptose por Anexina-V marcada com FITC (Alexis, Lausen, Switzerland). A seguir, as células foram ressuspensas em $500 \mu\text{L}$ de tampão de ligação, acrescidos de $5 \mu\text{L}$ de Anexina-V conjugada com FITC e $5 \mu\text{L}$ de iodeto de propídeo. A reação foi incubada por cinco minutos, a temperatura ambiente, sob abrigo da luz. A intensidade de fluorescência (FITC e iodeto de propídeo) foi avaliada, utilizando o equipamento FACSCanto (Becton Dickinson, USA). Para cada ensaio, foram incluídos controle positivo ($15 \mu\text{g/mL}$ de doxorubicina), controle negativo (células não tratadas) e controle de veículo (1% de DMSO).

3.8 Hoechst 33342 e Iodeto de Propídeo

O teste de apoptose pelo método de Hoechst e Iodeto foi realizado em células de carcinoma de pulmão A549 tratadas com os extratos orgânicos de PTS dos períodos de safra e entressafra por 24 horas.

A avaliação de células apoptóticas e necróticas foi realizada pelo método de exclusão de fluorocromos, utilizando-se uma solução fluorescente, contendo diacetato de fluoresceína (DAF), iodeto de propídeo (IP), e Hoescht 33342 (HO). Após o tratamento com os PTS, o meio de cultura foi recolhido (células mortas em suspensão), as células aderentes foram tripsinizadas, e ambas foram centrifugadas. Na suspensão celular de 100µl foi acrescentada uma solução de fluorocromos, contendo 25% da solução aquosa de IP (1mg/mL), 50% da solução de DAF em DMSO (1,5mg/mL), 10% da solução aquosa de HO (1mg/mL) e 15% de PBS. A reação foi incubada por 5 minutos a 37°C e as células foram observadas em microscopia de epifluorescência, em espectro de absorção de 360nm e 538nm. Foi procedida a avaliação qualitativa e quantitativa, estabelecendo-se a porcentagem de células em apoptose (precoce e tardia), necrose e porcentagem de células vivas, levando-se em consideração a morfologia e coloração das células. Foram analisadas 200 células por grupo e as lâminas foram codificadas para não haver identificação dos grupos pelo observador.

As células foram classificadas de acordo com a cor e características morfológicas em: viáveis (núcleo azul esférico corado pelo HO, citoplasma verde, em espectro de absorção 360nm), apoptose precoce (núcleo azul com corpos apoptóticos corado pelo HO, citoplasma verde, em espectro de absorção 360nm), apoptose tardia (corpos apoptóticos corados em vermelho, em espectro de absorção 538nm) e necrótica

(núcleo vermelho esférico corado pelo IP em espectro de absorção 538nm.)
(HASHIMOTO *et al.*, 2003).

3.9 Análise estatística

Para a análise estatística, os resultados foram avaliados pelo teste *One-way* ANOVA com pós-teste de Tukey com nível de significância de 5 %. Essa análise foi executada através do software Graph Pad Prisma versão 5.01, 2007. Para o estudo da porcentagem de células mortas em função da concentração dos extratos de safra e entressafra para a determinação do IC₅₀ ajustou-se a reta com o modelo sigmoidal de Weibul 2 utilizando-se o software Origin 8.0.

4 RESULTADOS

4.1 Concentração de PTS

A tabela 8 mostra a concentração do material particulado obtido nos períodos de entressafra e safra. Pode-se observar que a concentração média diária durante a safra foi de $5,34 \mu\text{g}/\text{m}^3$ valor esse quase 2,7 vezes maior que na entressafra que foi de $1,98 \mu\text{g}/\text{m}^3$. A concentração total foi de $61,45 \mu\text{g}/\text{m}^3$ na entressafra e $165,78 \mu\text{g}/\text{m}^3$ durante a safra. Esses valores estão abaixo dos estabelecidos como padrões de qualidade do ar no Brasil (Resolução CONAMA nº 3 de 28/06/90).

Tabela 8. Concentração ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) de PTS coletado durante os períodos de safra e entressafra.

Concentração PTS $\mu\text{g}/\text{m}^3$			
	Faixa de Concentração	Concentração Média	Total*
Entressafra	0,90 - 5,51	$1,98 \pm 0,16$	61,45
Safra	1,37 - 10,60	$5,34 \pm 0,41$	165,78

* Soma do particulado total contido em 30 filtros. Média \pm EP.

4.2 Análise Cromatográfica dos extratos

A figura 9 apresenta os cromatogramas obtidos por análises de HPLC/Flu dos extratos orgânicos do particulado total da queima de cana-de-açúcar durante os períodos de safra e entressafra. Pode-se observar que as concentrações no período de safra são superiores quando comparadas à entressafra. Quatro HPAs foram específicos para a queima de biomassa na entressafra (Dibenzo(a,h)antraceno, Fenantreno, Naftaleno e Pireno) e dois foram específicos para queima de combustíveis fósseis na safra (Benzo[g,h,i]perileno e Benzo[k]fluoranteno).

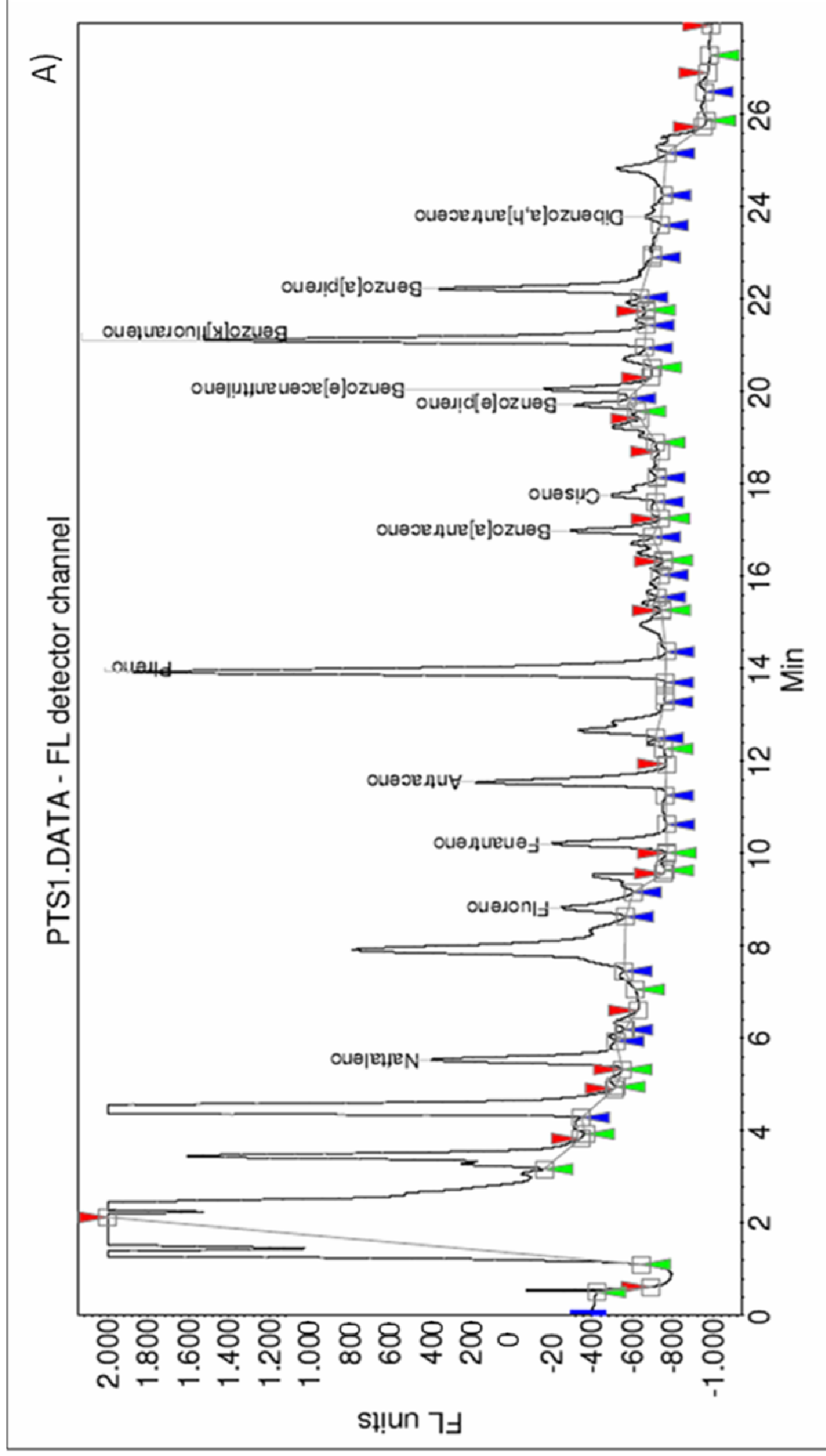


Figura 9A. Cromatograma obtidos nas análises por HPLC/Flu dos extratos das amostras de material particulado atmosférico na época de (A) safra

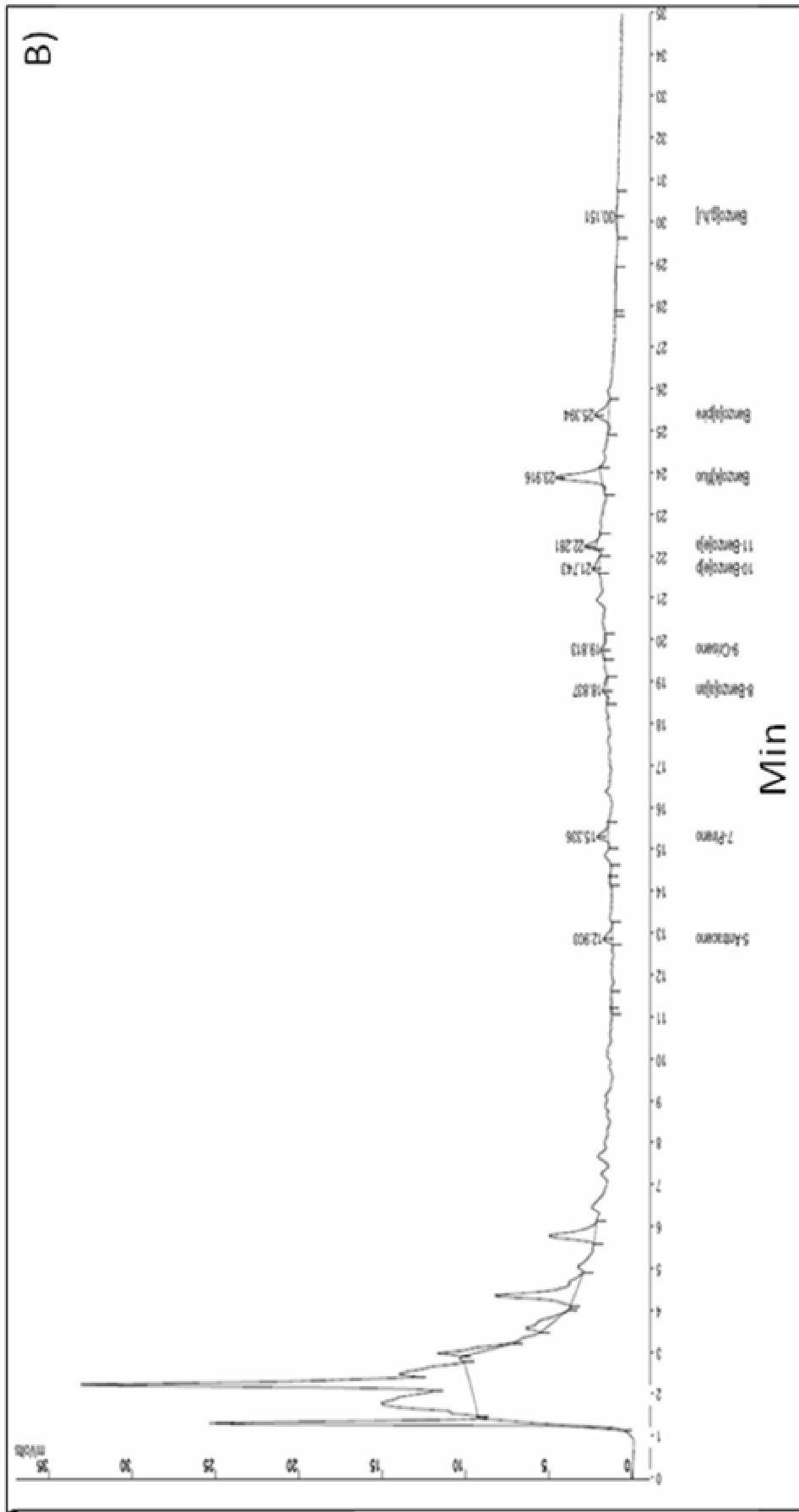


Figura 9B. Cromatograma obtido nas análises por HPLC/Flu dos extratos das amostras de material particulado atmosférico nas épocas de (B) entressafr de cana-de-açúcar.

4.3 Concentração HPAs

As concentrações de HPAs encontradas no material particulado dos períodos de safra e entressafra estão apresentadas na Tabela 9, assim como sua classificação quanto a sua genotoxicidade e carcinogenicidade perante a Organização Mundial de Saúde (WHO) e carcinogenicidade perante a Agência Internacional de Pesquisas sobre o câncer (IARC). Nesta tabela observa-se que a concentração de HPAs extraídos no período de safra foram maiores em relação às extraídas durante a entressafra. A soma de HPAs na safra foi de $659,47\text{ng/m}^3$ valor esse quase 15 vezes maior que a soma dos HPAs de entressafra que foi de $45,28\text{ ng/m}^3$. Em relação a classificação da WHO quanto a carcinogenicidade e genotoxicidade foram encontrados na safra 4 HPAs carcinogênicos e 7 genotóxicos e na entressafra 4 HPAs carcinogênicos e 5 genotóxicos. Quanto a porcentagem de HPAs com 5 ou 6 anéis aromáticos, as amostras coletadas na entressafra continham 25% de HPAs com 5 ou 6 anéis aromáticos, valor esse que subiu para 80% no período de safra. No período de safra o Benzo[g,h,i]perileno sozinho foi responsável por 61% deste total.

Tabela 9. Concentração (ng/m³) de HPAs no material particulado atmosférico

HPA	Número de Análises	ENTRESSAFRA Concentração (ng/m ³)	% HPAs Total	SAFRA Concentração (ng/m ³)	% HPAs Total	Genotoxicidade		IARC**
						WHO *	Carcinogenicidade	
Antraceno	3	6,44	14,22	8,56	1,30	-	-	3
Benzo(a)antraceno	4	1,80	3,98	28,57	4,33	+	+	2B
Benzo(a)pireno	5	1,95	4,31	19,30	2,93	+	+	1
Benzo(e)acenaftileno	4	5,41	11,95	72,13	10,94			
Benzo(e)pireno	5	1,94	4,28	76,75	11,64	+	?	3
Benzo[g,h,i]perileno	6	ND	0	402,26	61	+	-	3
Benzo[k]fluoranteno	5	ND	0	31,28	4,74	+	+	2B
Criseo	4	4,07	8,99	20,62	3,13	+	+	
Dibenzo(a,h)antraceno	5	7,5	16,56	ND	0	+	+	2A
Fenantreno	3	7,8	17,23	ND	0			3
Naftaleno	2	0,59	1,30	ND	0	-	(?)	2B
Pireno	4	7,78	17,18	ND	0	(?)	(?)	3
TOTAL		45,28	100	659,47	100			

A determinação da concentração foi feita em extrato obtido do material particulado contido em 30 filtros.

ND = Não detectado, abaixo do limite de detecção (LD), veja tabela 4

* WHO, 1998: +: positivo; -: negativo; ?: questionável; dados entre parênteses: banco de dados pequeno

** IARC, 2009: Grupo 1: Carcinogênico para humanos; Grupo 2A: Provavelmente carcinogênico para humanos; Grupo 2B: Possivelmente carcinogênico para humanos; Grupo 3: Não classificados como carcinogênico para humanos.

Na figura 10 e figura 11 observa-se a morfologia das células submetidas ao tratamento dos PTS de safra e entressafra coradas por May-Grunwald-Giemsa no aumento de 20X. Podemos observar nas fotomicrografias que as células nas maiores concentrações são apresentadas morfologia comprometida com menor número de células comparação com as menores concentrações e o controle negativo, e que os efeitos deletérios podem ser observados em concentrações menores (300µg/mL) na safra em relação à entressafra.

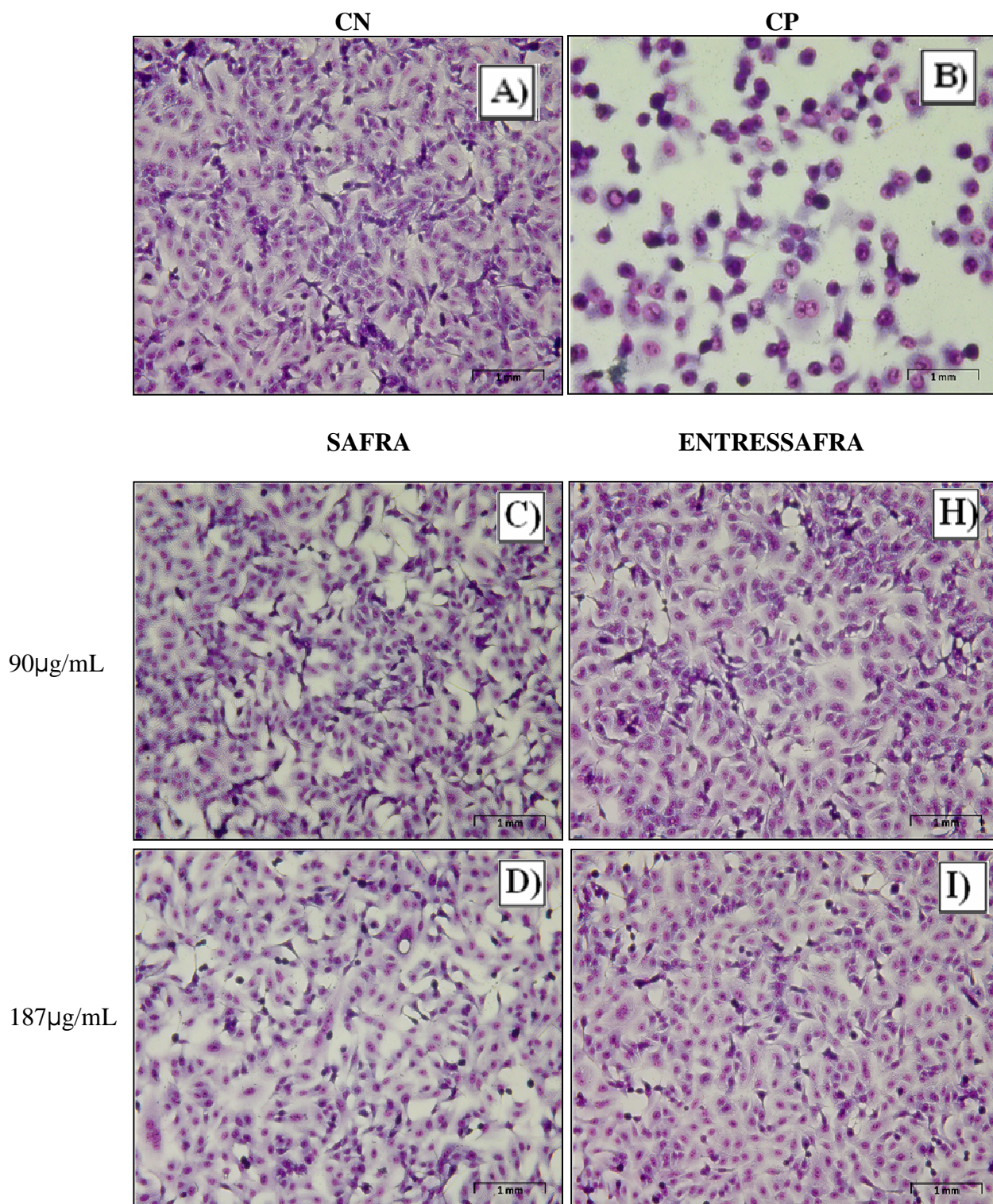


Figura 10. Imagem em microscopia ótica comum da linhagem A549 May Grunwald Giemsa. A) Controle Negativo; B) Controle Positivo (Doxorrubicina 15µg/mL; C) – D) Imagens de células tratadas com extrato de safra nas concentrações de: 90 e 187µg/mL. H) –I) Imagens de células tratadas com extrato de entressafra nas concentrações de: 90 e 187µg/mL. Aumento 20x.

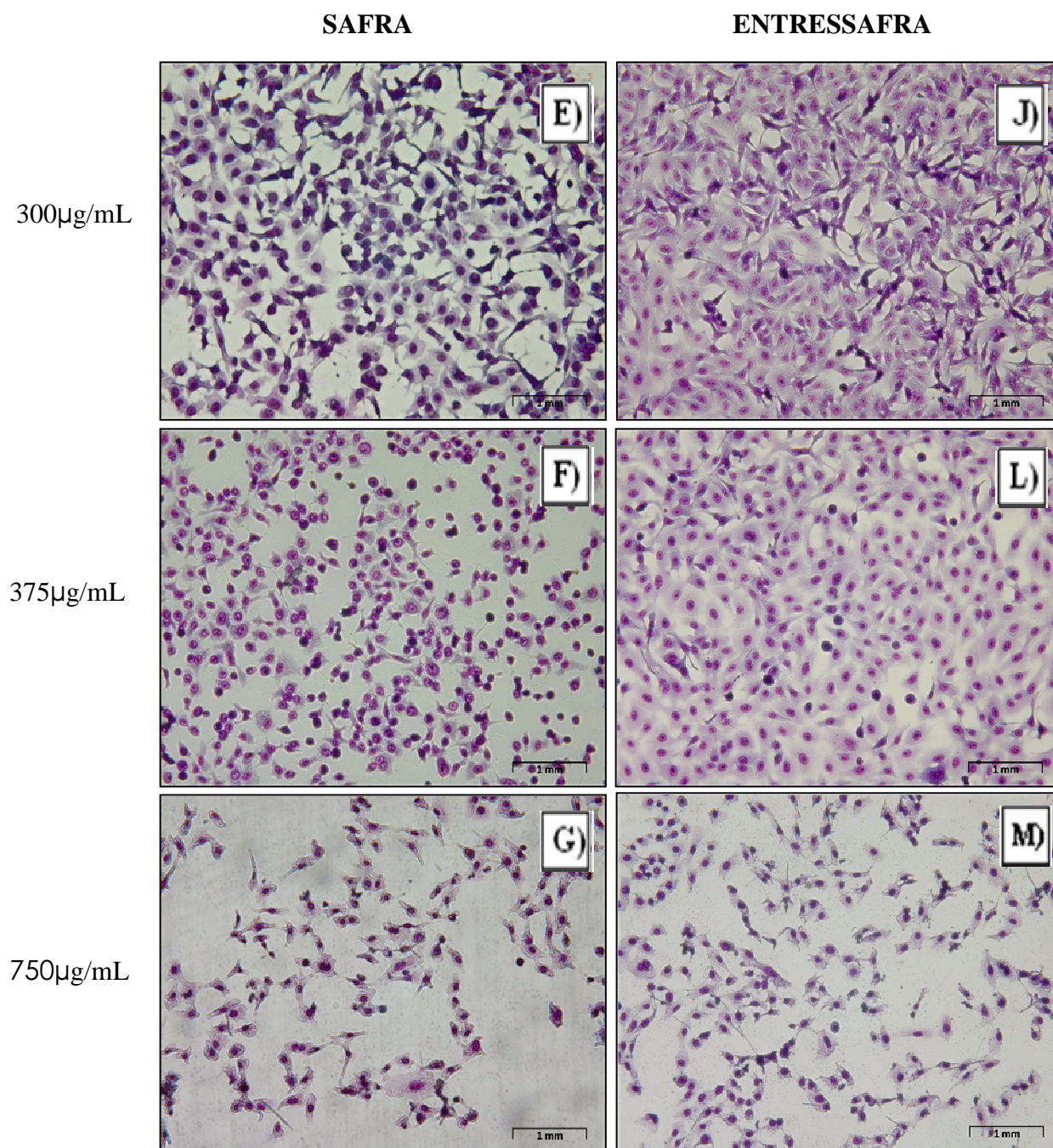


Figura 11. Imagem em microscopia ótica comum da linhagem A549 May Grunwald Giemsa. E) – G) Imagens de células tratadas com extrato de safra nas concentrações de: 300, 375 e 750 μ g/mL. J)–M) Imagens de células tratadas com extrato de entressafra nas concentrações de: 300, 375 e 750 μ g/mL. Aumento 20x.

4.4 Ensaio de Citotoxicidade

Foi realizado o ensaio de citotoxicidade pela técnica de MTT com os extratos obtidos dos particulados totais de safra e entressafra na linhagem de carcinoma de pulmão A549 para a determinação do IC₅₀ (concentração que permite a morte de 50% das células tratadas) (Figura 12). Nas maiores concentrações não houve variação de porcentagem de células mortas, desta forma não aparecem os valores de erro padrão nas concentrações de 3000 µg/mL, 1500 µg/mL e 750 µg/mL.

Para o estudo da porcentagem de células mortas em função da concentração dos extratos ajustou-se um modelo sigmoidal de Weibull 2. Na figura 13 observa-se o modelo sigmoidal de Weibull 2 ajustados aos dados. Com base nos ajuste das retas obtidas por esse modelo foi calculado IC₅₀ nos períodos de safra e entressafra a sendo os valores respectivamente de 257,14 e 278,34 µg/mL. Demonstrando que o PTS coletados durante a safra precisam de uma concentração ligeiramente menor que a entressafra para induzir 50% de mortes.

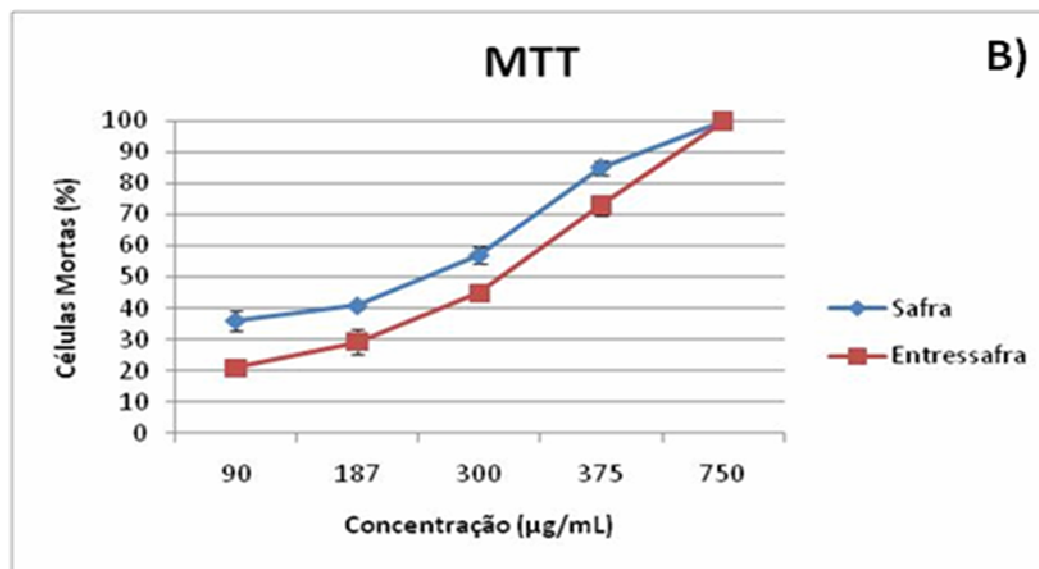
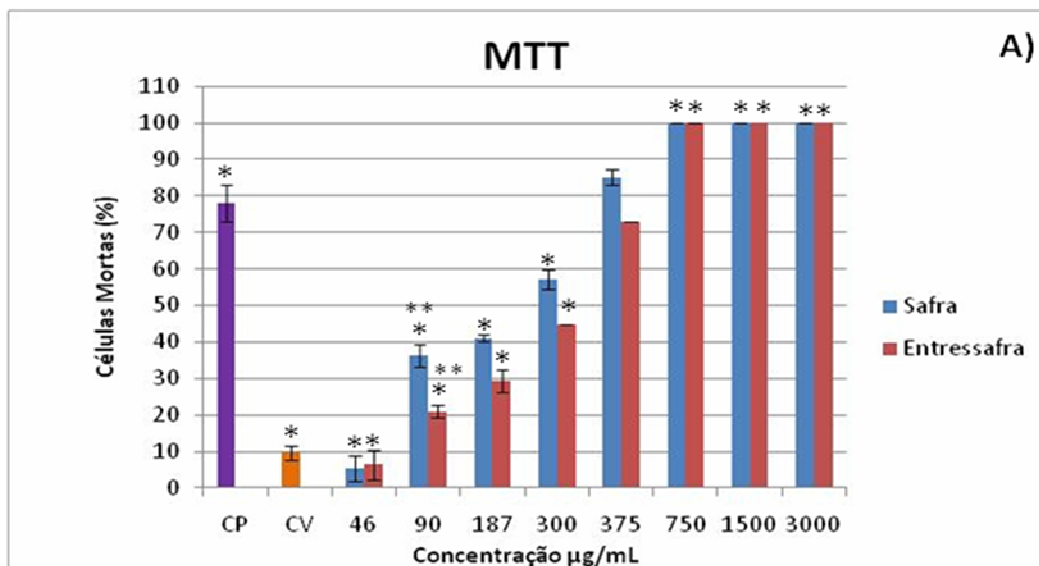


Figura 12. Ensaio de Citotoxicidade (MTT) em células A549. Porcentagem de células mortas. A) (*) $p < 0,0001$ - CP versus CV; Safra (S): CP versus 90; versus 187; versus 300; versus 375 ; versus 750; versus 1500; versus 3000µg/mL. (*) $p < 0,0001$: Entressafra (ES): CN CP versus 90; versus 187; versus 300; versus 375 ; versus 750; versus 1500; versus 3000µg/mL; ; (**) $p < 0,0001$: 90 µg/mL (S) versus 90 µg/mL (ES). B) Concentrações escolhidas a partir do IC_{50} . Os dados referem-se às médias de 2 experimentos independentes (Média \pm Erro Padrão). CP: Controle Positivo, CV: Controle de Veículo. *One-way* ANOVA com pós-teste de Tukey.

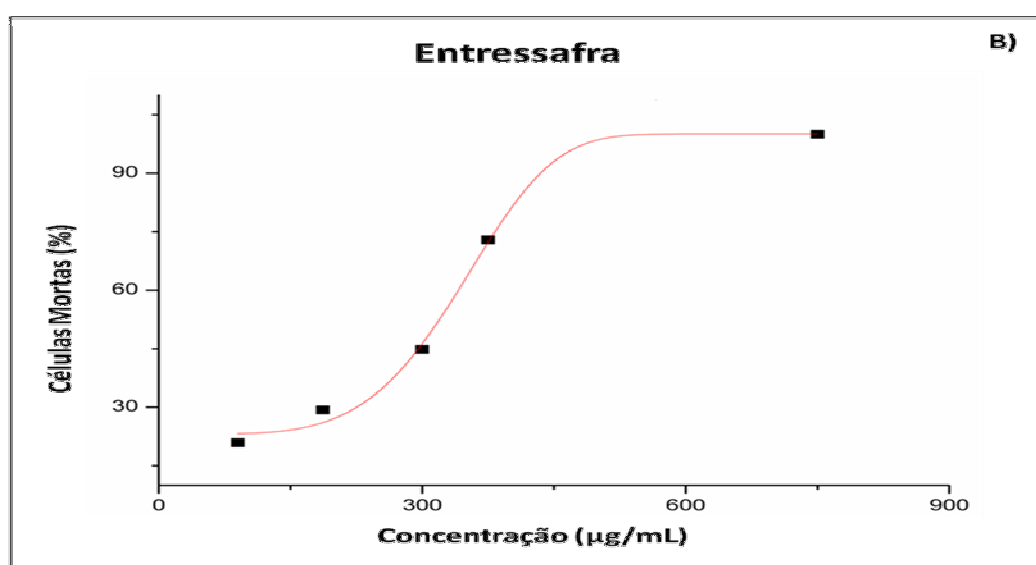
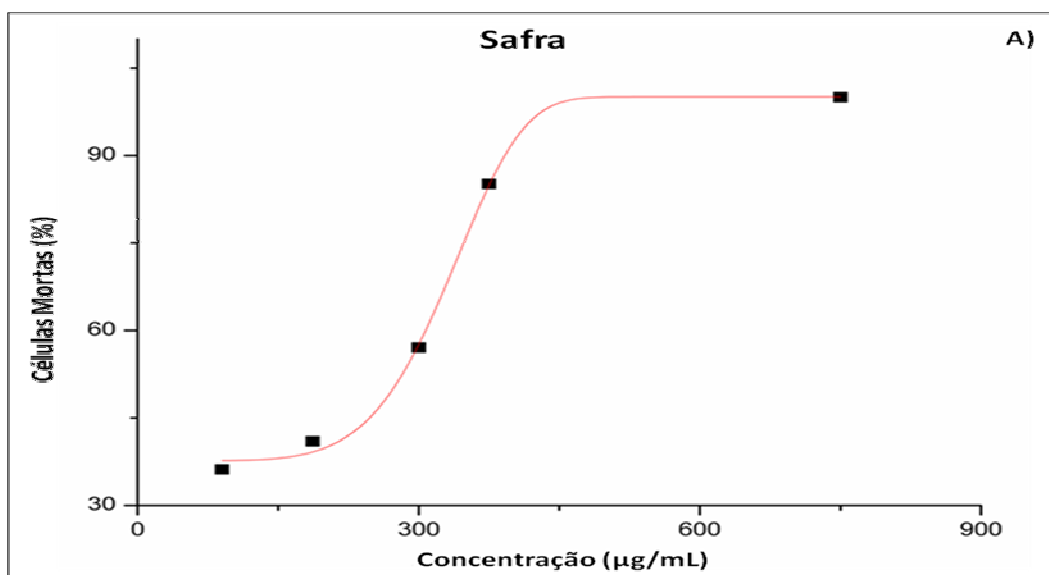


Figura 13. Ensaio de Citotoxicidade (MTT) em células A549. Porcentagem de células mortas. Ajuste das retas segundo modelo sigmoideal de Weibul 2 para a determinação do IC_{50} . A) IC_{50} safra: 257,14µg/mL. B) IC_{50} entressafra: 278,34µg/mL.

4.5 Ensaio de Anexina V

Nos tratamentos da linhagem celular A549 com extratos de safra e entressafra foi possível observar que houve uma elevada porcentagem de mortes induzidas por apoptose total (Figura 14A) em 91,5% a 98,3% na safra, e 68,7% a 98,7% na entressafra. Sendo todas as concentrações (90µg/mL, 187µg/mL, 300µg/mL, 375µg/mL e 750µg/mL) e o controle de veículo significativamente diferentes em comparação ao controle negativo ($p < 0,0001$). A porcentagem de células mortas por apoptose total foi significativamente maior quando tratadas com extratos de safra na concentração de 90µg/mL quando comparada à entressafra ($p < 0,0001$). Em relação às células mortas por necrose (Figura 14B) houve uma baixa porcentagem de células mortas por esse processo sendo 0,07% a 2,72% quando tratadas com extratos de safra, e 0,26% a 0,7% entressafra.

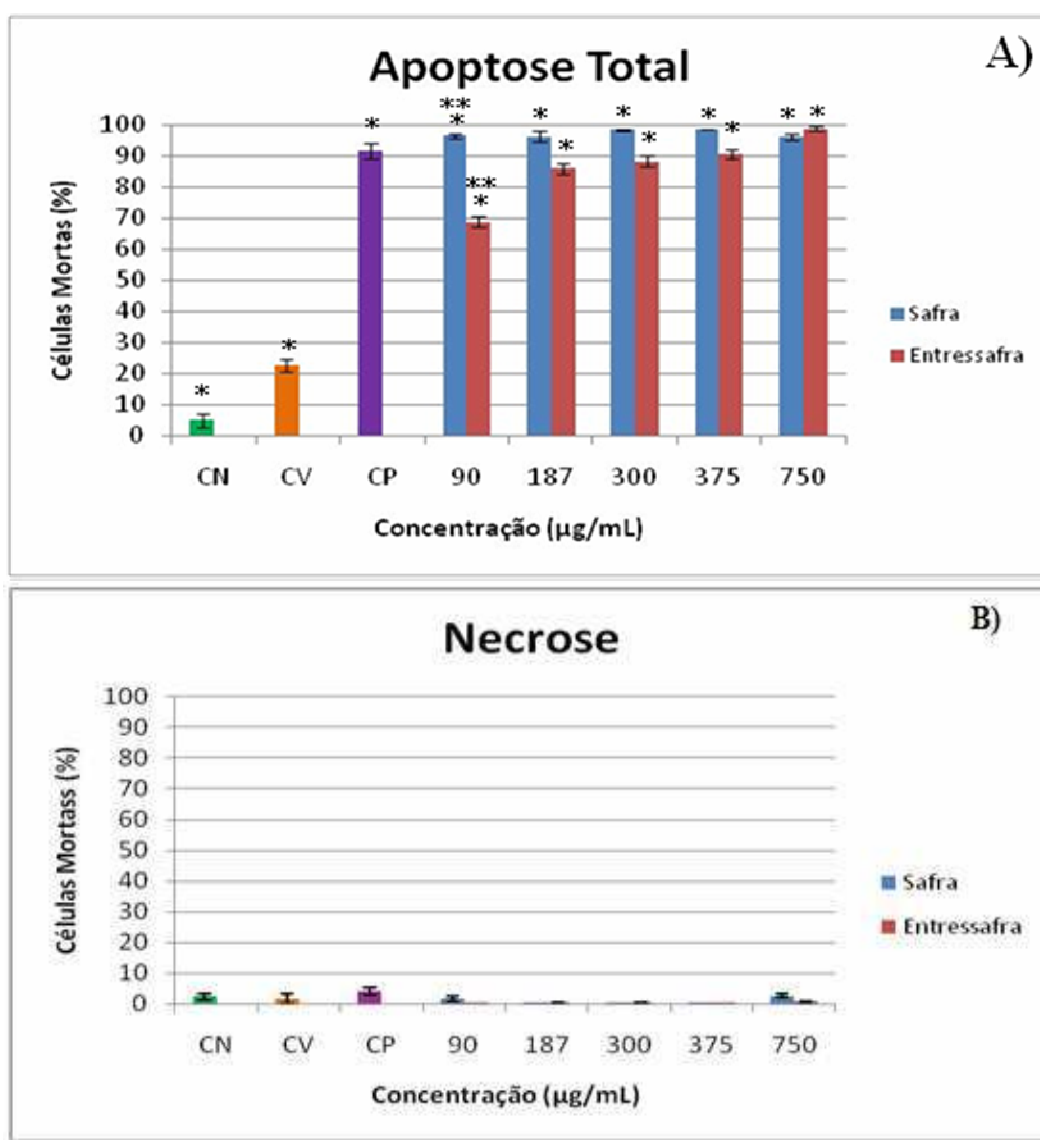


Figura 14. Avaliação de apoptose e necrose em células A549, utilizando o método de AnexinaV com FITC e Iodeto de Propídeo. A) Apoptose Total (*) $p < 0,0001$: CN *versus* CP; (*) $p < 0,0001$: Safra (S): CN *versus* 90; *versus* 187; *versus* 300; *versus* 375 ;*versus* 750µg/mL; (*) $p < 0,0001$: Entressafra (ES): CN *versus* 90; *versus* 187; *versus* 300; *versus* 375; *versus* 750µg/mL; (**) $p < 0,0001$: 90 µg/mL (S) *versus* 90 µg/mL (ES). B) Necrose. Os dados referem-se às médias de 2 experimentos independentes (Média ± Erro Padrão). CN: Controle Negativo, CP: Controle Positivo, CV: Controle de Veículo. One way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Quanto à porcentagem de células tardia/necrose pode-se observar uma elevada porcentagem de apoptose precoce (Figura 15A) nas concentrações de 90µg/mL, 187µg/mL, 300µg/mL, 375µg/mL células com índices variando de 89% a 91% sendo as concentrações de 90µg/mL, 187µg/mL, 300µg/mL, 375µg/mL significativamente diferentes em relação ao controle negativo ($p < 0,0001$) no extrato orgânico de safra. Somente na maior concentração 750µg/mL houve uma porcentagem de mortes baixa na ordem de 13%. Quando as células foram tratadas com o extrato orgânico de entressafra, pode-se observar apoptose precoce entre 67% a 83% nas concentrações de 90µg/mL, 187µg/mL, 300µg/mL, 375µg/mL que foram significativamente diferentes em relação ao controle negativo ($p < 0,0001$). Assim como na safra a concentração de 750µg/mL teve uma baixa porcentagem de células mortas por apoptose precoce com 12% de células mortas. Pode-se também observar uma porcentagem de células mortas por apoptose precoce significativamente maior quando tratadas com extratos de safra na concentração de 90µg/mL quando comparada à entressafra ($p < 0,0001$). As células mortas por apoptose tardia/necrose (Figura 15B) perfizeram uma baixa porcentagem nas menores concentrações (90µg/mL, 187µg/mL, 300µg/mL, 375µg/mL). Na safra a taxa variou de 5% a 9%. Apenas a maior concentração (750µg/mL) teve uma elevada porcentagem de células mortas por apoptose tardia/necrose com 83% de mortes, sendo o controle positivo e a concentração de 750µg /mL significativamente diferente do controle negativo ($p < 0,0001$). Na entressafra a porcentagem variou de 1,5% a 7% nas concentrações de 90µg/mL, 187µg/mL, 300µg/mL, 375µg/mL. No entanto a concentração de 750µg /mL apresentou elevada porcentagem de mortes por apoptose tardia/necrose com 85% de mortes sendo significativamente diferente do controle negativo ($p < 0,0001$).

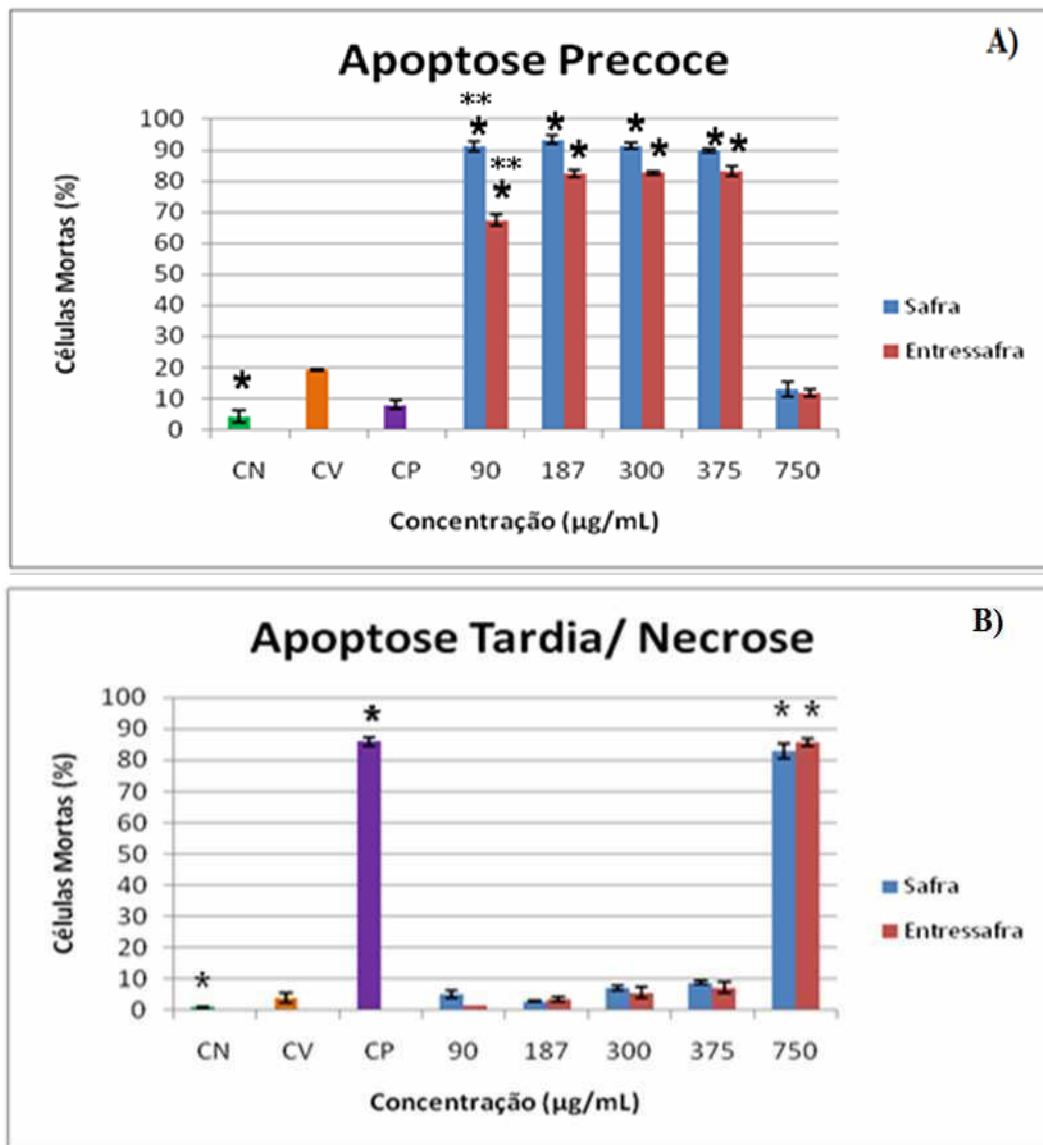


Figura 15. Avaliação de apoptose precoce e tardia/necrose em células A549, utilizando o método de AnexinaV com FITC e Iodeto de Propídeo. A) Apoptose Precoce (*) $p < 0,0001$: Safra: CN *versus* 90; *versus* 187; *versus* 300; *versus* 375µg/mL; (*) $p < 0,0001$: Entressafra: CN *versus* 90; *versus* 187; *versus* 300; *versus* 375µg/mL; (**) $p < 0,001$: 90 µg/mL (S) *versus* 90 µg/mL (ES). B) Apoptose Tardia/Necrose (*) $p < 0,0001$ CN *versus* CP; (*) $p < 0,0001$: Safra: CN *versus* 750µg/mL; (*) $p < 0,0001$: Entressafra: CN *versus* 750 µg/mL. Os dados referem-se às médias de 2 experimentos independentes (Média \pm Erro Padrão). CN: Controle Negativo, CP: Controle Positivo, CV: Controle de Veículo. *One way* ANOVA com pós-teste de Tukey.

A porcentagem de células vivas também foi avaliada pelo ensaio de Anexina V marcada com FITC e iodeto de propídeo sendo estas as células que durante o ensaio não sofreram marcação por iodeto de propídeo e Anexina V marcada com FITC (duplo-negativas) (Figura 16A e 16B) e a partir dele foi observado um efeito dose resposta de células vivas tratadas com extratos de entressafra. 1,6% a 31%. As células tratadas com extratos de safra apresentaram uma baixa porcentagem de células vivas que variou de 1,3% a 1,8%. A porcentagem de células vivas foi significativamente diferente quando comparada ao controle positivo ($p < 0,0001$) e em todas as concentrações (90 μ g/mL, 187 μ g/mL, 300 μ g/mL, 375 μ g/mL e 750 μ g/mL) das células tratadas com extratos de safra e entressafra ($p < 0,0001$) tanto nas células tratadas com extratos de safra como as tratadas com estratos de entressafra. Houve uma diferença estatisticamente significativa entre a porcentagem de células vivas na concentração de 90 μ g /mL do período de entressafra quando comparado a safra ($p < 0,0001$).

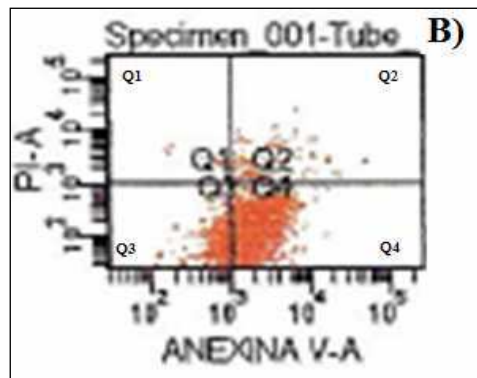
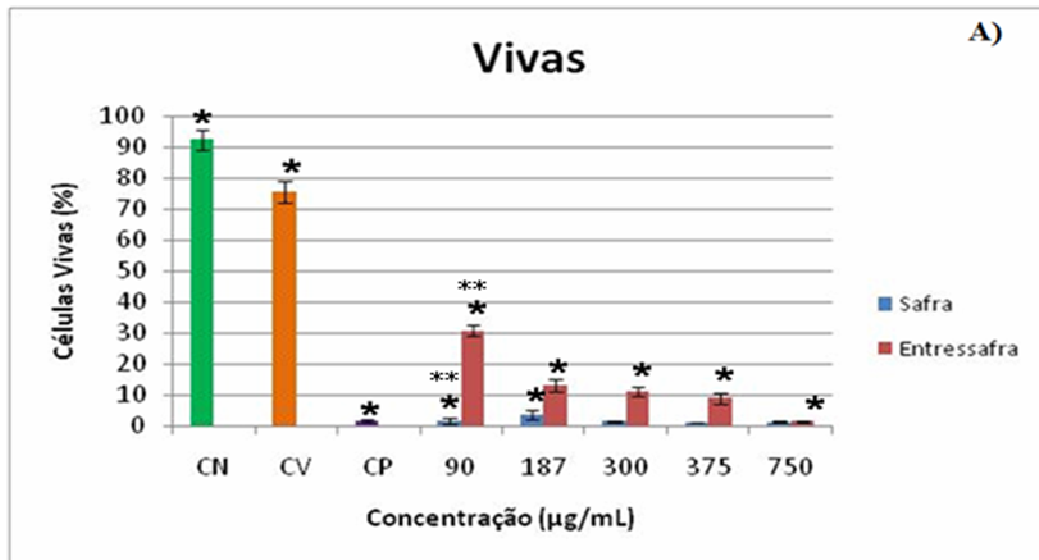


Figura 16. Avaliação de células vivas em células A549, utilizando o método de AnexinaV . A) (*) $p < 0,0001$: CN *versus* CP; *versus* CV; (*) $p < 0,0001$: Safra (S): CN *versus* 90 ; *versus* 187; *versus* 300; *versus* 375 e *versus* 750 $\mu\text{g/mL}$; (*) $p < 0,0001$: Entressafra(ES): 90 ; *versus* 187; *versus* 300; *versus* 375 e *versus* 750 $\mu\text{g/mL}$ (**) $p = 0,0001$: 90 $\mu\text{g/mL}$ (S) *versus* 90 $\mu\text{g/mL}$ (E). Os dados referem-se às médias de 2 experimentos independentes (Média \pm Erro Padrão). CN: Controle Negativo, CP: Controle Positivo, CV: Controle de Veículo. *One-way* ANOVA com pós-teste de Tukey. B) Figura relativa ao tratamento de extratos de entressafra na concentração de 90 $\mu\text{g/mL}$. Q1: Células marcadas por iodeto de Propídeo (IP) (Necrose); Q2: Células marcadas com IP e Anexina V/FITC (Necrose/ Apoptose Tardia); Q3: Células não marcadas (vivas); Q4: Células marcadas com Anexina/ FITC (Apoptose Precoce).

4.6 Ensaio de Hoechst 33342

O método de Hoechst foi utilizado para melhor caracterização de apoptose precoce, apoptose tardia e necrose. Podemos observar o padrão morfológico e de coloração (Figura 17A e 17C) fluorescente azul pelo Hoechst com núcleo normal representativos de células vivas (V) e coloração azul com fragmentação nuclear representativo de apoptose precoce (AP). Em contrapartida, podemos notar o padrão de apoptose tardia (AT), onde vemos núcleos com cromatina fragmentada e coloração vermelho fluorescente corados pelo Iodeto de Propídeo e necrose com núcleo normal e coloração vermelha (N) (Figura 17B e 17D).

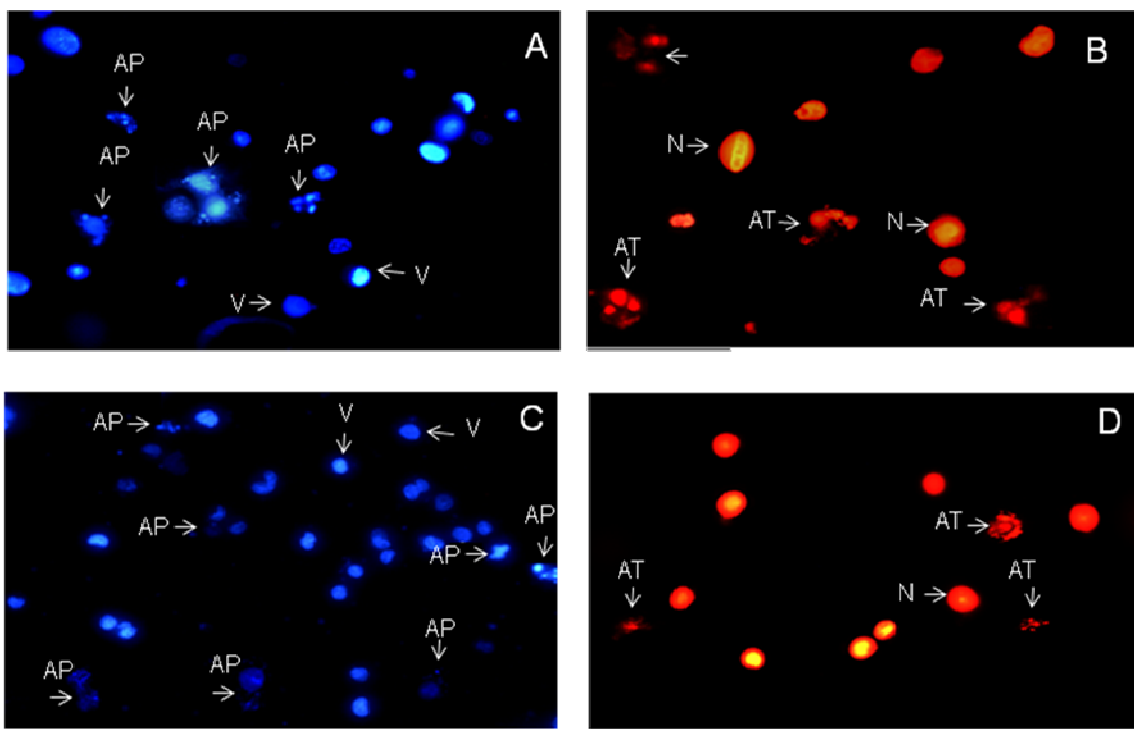


Figura 17. Análise morfológica do ensaio de apoptose e necrose pelo método de Hoechst. Células A549 tratadas com extratos de safra (A e B) e entressafra (C e D). A e C: células vivas (V) coradas em azul pelo Hoechst com núcleos normais; células em apoptose precoce (AP) coradas pelo Hoechst com núcleo fragmentado. B e C: células em necrose coradas pelo iodeto de propídeo em vermelho com núcleo normal (N) e células em apoptose tardia (AT) coradas com iodeto de propídeo com fragmentação nuclear.

No ensaio realizado com o Hoechst 33342 e Iodeto de Propídeo foi possível observar as mortes por apoptose total (Figura 18A). Sendo na safra de 82% a 95%. Houve diferença significativa do controle negativo quando comparado ao controle de positivo e quando comparado as concentrações de 90µg/mL, 187µg/mL, 300µg/mL, 375µg/mL e 750µg/mL ($p < 0,0001$). Quanto às células tratadas com extratos de entressafra a porcentagem de mortes variou de 57% a 94%. Houve diferença significativa entre o controle negativo quando comparado as concentrações de 90µg/mL, 187µg/mL, 300µg/mL, 375µg/mL e 750µg/mL ($p < 0,0001$). Os períodos de safra e entressafra diferiram significativamente nas concentrações de 187µg/mL ($p < 0,001$) e 90µg/mL ($p < 0,0001$).

Na figura 18B pode-se avaliar uma baixa porcentagem de mortes induzidas pelo processo de necrose com uma relação dose resposta no período de safra que variou de 0,5% a 4% com diferença significativa em relação ao controle negativo quando comparado ao controle positivo ($p < 0,0001$). Quanto ao tratamento com extratos de entressafra a porcentagem de mortes por necrose foi de 2% a 5%. Houve diferença estatística do controle negativo quando comparado ao controle positivo ($p < 0,0001$).

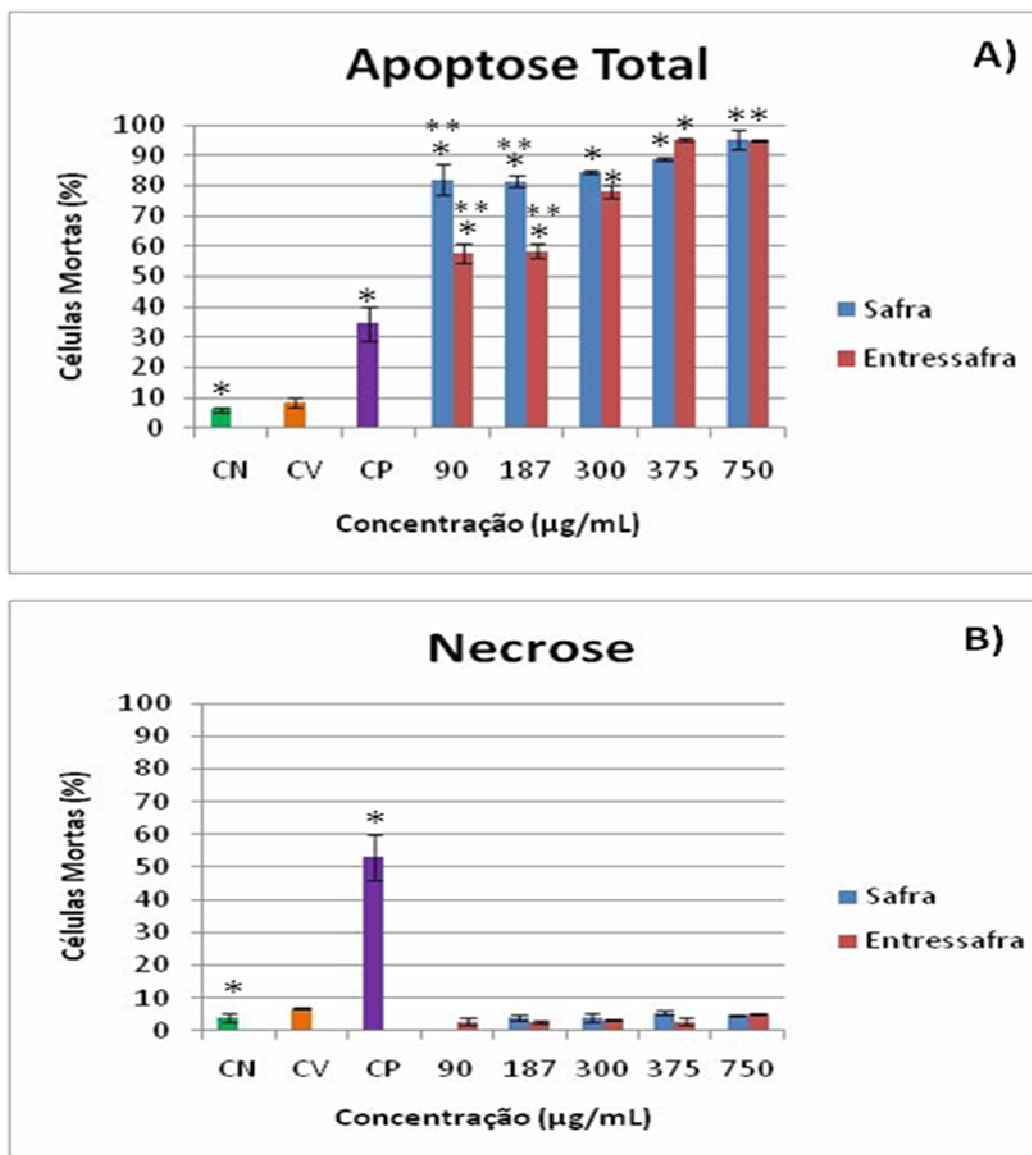


Figura 18. Avaliação de apoptose e necrose em células A549, utilizando o método de Hoechst. Apoptose Total (*) $p < 0,0001$ CN versus CP; (*) $p < 0,000:1$ CN versus Safra: 90, versus 187, versus 300, versus 375 e versus 750 µg/mL; (*) $p < 0,0001$: CN versus Entressafra: 90, versus 187, versus 300, versus 375 e versus 750 µg/mL. B) Necrose (*) $p < 0,0001$: CN versus CP. Os dados referem-se às médias de 2 experimentos independentes (Média ± Erro Padrão). CN: Controle Negativo, CP: Controle Positivo, CV: Controle de Veículo. One-way ANOVA com pós-teste de Tukey.

Quando as células foram diferenciadas entre apoptose precoce e tardia observou-se uma alta porcentagem de células mortas por apoptose precoce (Figura 19A) em ambos os tratamentos (safra e entressafra) nas concentrações de 90 µg/mL a 375 µg/mL variando de 72% a 76% na safra e 49% a 68% na entressafra com uma relação dose resposta. Apenas na concentração de 750 µg/mL apresentou uma baixa porcentagem de células em apoptose precoce, sendo esses valores de 9% e 16%, para células tratadas com PTS de safra e entressafra, respectivamente. Houve diferença significativa entre as mortes por apoptose precoce do controle negativo quando comparado ao controle positivo ($p < 0,0001$) e também quando comparado as concentrações de 90 µg/mL, 187 µg/mL, 300 µg/mL e 375 µg/mL de extratos de safra e entressafra. Também houve diferença significativa da concentração de 90 µg/mL extraída durante a safra quando comparado a mesma concentração extraída no período de entressafra ($p < 0,05$).

Na avaliação de mortes induzidas por apoptose tardia (Figura 19B) as células submetidas ao tratamento com extratos do particulado de safra e entressafra de 86% e 78%, respectivamente. No restante das concentrações a porcentagem de mortes por apoptose tardia variou de 9% a 12% para extratos de safra e 8% a 27% para entressafra. Houve diferença significativa do controle negativo quando comparado ao controle positivo ($p < 0,001$) e quando comparado a concentração de 750 µg/mL de safra e 750 µg/mL e 375 µg/mL na entressafra ($p < 0,001$).

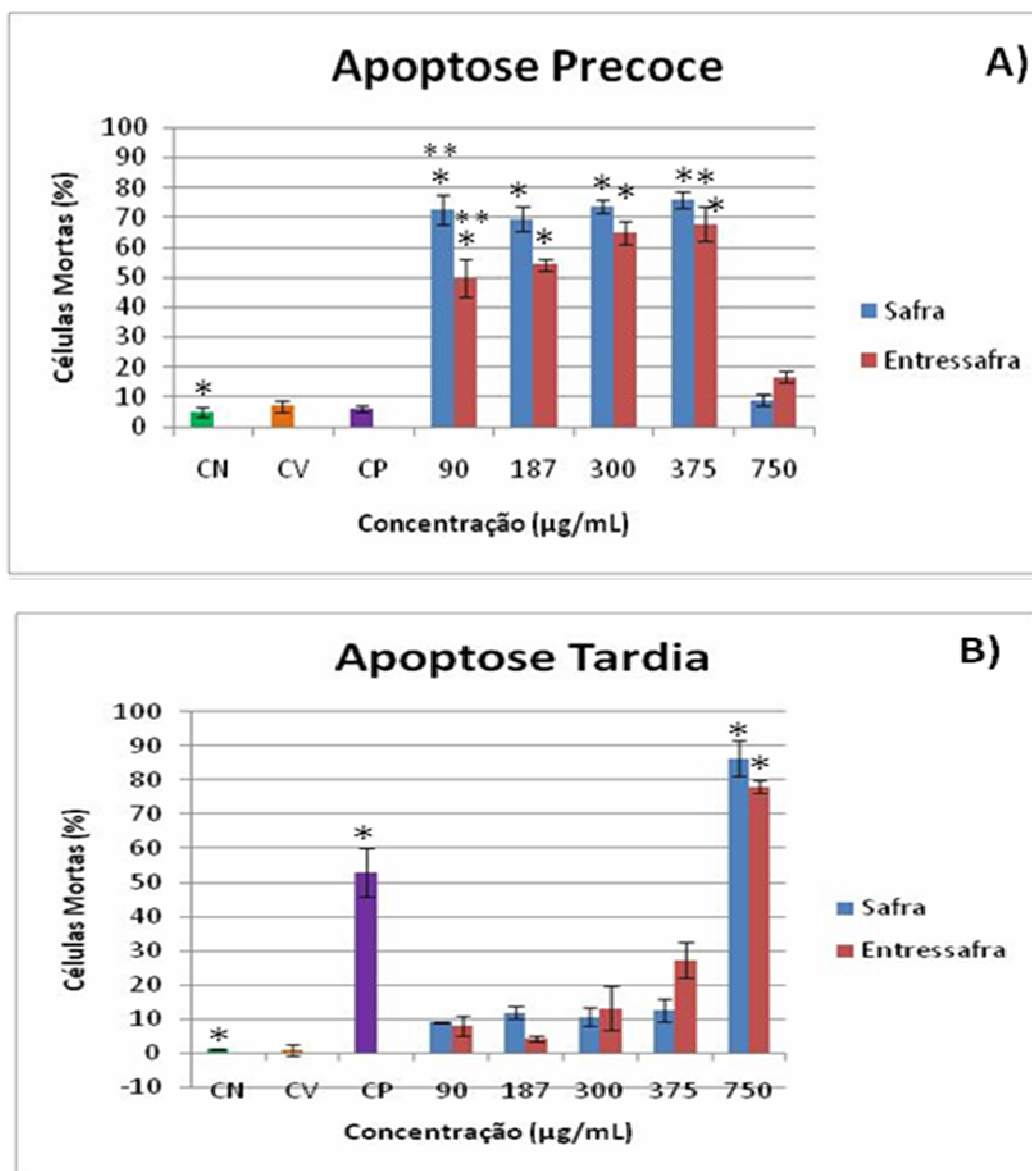


Figura 19. Avaliação de apoptose precoce e tardia em células A549, utilizando o método de Hoechst. A) Apoptose Precoce (*) $p < 0,0001$ CN versus CP; (*) $p < 0,0001$: CN versus Safra (S): versus 90, versus 187; versus 300; versus 375 µg/mL; (*) $p < 0,0001$: Entressafra (ES): CN versus 90, versus 187; versus 300; versus 375 µg/mL (***) $p < 0,05$: 90 µg/mL (S) versus 90 µg/mL (ES) B) Apoptose Tardia (*) $p < 0,001$ CN versus CP; (*) $p < 0,0001$: CN versus Safra: 750 µg/mL; (*) $p < 0,001$: Entressafra $p < 0,0001$: CN versus 375 µg/mL e 750 µg/mL. Os dados referem-se às médias de 2 experimentos independentes (Média ± Erro Padrão). CN: Controle Negativo, CP: Controle Positivo, CV: Controle de Veículo. One way ANOVA com pós-teste de Tukey.

A porcentagem de células vivas também foi avaliada pelo ensaio de Hoechst e iodeto de propídeo, sendo estas as células que durante o ensaio foram marcadas pelo corante fluorescente azul, mas não sofreram fragmentação nuclear característica do iodeto de propídeo e Anexina V marcada com FITC (duplo-negativas) (Figura 20A e 20B) e a partir dele foi observado um efeito dose resposta de células vivas com percentual de mortes que variou de 0% a 15% com células tratadas com extratos de safra e de 0% a 41% com extratos obtidos no período de entressafra. A porcentagem de células vivas foi significativamente diferente quando comparada ao controle positivo ($p < 0,0001$) e quando comparado a todas as concentrações tanto nas células tratadas com extratos de safra como as tratadas com extratos de entressafra. Houve uma diferença significativamente maior entre a porcentagem de células vivas, na entressafra quando comparado a safra, nas concentrações de $187\mu\text{g}/\text{mL}$ e $90\mu\text{g}/\text{mL}$ ($p < 0,0001$).

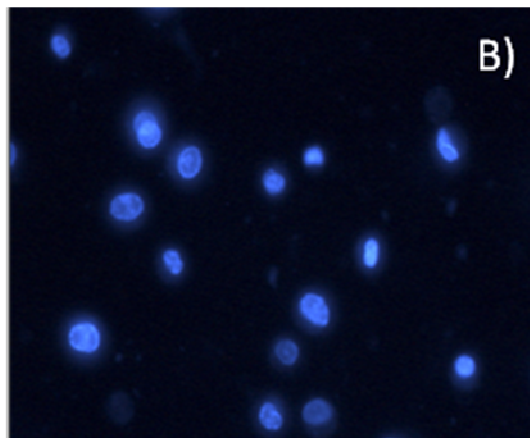
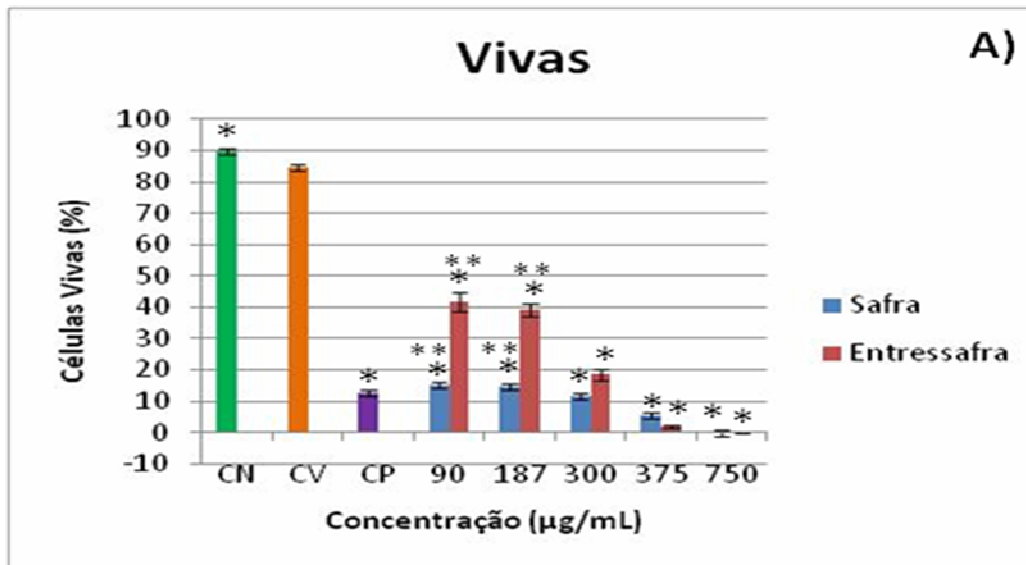


Figura 20. Avaliação de células vivas em células A549, utilizando o método de Hoechst. A) (*) $p < 0,0001$: CN *versus* CP; (*) $p < 0,0001$: Safra (S): CN *versus* 90; *versus* 187; *versus* 300, *versus* 375 e *versus* 750 µg/mL; (*) $p < 0,0001$: Entressafra (ES): CN *versus* 90; *versus* 187; *versus* 300, *versus* 375 e *versus* 750 µg/mL; (**) $p < 0,0001$: 187 (S) *versus* 187 (E); 90 (S) *versus* 90 (ES). Os dados referem-se às médias de 2 experimentos independentes (Média \pm Erro Padrão). CN: Controle Negativo, CP: Controle Positivo, CV: Controle de Veículo. *One-way* ANOVA com pós-teste de Tukey. B). Imagem de células vivas utilizando o método de Hoechst.

5 DISCUSSÃO

O Brasil possui 25% da área cultivada do mundo para a cultura de cana-de-açúcar, sendo um dos maiores produtores mundiais (CONAB, 2008). Nos últimos anos houve forte expansão desta atividade econômica. O comportamento bastante favorável do mercado nacional e internacional do açúcar e do álcool combustível influenciaram positivamente o desempenho da cultura da cana-de-açúcar no período recente. A conquista e a ampliação de mercados internacionais para o açúcar, o aumento das exportações de álcool combustível após a assinatura do Protocolo de Kyoto e, mais recentemente, o grande aumento das vendas de automóveis com motores *flex* no mercado nacional são fatores que certamente contribuíram para a forte expansão da atividade sucroalcooleira (BALSADI, 2007).

As políticas de incentivo à produção e uso do etanol como combustível, por vários países, têm como principal objetivo a segurança energética, pois diversifica a matriz de insumos energéticos e reduz a dependência dos derivados de petróleo. Além disso, contribui para a redução dos impactos ambientais, sobretudo através da mitigação de emissões de gases de efeito estufa, e ainda fortalece a economia rural. No mercado mundial de combustíveis, o etanol está sendo tratado como o combustível renovável mais viável, em curto prazo, para substituir a gasolina ou ser adicionado à mesma (EPE, 2008). Porém, a grande utilização do álcool como combustível em veículos automotores provocou um substancial aumento da área utilizada para cultivo da cana-de-açúcar no Brasil e, especialmente, no Estado de São Paulo. Nas regiões em que a cana-de-açúcar é plantada, colhida e industrializada, a qualidade do ar foi prejudicada devido a um aumento da quantidade de cana queimada, o que gera um aumento de poluentes na atmosfera. Esses poluentes causam uma série de transtornos aos moradores das cidades afetadas pelas queimadas, em decorrência da presença de materiais indesejáveis que modificam as características do meio ambiente (ARBEX, 2001). A cana-de-açúcar é

queimada para facilitar a colheita manual e para aumentar o conteúdo de açúcar por peso devido à evaporação (ZAMPERLINI *et al.*, 2000).

Ainda são escassos os trabalhos que avaliam o efeito da queima de cana, entretanto existem evidências de seus efeitos nocivos, demonstrados por estudos que encontraram relação direta entre o número de intercorrências respiratórias, aumento da terapia inalatória, mutagenicidade e alterações na mecânica pulmonar durante o período de safra (ARBEX *et al.*, 2000; ARBEX *et al.*, 2007; CANÇADO *et al.*, 2006b; MAZZOLLI-ROCHA *et al.*, 2008; UMBUZEIRO *et al.*, 2008). A caracterização dos efeitos a saúde humana da queima de biomassa retoma a preocupação com medidas de biomonitoramento e políticas para regular os níveis de emissão, ou alternativas para evitá-la. Dessa forma, o presente estudo poderá contribuir com informações importantes sobre o potencial citotóxico dos poluentes oriundos da queima de cana. Uma vez que a associação entre queima de cana e morte celular em modelos experimentais se torne consistente, faz-se necessário caracterizar a variabilidade de efeitos entre os indivíduos de um mesmo nicho, buscando-se marcadores de susceptibilidade. Com isso, abordagens preventivas e terapêuticas serão dirigidas de acordo com a particularidade individual dos indivíduos expostos.

No presente estudo foram encontradas concentrações média diária de PTS durante o período de safra quase três vezes maior em relação à entressafra, o que pode explicar o aumento de problemas respiratórios observados na população durante o inverno (ARBEX *et al.*, 2000, ARBEX *et al.*, 2007). No entanto esses valores ainda são inferiores aos estabelecidos como padrões de qualidade do ar no Brasil (Resolução CONAMA nº 3 de 28/06/90). Porém, estudos realizados pela WHO sugerem que até mesmo baixos níveis de PTS (menores que $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$), e períodos curtos de exposição podem ser associados a efeitos adversos à saúde humana e que uma longa exposição a baixas concentrações de PTS no ar são associadas à mortalidade e outros efeitos crônicos, como o aumento na taxa de bronquite e redução na função pulmonar (WHO,

1999). Estudos recentes demonstram que baixas doses de partículas aéreas produzidas pela queima de cana-de-açúcar induzem alterações significantes na mecânica pulmonar e na histologia pulmonar em camundongos (MAZZOLI-ROCHA *et al.*, 2008). Nos extratos de queima de cana-de-açúcar (safra) foi observada a presença de hidrocarbonetos aromáticos (HPAs), alguns desse em quantidade superior aos de entressafra

Os HPAs que são conhecidos pelo seu grande potencial mutagênico e/ ou carcinogênico são importantes componentes dos poluentes orgânicos presentes na atmosfera. Devido ao fato dos HPAs serem considerados como produtos típicos da combustão incompleta do material particulado, o aumento na concentração durante a safra em Araraquara já foi associado à intensa queima de cana-de-açúcar (GODOI *et al.*, 2004). Apesar das fontes de PTS oriundas das fábricas da cidade pode-se observar no presente estudo a presença de fenantreno, antraceno, benzo(a)antraceno e criseno que são emitidos principalmente pela queima de espécies pertencentes à família *Gramineae*, assim como o encontrado nos estudos de GODOI *et al.*, 2004 e SIMONEIT, 2002 que também avaliaram a presença de HPAs emitidos a partir da queima de biomassa.

Sabe-se que os HPAs podem estar presentes tanto na fase gasosa ou ligados ao material particulado ou em ambos (ŠKAREK *et al.*, 2007). HPAs com leve peso molecular (até 3 anéis aromáticos) estão presentes predominantemente na fase gasosa, e HPAs com 4 ou mais anéis são encontrados predominantemente aderidos a material particulado, principalmente aqueles com diâmetro menor que 1µm que podem se depositar nos alvéolos pulmonares podendo levar ao surgimento de doenças pulmonares como asma e enfisema (VAN VAECK *et al.*, 1979; MIGUEL & FRIEDLANDER, 1978). A carcinogenicidade dos HPAs está associada à complexidade da molécula e o aumento do número de anéis aromáticos (BÖSTROM *et al.*, 2002; COKER *et al.*,

1997). Como este trabalho se restringiu a coleta de material particulado total, estavam presentes nos extratos utilizados neste trabalho os HPAs de maior peso molecular e potencialmente mais carcinogênicos, sendo que durante o período de safra, a porcentagem de HPAs com 5 e 6 anéis aromáticos foi notadamente maior em relação a entressafra..

O Benzo[g,h,i]perileno classificado como não carcinogênico pelo IARC, foi o principal HPA encontrado durante a safra no presente estudo. Estudos demonstram que ele sozinho não é capaz de promover a carcinogenicidade, todavia ele apresenta atividade co-carcinogênica, agindo em sinergismo com o benzo(a)pireno, aumentando a expressão gênica da enzima CYP1A1, que cataliza o catabolismo do benzo(a)pireno, gerando um metabólito genotóxico que se liga covalentemente ao DNA formando aductos (CHERNG *et al.*, 2001).

A exposição à poluição atmosférica tem sido reconhecida por contribuir para a progressão de doenças como imunossupressão, câncer e neurodegeneração. Recentes estudos têm demonstrado que a exposição à PTS de células epiteliais de pulmão e macrófagos resulta em geração de espécies oxigênio reativas, danos genotóxicos e um aumento no número de apoptoses (FRANCO *et al.*, 2009; GHANEM *et al.*, 2006). Entre os danos genotóxicos que são elevados em populações expostas estão incluídos aductos no DNA, aberrações cromossômicas, trocas entre cromátides irmãs, quebras de dupla fita de DNA, ativação do oncogene ras e expressão de p53 (SOBERANE *et al.*, 2006; SÁNCHEZ-PÉREZ *et al.*, 2009).

No presente estudo, para avaliar a citotoxicidade celular, foi utilizado o ensaio colorimétrico MTT. A partir dele foi observado um efeito dose-resposta dos poluentes em suspensão do ar atmosférico para ambos os extratos, assim como o demonstrados em outros estudos (HSIAO *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2007). O IC₅₀ para o período de

entressafra foi maior, no entanto, essa diferença não foi significativa, somente havendo porcentagem de mortes significativas na menor concentração. Desta forma novos experimentos com concentrações inferiores as utilizadas neste trabalho devem ser executadas em um futuro trabalho.

A produção de espécies oxigênio reativas tem sido relatada como tendo um papel central nos efeitos citotóxicos primários provenientes do PTS. O estresse oxidativo mediado por PTS podem surgir de várias fontes como: i) geração direta de espécies oxigênio reativas a partir da superfície das partículas, ii) compostos solúveis como metais de transição e compostos orgânicos como os HPAs, iii) função mitocondrial alterada ou NADPH-oxidase e iv) ativação de células inflamatórias capazes de gerar espécies oxigênio reativas ou espécies nitrogênio reativas (RISOM *et al.*, 2005). A presença do estresse oxidativo poderia justificar a presença de apoptose verificada no presente estudo, em todas as concentrações de safra.

A apoptose é um processo de morte celular altamente regulado que auxilia no desenvolvimento, defesa, prevenção de transformações malignas e inflamação. Os dois principais mecanismos de regulação de apoptose incluem a via intrínseca regulada pela mitocôndria e a via extrínseca mediada por ligantes de sinalização de morte celular como TNF- α ou Fas-L e ativação subsequente de caspase 8 (BORTNER & CIDLOWSKI 2002). Danos de DNA induzidos por estresse oxidativo são um dos estímulos que ativam a via intrínseca que resultam na permeabilização da membrana mitocondrial a partir de mudanças no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$). Devido ao fato da mitocôndria ser o principal sítio de geração de espécies oxigênio reativas, o rompimento de transporte de elétrons mitocondrial pode aumentar a produção de espécies oxigênio reativas, o que amplifica o estímulo de apoptose (PANDURI *et al.*, 2003). Estudos recentes demonstram que a exposição de animais e

células A549 a PM_{2,5} e PM₁₀, respectivamente levam a um aumento na expressão da proteína p53 e ativação da via apoptótica intrínseca através da geração de espécies oxigênio reativas pela mitocôndria (SOBERANES *et al.*, 2006, URICH *et al.*, 2009).

Estudos de apoptose em safra e entressafra da colheita de cana-de-açúcar, até onde conhecemos, são inexistentes. Todavia, alguns trabalhos outras fontes de material particulado (SOBERANES *et al.*, 2006, URICH *et al.*, 2009) possuem resultados que corroboram com os nossos resultados, demonstrando aumento na porcentagem de morte por apoptose em células A549. Em nosso estudo o processo de morte celular por apoptose precoce foram induzidas em safra e entressafra, com diferença significativa na menor concentração, onde apoptose precoce foi maior na safra. Resultados semelhantes ao encontrado no estudo de DAVALOS *et al.*, 2009 que observou apoptose precoce de material particulado colhidos em áreas urbanas. Outros estudos utilizando concentrações inferiores às utilizadas neste estudo devem ser realizados, pois as concentrações foram estabelecidas de acordo com os valores de IC₅₀ obtidos pelo ensaio de MTT que avalia apenas a função mitocondrial. Embora não existam estudos na literatura nós levantamos a hipótese na qual o estímulo de apoptose pode ser iniciado em estágios precoces de danos onde a função mitocondrial ainda não está comprometida. Entretanto ensaios de função mitocondrial deverão ser realizados no futuro para tornar essa hipótese consistente. Por outro lado, o MTT pode não detectar com suficiente sensibilidade a viabilidade celular e ensaios com sobrevivência clonogênica poderiam complementar os resultados obtido no presente estudo.

É possível concluir que há uma correlação entre a presença de material particulado na atmosfera no período de safra e entressafra e o aumento de citotoxicidade e sinais de apoptose, indicando que a biomassa de queima de cana-de-açúcar apresenta potencial de risco à saúde da população exposta.. Dessa forma apesar do etanol

representar uma redução do uso de fontes de energia não-renováveis, os moradores das cidades onde a cana-de-açúcar é cultivada tem sido expostos a riscos talvez mais prejudiciais que àqueles produzidos pela queima de combustíveis fósseis

6 CONCLUSÕES

1. A partir desse estudo pode-se concluir que durante o período de safra há um aumento na concentração de PTS na atmosfera e determinados HPAs (fenantreno, antraceno, benzo(a)antraceno e criseno) que são provenientes exclusivamente da queima de biomassa vegetal.
2. Foi observado um efeito citotóxico dose-resposta em linhagem de carcinoma de pulmão A549 quando tratadas com ambos os extratos de safra e entressafra
3. Nos ensaios de Anexina V e Hoechst 33342 pode-se observar que as mortes foram induzidas principalmente pelo processo de apoptose precoce.
4. A porcentagem de células vivas foi maior no período de entressafra quando comparado ao período de safra.
5. Estes resultados indicam que a poluição causada pela queima da cana-de-açúcar provoca efeitos tóxicos que poderiam causar riscos à saúde humana.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, A.G.; CARDOSO, A.A.; ROCHA, G.O. Influence of sugar cane burning on aerosol soluble ion composition in Southeastern Brazil. **Atmospheric Environment**, v.38,p. 5025–5038, 2004.

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

ARBEX, M.A. Avaliação dos efeitos do material particulado proveniente da queima da plantação de cana-de-açúcar sobre morbidade respiratória na população de Araraquara – SP. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina. Universidade de São Paulo, pp. 204, 2001.

ARBEX, M.A.; BOHM, G.M.; SALDIVA, P.H.; CONCEIÇÃO, G.M., POPE III, A.C.; BRAGA, A.L.; Assessment of the effects of sugar cane plantation burning on daily counts of inhalation therapy. **J Air Waste Manag Assoc**, v.50.n 10, p. 1745-1749, 2000.

ARBEX, M.A.; MARTINS, L. C.; OLIVEIRA, R.C.; AMADOR, L.A.; ARBEX, F.F.; CANÇADO, J.E.; SALDIVA, P.H.N.; BRAGA, A.L.F. Air pollution from biomass burning and asthma hospital admissions in a sugar cane plantation area in Brazil. **J Epidemiol Community Health**.v.61, p. 395–400, 2007.

AZEVEDO, D. A.; SANTOS, C. T. M.; NETO, F. R. A. Identification and seasonal variation of atmospheric organic pollutants in Campos dos Goytacazes, Brazil. **Atmospheric Environ.**, v. 36, p. 2383–2395, 2002.

BALSADI, O.V. Mercado de trabalho assalariado na cultura da cana-de-açúcar no Brasil no período 1992-2004. **Informações Econômicas**, São Paulo, v.37, n.2, p. 38-54, fev.2007.

BOERSMA, H. H.; KIETSELAER, B. L.; STOLK, L. M.; BENNAGHMOUCH, A.; HOFSTRA, L.; NARULA, J.; HEIDENDAL, G. A.; REUTELINGSPERGER, C. P. Past, present, and future of annexin A5: from protein discovery to clinical applications. **J Nucl Med**, v.46, n.12, p.2035-2050, 2005.

BOFFETTA, P. Human cancer from environmental pollutants: The epidemiological evidence. **Mutation Res.** v. 608, p. 157–162, 2006.

BORTNER, C.D.; CIDLOWSKI, J.A. Cellular mechanisms for repression of apoptosis. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 42, p. 259–81, 2002.

BÖSTRÖM, C.E; GERDE, P.; HANBERG, A.; JERNSTRÖM, B.; JOHANSSON, C.; KYRKLUND, T.; RANNUNG, A.; TÖRNQVIST, M; VISTORIN, K.; WESTERHOLMS, R. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient Air. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, p. 451-488, 2002.

BOUJRAD, H.; GUBKINA, O.; ROBERT, N.; KRANTIC, S.; SUSIN, S.A. AIF mediated programmed necrosis: A highly regulated way to die. **Cell Cycle**, v.6, p. 2611-2618, 2007.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. Acompanhamento da Safra Brasileira Cana-de-Açúcar Safra 2008, terceiro levantamento, dezembro 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA. Secretaria de Política Agrícola. Agricultura Brasileira em Números, 2008. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/pls/portal/docs/PAGE/MAPA/SERVICOS/USINAS_DESTILARIAS/USINAS_CADA_STRADAS/UPS_11-07-2008_0.PDF>. Acesso em: 18 de maio de 2009.

BRASIL. Ministério das Minas e Energia. Empresa de Pesquisa Energética – EPE. Perspectivas para o Etanol no Brasil. 2008. Disponível em: <http://www.epe.gov.br/Petroleo/...28/Cadernos%20de%20Energia%20-%20Perspectiva%20para%20o%20etanol%20no%20Br>. Acesso em: 18 de maio de 2009.

CANÇADO, J. E. D.; BRAGA, A.; PEREIRA, L. A. A.; ARBEX, M. A.; SALDIVA, P. H. N.; SANTOS, U. P. Repercussões clínicas da exposição à poluição atmosférica. **J Bras Pneumol**, v. 32, supl 2, p. 23-29, 2006a.

CANÇADO, J. E. D.; SALDIVA, P. H. N.; PEREIRA, L. A. A.; LARA, L. B.L.S.; ARTAXO, P.; MARTINELLI, L. A.; ARBEX, M. A.; ZANOBETTI, A.; BRAGA, A. L. F. The impact of sugar cane-burning emissions on the respiratory system of children

and the elderly. **Environ. Health Perspectives**, v. 114, n. 5, 2006 b.

CHAKRA, O. R.A.; JOYEUX, M.; NERRIÉRE, E.; STRUB, M.P.; ZMIROU-NAVIER, D. Genotoxicity of organic extracts of urban airborne particulate matter: An assessment within a personal exposure study. **Chemosphere**,v. 66, p.1375–1381, 2007.

CHERNG,S.H.; LIN, P.; YANG, J.L.; HSU, S.L.; LEE, H. Benzo[*g,h,i*]perylene synergistically transactivates benzo[*a*]pyrene- induced CYP1A1 gene expression by aryl hydrocarbon receptor pathway. **Toxicol. Applied Pharmacol**, v. 170, p. 63–68, 2001.

CLAXTON, L.D.; MATTHEWS, P.P.;WARREN, S.H. The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: Salmonella mutagenicity. **Mutat Res**,v. 567,p. 347–399,2004

COELHO, C.H.; FRANCISCO, J.G.; NOGUEIRA, R.F.P. CAMPOS, M.L.A.M. Dissolved organic carbon in rainwater from areas heavily impacted by sugar cane burning. **Atmospheric Environment**,v. 42, p. 7115–7121, 2008.

COKER, D.T.; KING, A.G.; MUMFORD, D.L.; NESSEL, C.S. Carcinogenic assessment of petroleum products by nuclear magnetic resonance. **Analytical Communications**, v. 34, p. 137–140,1997.

Centro de Previsão de Tempo e Estudos Climáticos - CPTEC. Disponível em:
www.cptec.inpe.br/queimadas. Acesso em 18 de maio de 2009.

CRUTZEN, P.J; ANDREAE, M.O. Biomass burning in the tropics: impact on atmospheric chemistry and biogeochemical cycles. **Science**, v.250, p. 1669-1678, 1990.

CURRIE, L.A. International recommendations offered on analytical detection and quantification concepts and nomenclature. **Anal. Chim. Acta**, v. 391, p. 103–134, 1999.

DÁVALOS, A.M.; SÁNCHEZ, M.J.I.; GALLEGOS, J.L.V.; MORENO, E.A.; MARURE, R.L. Oxidative stress and apoptosis are induced in human endothelial cells exposed to urban particulate matter. **Toxicol. In Vitro**, doi:10.1016/j.tiv.2009.08.004, 2009.

DONALDSON, K.S.; CLOUTER, A.; MACNEE, W. Ultrafine Particles. **Occup Environ Med**, v. 58, p. 211-216, 2001.

ELSON, D.M. Atmospheric pollution: a global problem. 2nd ed. Oxford: Blackwell, p.3, 1992.

EMBRAPA – Impacto Ambiental da cana-de-açúcar. 2009. Disponível em: <http://www.cana.cnpm.embrapa.br/>. Acesso em 27 de julho de 2009.

ENGELAND, M.V.; NIELAND, L.J.W.; RAMAEKERS, F.C.S.; SCHUTTE, B.; REUTELONGSPERGER, C.M. Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**, v. 31, p. 1-9, 1998.

Environmental Protection Agency – EPA. Air quality criteria for particulate matter.

U.S. **Environmental Protection Agency**, Washington, D.C. EPA 600/P-95/001, 2003.

Environmental Protection Agency – EPA. Carcinogen assessment group. Evaluation and estimation of potential carcinogenic risks of polynuclear aromatic hydrocarbons. Cincinnati, 1998.

ESKELINEN, E.L.; SAFTIG, P. Autophagy: A lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1793, p. 664–673, 2009.

FADELL, B.; GLEISS, B.; HÖGSTRAND, K.; CHANDRA, J. WIEDMER, T.; SIMS, P.J.; HENTER, J.H.; ORRENIUS, S.; SAMALI, A. Phosphatidylserine Exposure during Apoptosis Is a Cell- Type-Specific Event and Does Not Correlate with Plasma Membrane Phospholipid Scramblase Expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 266, p. 504–511, 1999.

FRANCO, R.; SÁNCHEZ-OLEA, R.; REYES-REYES, E.M.; PANAYIOTIDIS, M.I. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. **Mutation Research**, v. 674, p. 3–22, 2009.

FREDO, C.E.; VICENTE, M.C.M.; BAPTISTELLA, C.S.L.; VEIGA, J.E.R. Cana-de-açúcar: índice de mecanização em SP. **Agroanalysis**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 3, p. 16-17, mar. 2008.

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

GHANEM, M.M.; BATTELLI, L.B.; MERCER, R.R.; SCABILLONI, J.F.; KASHON, M.L.; MA, J.Y.C.; NATH, J.; HUBBS, A.F. Apoptosis and Bax Expression are Increased by Coal Dust in the Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Exposed Lung. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, p. 1367- 1373, 2006.

GEWIES, A. **Introduction to Apoptosis. Apo Review**. p, 1 – 26, 2003.

GREEN, D.R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, v.281, p. 1309–12, 1998.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A.B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, p. 335-343, 2007.

GUSTAFSON, P.; ÖSTMAN, C.; SÄLLSTEN, G.; Indoor levels of polycyclic aromatic hydrocarbons in homes with or without wood burning for heating. **Environ. Sci. Technol**, v. 42, p. 5074-5080, 2008.

HASHIMOTO, Y.; SHIMADA, Y.; ITAMI, A.; KAWAMURA, J.; KAWABE, A.; KAGANOI, J. Growth inhibition through activation of peroxisome proliferator

activated receptor γ in human oesophageal squamous cell carcinoma. **European Journal of Cancer**, v.39, p. 2239–2246, 2003.

HORNSBY, P. Senescence as an anticancer mechanism. **Journal of Clinical Oncology**, v.25, p. 1852-1857, 2007.

HSIAO, W.L.; MO, Z.Y.; FANG, M.; SHI, X.M.; WANG, F. Cytotoxicity of PM_(2.5) and PM_(2.5-10) ambient air pollutants assessed by the MTT and the Comet assays. **Mutation Res**, v. 471, p. 45–55, 2000.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística IBGE, Sistema IBGE de Recuperação Automática – SIDRA. Banco de Dados Agregados, 2007. Disponível em <http://www.sidra.ibge.gov.br/>. Acesso em 18 de maio de 2009.

Instituto Nacional de Câncer Norte-americano – INCN. Report of the lung cancer progress. Review Group, 2001.

International Agency for Research on Cancer - IARC. Monographs on the Overall Evaluations of Carcinogenicity to humans. List of all agents, mixtures and exposures evaluated to date; **IARC Monographs**, v. 1-100A, 2009.

International Agency for Research on Cancer - IARC. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans ; Lyon, France, V. 92, in preparation.

KAMPA, M.; CASTANAS, E. Human health effects of air pollution. **Environmental Pollution**, v. 151, p. 362-367, 2008.

KIECHLER, F.L.; ZHANG, X. Apoptosis: biochemical aspects and clinical implications. **Clinica Chimica Acta**, v. 326, p. 27–45, 2002.

LARA, L.B.L.S.; ARTAXO, P.; MARTINELLI, L.A.; CAMARGO, P.B.; VICTORIA, R.L.; FERRAZ, E.S.B. Properties of aerosols from sugar-cane burning emissions in Southeastern Brazil. **Atmos Environ**, v. 39, p. 4627–4637, 2005.

LARA, L.B.L.S.; ARTAXO, P.; MARTINELLI, L.A.; VICTORIA, R.L.; CAMARGO, P.B.; KRUSCHE, A. Chemical composition of rainwater and anthropogenic influences in the Piracicaba River basin, southeast Brazil. **Atmosph Environ**, v. 35, p. 4937–4945, 2001.

LOPES, F. S.; RIBEIRO, H. Mapeamento de internações hospitalares por problemas respiratórios e possíveis associações à exposição humana aos produtos da queima da palha de cana-de-açúcar no estado de São Paulo. **Rev Bras Epidemiol**, v 9, nº 2, p. 215-225, 2006.

MACFARLANE, M.; WILLIAMS, A.C. Apoptosis and disease: a life or death decision. **EMBO reports**, v. 5, p. 674-678, 2004.

MARINHO, E.V.A.; KIRCHHOFF, V.W.J.H. Projeto fogo: Um experimento para avaliar efeitos das queimadas de cana-de-açúcar na baixa atmosfera. **Revista Brasileira**

de geofísica. v, 9, n. 2, p. 107-119. 1991.

MARVIN, C.H.; HEWITT, L.M. Analytical methods in bioassay-directed investigations of mutagenicity of air particulate material. **Mutat Res**, v. 636,p. 4-35. 2007.

MAZZOLI-ROCHA, F.; MAGALHÃES, C.B.; MALM, O.; SALDIVA, P.H.N.; ZIN, W.A.; FAFFE, D.S. Comparative respiratory toxicity of particles produced by traffic and sugar cane burning. **Environ. Res.** doi:10.1016/j.envres.2008.05.004, 2008.

MEIER, P.; FINCHI, A.; EVAN, G. Apoptosis in development. **Nature**, v. 407, p. 796-801, 2000.

MIGUEL, A. H.; FRIEDLANDER, S.K. Distribution of benzo(a)pyrene and coronene with respect to particle size in Pasadena aerosols in the submicron range. **Atmos Environ**, v. 12,p. 2407–13, 1978.

MIGUEL, S. A polêmica do “carvãozinho”. Disponível em: Jornal da USP, n 738, 2005.

MONTREUIL, C.N.; BALL, J.C.; GORSE JR., R.A.; YOUNG, W.C. Solvent extraction efficiencies of mutagenic components from diesel particles. **Mutat. Res**, v. 282,p. 89–92,1982.

MUMFORD, J.L.; LEE, X.; LEWTAS, J.; YOUNG, T.L.; SANTELLA, R.M. DNA Adducts as biomarkers for assessing exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in

tissues from Xuan Wei women with high exposure to coal combustion emissions and high lung cancer mortality. **Environmental Health Perspectives**, v. 99, p. 83-87, 1993.

National Institute for Occupational safety – NIOSH. Polynuclear aromatic hydrocarbons by HPLC: method 5506. In: **NIOSH manual of analytical methods (NMAM)**. 4th ed. 1998. Disponível em: <<http://0-www.cdc.gov/niosh/docs/2003-154/pdfs/5506.pdf>> Acesso em: 11 dez. 2009.

OKADA, H.; MAK, T.W. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer**, v. 4, p. 592-603, 2004.

PANDURI, W.; WEITZMAN, S.A.; CHANDEL, N.; KAMP, D.W. The Mitochondria-Regulated Death Pathway Mediates Asbestos-Induced Alveolar Epithelial Cell Apoptosis. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol**, v. 28, p. 241–248, 2003.

PARKIN, D. M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer J. Clin**, v. 55, p.74–108, 2005.

POSCHL, U. Atmospheric aerosols: composition, transformation, climate and health effects. **Angew Chem. Int. Ed. Engl**, v. 44, p. 7520 – 7540, 2005.

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

RE-POPPI, N.; SANTIAGO-SILVA, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons and other selected organic compounds in ambient air of Campo Grande City, Brazil. **Atmospheric Environment**, v. 39, p. 2839-2850, 2005.

RIBEIRO, H. Sugar cane burning in Brazil: respiratory health effects. **Rev Saúde Pública**, v. 42, p. 2-6, 2008.

RISOM, L.; MOLLER, P.; LOFT, S. Oxidative stress-induced DNA damage by particulate air pollution. **Mutation Research**, v. 592, p. 119–137, 2005.

SÁNCHEZ-PÉREZ, Y.; CHIRINO, Y.I.; OSORNIO-VARGAS, A.R.; MORALES-BÁRCENAS, R.; CO GUTIÉRREZ-RUÍZ, N.; VÁZQUEZ-LÓPEZ, C.; GARCÍA-CUELLAR, C.M. DNA damage response of A549 cells treated with particulate matter (PM10) of urban air pollutants. **Cancer Letters**, v. 278, p. 192–200, 2009.

SÃO PAULO. Instituto Econômico Agrícola de São Paulo – IEA. Substituição de empregos por máquinas: uma simulação para o corte da cana-de-açúcar em São Paulo, 2002. Disponível em <<http://www.iea.sp.gov.br/out/verTexto.php?codTexto=111>>. Acessado em 22 de maio de 2009.

SILVA, F.S. Otimização e validação de método para a análise de HPAs em “rapadura”. 105 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, São Paulo, Brazil, 2006.

SHARMA, A.K.; JENSEN, K.A.; RANK, J.; WHITE, P.A.; LUNDSTEDT, S.; GAGNE, R. JACOBSEN, N.R. Genotoxicity, inflammation and physico-chemical properties of fine particle samples from an incineration energy plant and urban air. **Mutation Research**, v. 633, p. 95–111, 2007.

SHI, Y. Mechanisms of caspase activation and activation and inhibition during apoptosis. **Mol Cell**, v. 9, p. 459–70, 2002.

SIMONEIT, B.R.T. Biomass burning — a review of organic tracers for smoke from incomplete combustion. **Applied Geochemistry**, v, 17, p. 129–162, 2002.

ŠKAREK, M.; JANOŠEK, J.; ČUPR, P.; KOHOUTEK, J.; NOVOTNÁ-RYCHESTKÁ, A.; HOLOUBEK, I. Evaluation of genotoxic and non-genotoxic effects of organic air pollution using in vitro bioassays. **Environment International**, v. 33, p. 859-866, 2007.

SMITH, K.R.; CORVALAN, C.T.; KJELLSTROM, T. How much global ill health is attributable to environmental factors? **Epidemiology**, v. 10, p. 573–584, 1999.

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

SOBERANES, S.; PANDURI, V.; MUTLU, G.M.; GHIO, A.; BURDINGER, G.R.S.; KAMP, D.W. p53 mediates particulate matter-induced alveolar epithelial cell mitochondria-regulated apoptosis. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 174, p. 1229–1238, 2006.

SUBRAMANIAN, J & GOVINDAN, R. Lung cancer in never smokers: a review. **J. Clin. Oncol.** v, 25, p. 561–570, 2007.

SUN, S.; SCHILLER, J.H.; GAZDAR, A.F. Lung cancer in never smokers - a different disease. **Nature Reviews**, v. 7, p. 778-791, 2007.

SUN, Y.; PENG, Z-L.; Programmed cell death and cancer. **Postgrad Med J**, v. 85, p. 134–140, 2009.

UMBUZEIRO, G.A.; FRANCO, A.; MAGALHÃES, D.; CASTRO, F.J.V.; KUMMROW, F.; RECH, C. M.; CARVALHO, L. R. F.; VASCONCELLOS, P.C. A Preliminary Characterization of the Mutagenicity of Atmospheric Particulate Matter Collected During Sugar Cane Harvesting Using the Salmonella/Microsome Microsuspension Assay. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.49, p. 249-255, 2008.

URICH, D.; SOBERANES, S.; BURGESS, Z.; CHIARELLA, S.E.; GHIO, A.J.; RIDGE, K.M.; KAMP, D.W.; CHANDEL, N.S.; MUTLU, G.M.; BUDINGER, G.R.S. Proapoptotic Noxa is required for particulate matter induced cell death and lung inflammation. **The FASEB Journal**, v. 23, p. 2055-2064, 2009.

VAN VAECK, L.; BRODIN, G.K.; VAN CAUWENBERGHE. Differences in particle size distributions of major organic pollutants in ambient aerosols in urban, rural, and seashore areas. **Environ. Sci. Technol**, v.13, n.12, p. 1494–1502, 1979.

VERMES, I.; HAANEN, C.; STEFFENS-NAKKEN, H.; REUTELINGSPERGER, C.; A novel assay for apoptosis Flow cytometric detection of phosphatidylserine early apoptotic cells using fluorescein labelled expression on Annexin V . **Journal of Immunological Methods**, v. 184, p. 39-51, 1995.

World Health Organization – WHO. Environmental Health Criteria 202: Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons. IPCS, International Programme on Chemical Safety. World Health Organization, Geneva, 1998.

World Health Organization – WHO., Guidelines for Air Quality, WHO, Geneva, Chapter 3, 1999.

YUNKER, M. B.; MACDONALD, R. W.; VINGARZAN, R.; REGINALD, H. M.; GOYETTE, D.; SYLVESTRE, S. PAHs in the Fraser River basin: a critical appraisal of PAH ratios as indicators of PAH source and composition. **Organic Geochemistry**, v. 33, p. 489-515, 2002.

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

ZHANG, J.; ONG, C.N.; SHEN, H.M. Involvement of proapoptotic Bcl-2 family members in parthenolide induced mitochondrial dysfunction and apoptosis. **Cancer Letters**, v. 211, n.2, p. 175-188, 2004.

ZHANG, Z.; CHE, W.; LIANG, Y.; WU, M.; LI, N.; SHU, Y.; LIU, F.; WU, D. Comparison of cytotoxicity and genotoxicity induced by the extracts of methanol and gasoline engine exhausts. **Toxicology in Vitro**, v. 21, p. 1058–1065, 2007.

ZHAO, X.; WAN, Z.; ZHU, H. CHEN, R. The carcinogenic potential of extractable organic matter from urban airborne particles in Shanghai, China. **Mutation Research**, v. 540, p. 107–117, 2003.

ZHAO, Y.; WANG, S.; AUNAN, K.; SEIP, H. M.; HAO, J. Air pollution and lung cancer risks in China—a meta-analysis. **Science of the Total Environment**, v. 366, p. 500–513, 2006.