

DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO "IN VIVO" DO BENZO[E]PIRENO, DIBENZO[A,H]ANTRACENO, NAFTALENO E ANTRACENO PRESENTES NA FULIGEM DA QUEIMADA DA CANA-DE-AÇÚCAR

RAQUEL BORTOLIN DA SILVA**
CARLOS ALBERTO ARCARO FILHO*
RENATA DESSORDI*
RODRIGO LATANZE***
CAIO TALES ALVARES COSTA****
LUCIANA REZENDE ALVES DE OLIVEIRA*****

O objetivo deste estudo foi detectar a presença de antraceno, naftaleno, benzo[e]pireno e dibenzo[a,h]antraceno na fuligem da cana-de-açúcar e avaliar a toxicidade *in vivo* por meio da frequência média de aberrações cromossômicas. A análise cromatográfica (em fase gasosa) efetuada na fuligem revelou a presença dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) estudados. O teste de micronúcleo, realizado em células ósseas de camundongos, mostrou que benzo[e]pireno e dibenzo[a,h]antraceno apareceram com frequência aumentada no micronúcleo nas doses testadas. No entanto, o antraceno e o naftaleno não apresentaram potencial genotóxico. Os dados sugerem que é necessário considerar o potencial de risco oferecido pela fuligem para os cortadores de cana e para a população que vive em áreas canavieiras.

PALAVRAS-CHAVES: HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS; MUTAÇÃO CROMOSSÔMICA; TESTE DE MICRONÚCLEO.

- * Aluno de Iniciação Científica, Curso de Farmácia, Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP), Ribeirão Preto, SP (e-mail: carlos_arcaro@hotmail.com).
- * Aluna de Iniciação Científica, Curso de Nutrição, UNAERP, Ribeirão Preto, SP (e-mail: re_dessordi@hotmail.com).
- ** Engenheira Química, UNAERP, Ribeirão Preto, SP (e-mail: raquelbortolin@hotmail.com).
- *** Mestre em Tecnologia Ambiental, Professor, UNAERP, Ribeirão Preto, SP (e-mail: rlatanze@unaerp.br).
- **** Mestre e Doutor em Genética, Professor, Coordenador dos Laboratórios de Anatomia e Microscopia, UNAERP, Ribeirão Preto, SP (e-mail: ccosta@unaerp.br).
- ***** Mestre em Bioquímica e Doutora em Química, Professora, UNAERP, Coordenadora do Comitê em Ética e Pesquisa com Seres Humanos, Ribeirão Preto, SP (email: Iderezende@yahoo.com.br).

1 INTRODUÇÃO

Embora o Brasil seja grande produtor de açúcar desde o final do século XVI, sua maior expansão ocorreu a partir da década de 70 com o advento do PROÁLCOOL, programa desenvolvido pelo governo brasileiro para estimular a produção de etanol, usado como combustível de automóveis. Na média, 55% da cana brasileira gera álcool e 45% açúcar (SANTOS, AZEVEDO e AQUINO-NETO, 2002). O Estado de São Paulo responde por 60% da produção nacional, sendo 64% de álcool e 56% de açúcar. Na época da safra, as plantações de cana-de-açúcar passam pela queima pré-colheita para facilitar o trabalho dos cortadores e protegê-los, pois elimina do local o excesso de folhas e palhiço e espanta os animais peçonhentos (cobras, escorpiões, etc.) muito comuns nas plantações. A queima da cana também melhora o rendimento do corte manual (aumentado em até 10 vezes), auxilia no preparo do terreno para novos plantios e aumenta a quantidade de açúcar por peso, devido à evaporação da água (SANTOS, AZEVEDO e AQUINO-NETO, 2002). Entretanto, a prática de queimar palha de cana-de-açúcar acarreta problemas de poluição do ar em razão da grande emissão de fumaça e fuligem que podem atingir os centros urbanos, trazendo sérios transtornos à população das cidades canavieiras. Os residentes nas cidades próximas aos canaviais evidenciam problemas respiratórios, notadamente crianças e idosos (SANTOS, AZEVEDO e AQUINO-NETO, 2002). Como 80% do corte da cana-de-açúcar é executado por processos manuais, os cortadores de cana ficam diretamente expostos à fumaça à fuligem no período da colheita.

A queima da biomassa provoca a liberação de diversos compostos na atmosfera, incluindo compostos carcinogênicos e/ou mutagênicos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) (SANTOS, AZEVEDO e AQUINO-NETO, 2002; KALAITZOGLOU, TERZI e SAMARA, 2004).

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) constituem família de compostos que apresentam dois ou mais anéis aromáticos condensados e dezesseis deles são incluídos como poluentes prioritários na lista da United States Environmental Agency (USEPA): naftaleno, acenaftíleno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoreteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[e]acefenantrileno, benzo[k]fluoranteno, benzo[e]pireno, benzo[a]pireno, dibenzo[a,h]antraceno e benzo[g,h,i]períleno (WATERS, STACK e JACKSON, 1999; O'NEILL e FISHBEIN, 1986).

A elevada taxa anual de mortalidade de pessoas com diferentes tipos de cânceres expõe claramente os benefícios do entendimento, da avaliação e do controle da exposição humana às substâncias com atividade carcinogênica/mutagênica, considerando que a maioria dos cânceres resultam de interações não só genéticas como também ambientais (JONGENEELLEN, 2001; PERERA, 1997).

A atividade carcinogênica dos HPA é atribuída à presença conjunta de benzo[a]pireno, outros membros dessa família e de alguns de seus derivados, principalmente os nitroderivados (SHIMADA, 2006; HARVEY, 1991).

Os compostos policíclicos aromáticos são metabolizados por diversas enzimas xenobióticas que participam da conversão dos HPA em metabólitos mais solúveis em água que, portanto, podem ser excretados no sangue (SHIMADA, 2006). Entretanto, vários intermediários reativos instáveis de HPA se formam durante as etapas do metabolismo e atacam o DNA, causando transformação e toxicidade celular (SHIMADA, 2006; HECHT, 2002; ANGERER, MANNSCHERECK e GUNDEL, 1997).

A carcinogenicidade dos HPA tem sido observada principalmente nos compostos tritetra, penta e hexacíclicos. Tumores são frequentemente encontrados na região superior do compartimento traqueobronquial, provavelmente devido ao fluxo de retorno de numerosas partículas depositadas próximas aos bronquíolos, causando o acúmulo de possíveis constituintes carcinogênicos numa área relativamente pequena (SHIMADA, 2006; GRIMMER *et al.*, 1997; LEE e WRIGHT, 1980). Além disso, os efeitos carcinogênicos e mutagênicos desses compostos têm sido indicados por estudos

epidemiológicos, ensaios com animais e pelo teste de Ames (GRIMMER *et al.*, 1997; SABBIONI *et al.*, 2006; MAST, HSIEH e SEIBER, 1984).

A análise biológica dos danos no material genético pode ser realizada pelo teste de micronúcleo, que avalia os efeitos genotóxicos de compostos químicos (SASAKI *et al.*, 2000; MORITA *et al.*, 1997).

O teste de micronúcleo *in vivo*, descrito originalmente por Heddle (1973) e modificado por Schmid (1975), constitui alternativa para estudos citogenéticos em medula óssea de mamíferos, fornecendo medida direta da frequência de aberrações cromossômicas numéricas e estruturais (MAVOURNIN *et al.*, 1990). Trata-se de excelente marcador para exposições humanas a agentes mutagênicos (MIELZYNSKA *et al.*, 2006; SARTO *et al.*, 1987).

No presente estudo foram analisados quatro HPA (antraceno, naftaleno, dibenzo[a,h]antraceno e benzo[e]pireno) presentes na fuligem da queima da palha da cana-de-açúcar coletada no estado de São Paulo, região de Ribeirão Preto. Para a análise citogenética desses compostos aromáticos foi realizado o teste *in vivo* da toxicidade dos HPA por meio da medida direta da frequência de aberrações cromossômicas estruturais e numéricas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 QUEIMA DA PALHA DA CANA-DE-AÇÚCAR

A queima da palha da cana-de-açúcar, planejada conforme o regulamento do Departamento Estadual de Proteção dos Recursos Naturais (DEPRN) e da Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), foi realizada no período noturno, das 20 h às 6 h, de acordo com o horário autorizado pela Secretaria do Meio Ambiente do estado de São Paulo.

Os cuidados preliminares foram essenciais. Para isso, foram utilizados canhões d'água de caminhões tanques, os quais molharam as áreas em volta do talhão a ser queimado, evitando que o fogo se espalhasse para outro local. Nessa etapa contou-se com o auxílio de equipe formada por oito homens, paramentados com roupas anti-chama, óculos de proteção de ampla visão incolor com válvula de ventilação, luvas e calçados de segurança para preparar a área a ser queimada. O ateador, que estava munido de botijão de gás de 2 kg, levou pequeno feixe com, aproximadamente, cinco palhas da cana dobradas em formato de tocha e dirigiu-se ao meio do carreador para colocar fogo na tocha. Com o auxílio do lança chama, foi caminhando e colocando fogo nas palhas com espaçamento de mais ou menos 2,0 m.

2.2 PREPARO DA AMOSTRA

A fuligem resultante da queima da palha da cana-de-açúcar (2,5187 g), coletada na cidade de Ribeirão Preto (SP), passou por processo de extração orgânica (descrito por Magalhães, Bruns e Vasconcellos, 2007) com 90 mL de diclorometano em ultrassom por 36 minutos e foi filtrada em papel Watmann 40. Concentrou-se o extrato obtido em rotaevaporador (marca Fisaton) até 25 mL.

2.3 CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA

Para investigação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos utilizou-se cromatógrafo à gás, da marca Varian, modelo STAR 3600 CX, acoplado a detector de ionização de chama (DIC) e coluna capilar de sílica fundida (DB-5) de 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de filme.

Iniciou-se a operação do cromatógrafo com temperatura de 80°C durante 3 minutos, com posterior aquecimento até 240°C a razão de 5°C/min, permanecendo por 5 minutos. A temperatura do injetor foi de 200°C e a do detector de 300°C. Usou-se Hélio (He) como gás de arraste com fluxo de 1,5 mL/min e injeção de split 5:1 com volume de injeção de 1,0 µL (MAGALHÃES BRUNS e VASCONCELLOS, 2007).

2.4 CONDIÇÕES DE MANUTENÇÃO DE ANIMAIS NO LABORATÓRIO EXPERIMENTAL ANIMAL

Os camundongos foram alojados no Laboratório Experimental Animal da Universidade de Ribeirão Preto, conforme padrões preconizados internacionalmente no que se refere às condições ambientais para experimentação animal, sendo mantidos no interior de estantes isoladoras, com no máximo cinco animais por caixa de polipropileno, medindo 49x34x16 (CxLxA).

Os animais tinham acesso à água *ad libitum* e recebiam ração balanceada. As estantes isoladoras garantem condições de assepsia e isolamento térmico em relação ao ambiente, com temperatura no interior das estantes em torno de 22°C. Além disso, havia isolamento acústico e olfativo, condição importante para a ausência de situações estressantes ao animal.

Os animais permaneceram num ciclo de claro-escuro de 12 horas por meio de *timers*, instalados em todas as salas de manutenção (COBEA, 1991)

2.5 TESTE DE MICRONÚCLEOS

Foram utilizados camundongos da variedade albino suíço, espécie *Mus musculus*, linhagem Rockefeller, com seis a oito semanas de idade, peso médio de 40 g e aclimatados por 1 semana antes de receberem as substâncias a serem testadas.

Utilizaram-se quatro grupos de animais (N=3), sendo um grupo para cada HPA testado: antraceno, naftaleno, dibenzo[a,h]antraceno e benzo [e]pireno. Cada animal recebeu uma única administração (0,15 mL) intraperitoneal do composto policíclico aromático, previamente dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO). Cada HPA testado foi avaliado em três diferentes concentrações: 8,5; 17 e 34 mg/Kg de peso corporal.

O teste de micronúcleo foi realizado utilizando-se a técnica de coloração com laranja de acridina (AO) para análise da frequência de micronúcleos em reticulócitos de sangue periférico, conforme Hayashi *et al.*, 1990.

O corante AO (Sigma) foi dissolvido em água destilada na concentração de 1mg/mL, efetuando-se esfregaço com 10 µL dessa solução em lâminas pré-aquecidas a ±70°C. As lâminas foram estocadas em caixa escura à temperatura ambiente por pelo menos 24 horas.

Coletou-se o sangue periférico por meio de pequeno corte na extremidade da cauda dos animais, 24 h e 48 h após a administração intraperitoneal do composto policíclico aromático. Uma gota de sangue foi colocada no centro da lâmina, previamente preparada com AO e coberta com lamínula. As lâminas foram então guardadas no freezer (-20°C), no escuro, por pelos menos 10 horas.

A análise das lâminas ocorreu em microscópio de fluorescência (aumento 40 X), combinando luz azul (488 nm) e filtro amarelo ou laranja (515 nm), por um único observador. Para cada animal foram contados 2000 reticulócitos intactos corados em vermelho e a frequência de células micronucleadas que emitiam cor amarelo-esverdeada fluorescente foi registrada. Os grupos foram comparados por meio de análise de variância (ANOVA) e teste t-STUDENT de amostras independentes e variâncias diferentes, utilizando-se o programa STATISTIC (STATSOFT, 1998).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A queima da biomassa introduz diversos compostos na atmosfera, incluindo compostos carcinogênicos e/ou mutagênicos, como os HPA (SANTOS, AZEVEDO e AQUINO-NETO, 2002; KALAITZOGLOU, TERZI e SAMARA, 2004; ANDREAE, 2007), que se caracterizam por dois ou mais anéis aromáticos condensados. São formados durante a combustão incompleta de compostos contendo carbono e hidrogênio e estão presentes na atmosfera, tanto na fase gasosa como na

particulada (VASCONCELOS *et al.*, 1998; LOPES e ANDRADE, 1996).

A prática de queimar palha de cana-de-açúcar acarreta problemas de poluição do ar em razão da grande emissão de fumaça e fuligem que podem atingir os centros urbanos, trazendo vários transtornos à população das cidades canavieiras.

A técnica de cromatografia em fase gasosa tem sido bastante utilizada na identificação de compostos policíclicos aromáticos, devido sua elevada sensibilidade (DAISY *et al.*, 2002; TAKAHASHI *et al.*, 1979; LEE, NOVOTNY e BARTLE, 1976). O cromatograma referente à mistura padrão a 10 ppm de antraceno (178,23 g/mol), naftaleno (128,17 g/mol), dibenzo[a,h]antraceno (278,35 g/mol) e benzo[e]pireno (252,32 g/mol) pode ser visualizado na Figura 1. Analisando o cromatograma do extrato de fuligem da cana-de-açúcar da Figura 2 e comparando-o com os tempos de retenção dos padrões (respectivamente 10,001; 22,455; 30,974 e 37,922) nota-se a presença dos quatro HPA investigados. Embora esses hidrocarbonetos não tenham sido avaliados quantitativamente, a sua presença por si só alerta sobre a exposição dos cortadores de cana-de-açúcar e da população das cidades próximas à essas regiões.

Os compostos policíclicos aromáticos são poucos solúveis em água e em geral sua solubilidade diminui com o aumento do número de anéis. Por outro lado, a volatilidade desses compostos diminui com o aumento da massa molecular.

A concentração de cada componente em ambas as fases é função de sua volatilidade e de sua afinidade pelas superfícies das partículas atmosféricas. As meias vidas dos compostos de maior massa molecular são relativamente elevadas e sua degradação lenta (BOUCHEZ *et al.*, 1999). Em virtude de suas propriedades físico-químicas e da grande distribuição ambiental, o risco de contaminação humana por compostos, que apresentam grande afinidade lipofílica, pode ocorrer por absorção pela pele, por ingestão ou por inalação, sendo rapidamente distribuídos pelo organismo (NETTO *et al.*, 2000).

O primeiro indício de carcinogenicidade química de produtos de combustão orgânica foi publicado em 1775, quando ocorreu maior incidência de cânceres em limpadores de chaminés (WILD e JONES, 1995).

A atividade carcinogênica/mutagênica de vários HPA tem sido publicada (LIU *et al.*, 2006; DAÍ, RAN e HARVEY, 2005; HARVEY *et al.*, 2004; GUTTENPLAN *et al.*, 2001; KHALILI *et al.*, 2000; KOSINSKA, PRESSENTIN e GUTTENPLAN, 1999; TOKIWA *et al.*, 1994; HARVEY, 1991) e demonstrado que esses compostos não são mutagênicos diretos e necessitam sofrer ativação metabólica preliminar para reagirem com o DNA e outras moléculas (HARVEY *et al.*, 2004; HARVEY, 1991).

Testes que investigaram a capacidade do antraceno em induzir danos no DNA e mutações gênicas em procarioto (BALANSKY *et al.*, 2006; JONGENEELLEN, 1997; BOS *et al.*, 1988; DE FLORA *et al.*, 1984; MCCARROLL, PIPER e KEECH, 1981; ROSENKRANTZ e POIRIER, 1979), em células de fungos (SIMMON, 1979) e em células de eucariotos (TONG, BRAT e WILLIAMS, 1981; LUBET *et al.*, 1983) foram negativos. Os resultados obtidos no presente trabalho também mostraram que o antraceno não apresenta efeito mutagênico uma vez que não foi capaz de induzir aumento significativo na frequência de micronúcleos nas doses testadas.

As frequências de micronúcleos em reticulócitos de sangue periférico em camundongos podem ser observadas na Tabela 1. Os HPA naftaleno e antraceno, nas três doses testadas (8,5; 17,0 e 34,0 mg/Kg de peso corporal), não mostraram aumento significativo na frequência de reticulócitos micronucleados ($P < 0,05$) nos dois tempos de coleta do sangue periférico, 24 e 48 horas, após a administração da substância. Aumento significativo na frequência dos reticulócitos micronucleados ($P < 0,05$) foi observado somente na dose de 34,0 mg/Kg de peso corporal para o dibenzo[a,h]antraceno e para o benzo[e]pireno nos dois tempos de coleta do sangue periférico (24 e 48 horas) após a administração desses HPA.

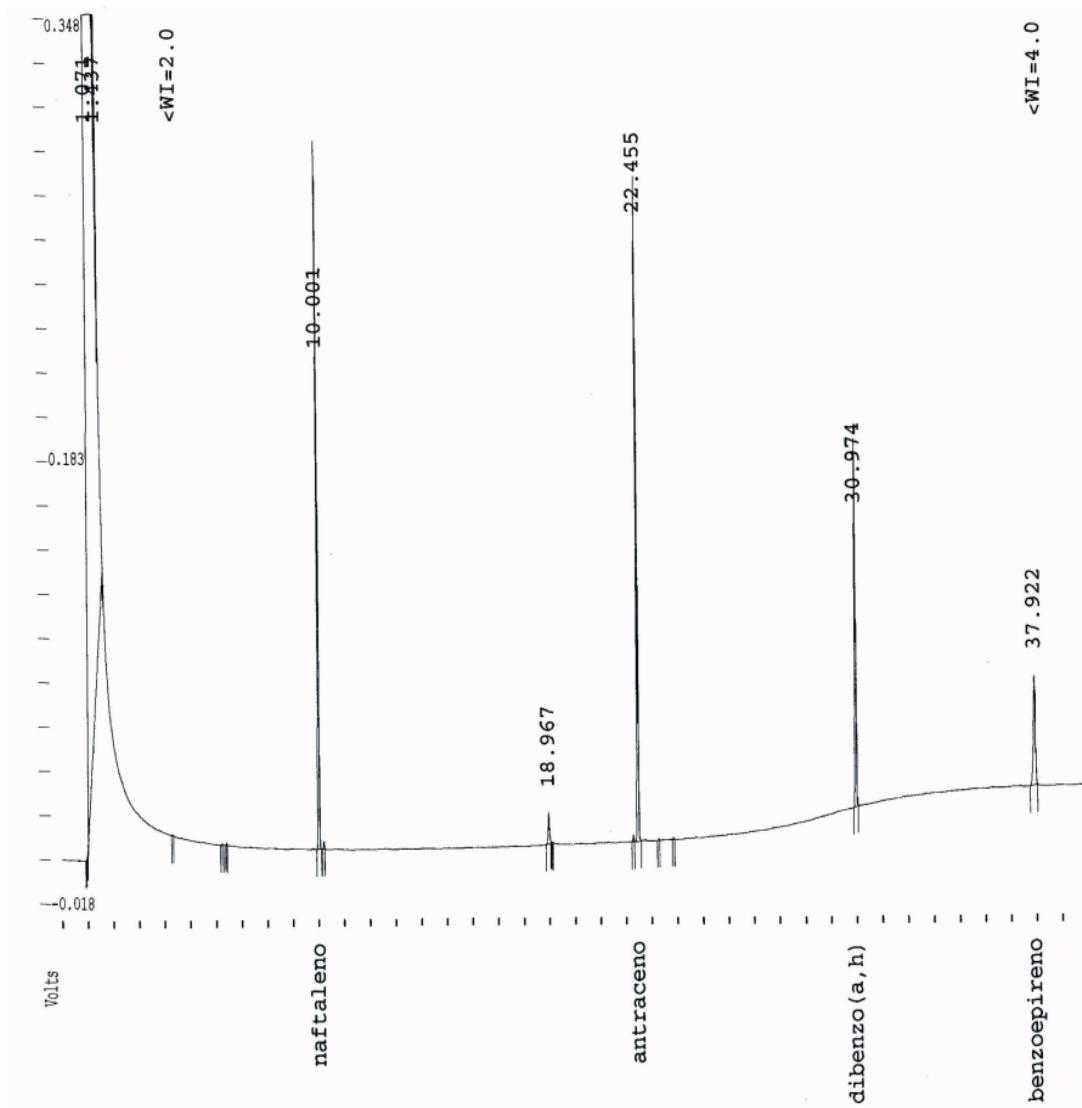


FIGURA 1- CROMATOGRAMA DA MISTURA A 10 ppm DOS PADRÕES DE NAFTALENO, ANTRACENO, DIBENZO[A,H]ANTRACENO E BENZO[E]PIRENO EM DICLOROMETANO

Dados disponíveis são inadequados para se estabelecer relação causal entre exposição ao naftaleno e câncer em humanos. No entanto, vários estudos foram realizados para avaliar o seu potencial genotóxico. O naftaleno foi mutagênico para a bactéria *Vibrio fischeri* (ARFSTEN DAVENPORT e SCHAEFFER, 1994) e *Drosophila melanogaster* (DELGADO-RODRIGUEZ *et al.*, 1999; DELGADO-RODRIGUEZ *et al.*, 1995).

Em cultura de embriões de camundongos, o naftaleno produziu 10 vezes mais aberrações cromossômicas quando comparado com o grupo controle. Por outro lado, o naftaleno não se mostrou mutagênico para bactérias *Salmonella typhimurium*, tanto na ausência como na presença de ativação metabólica (BOS *et al.*, 1988; MERSCH-SUDERMANN *et al.*, 1997), e também não induziu aumento no número de micronúcleos em células de medula óssea de camundongos após sua administração oral (HARPER, RAMANUJAM e GAD-EL-KARIM, 1984). Da mesma forma, o teste de micronúcleos em camundongos para o naftaleno sugere que esse não foi capaz de induzir aumento na frequência de micronúcleos nos reticulócitos de sangue periférico.

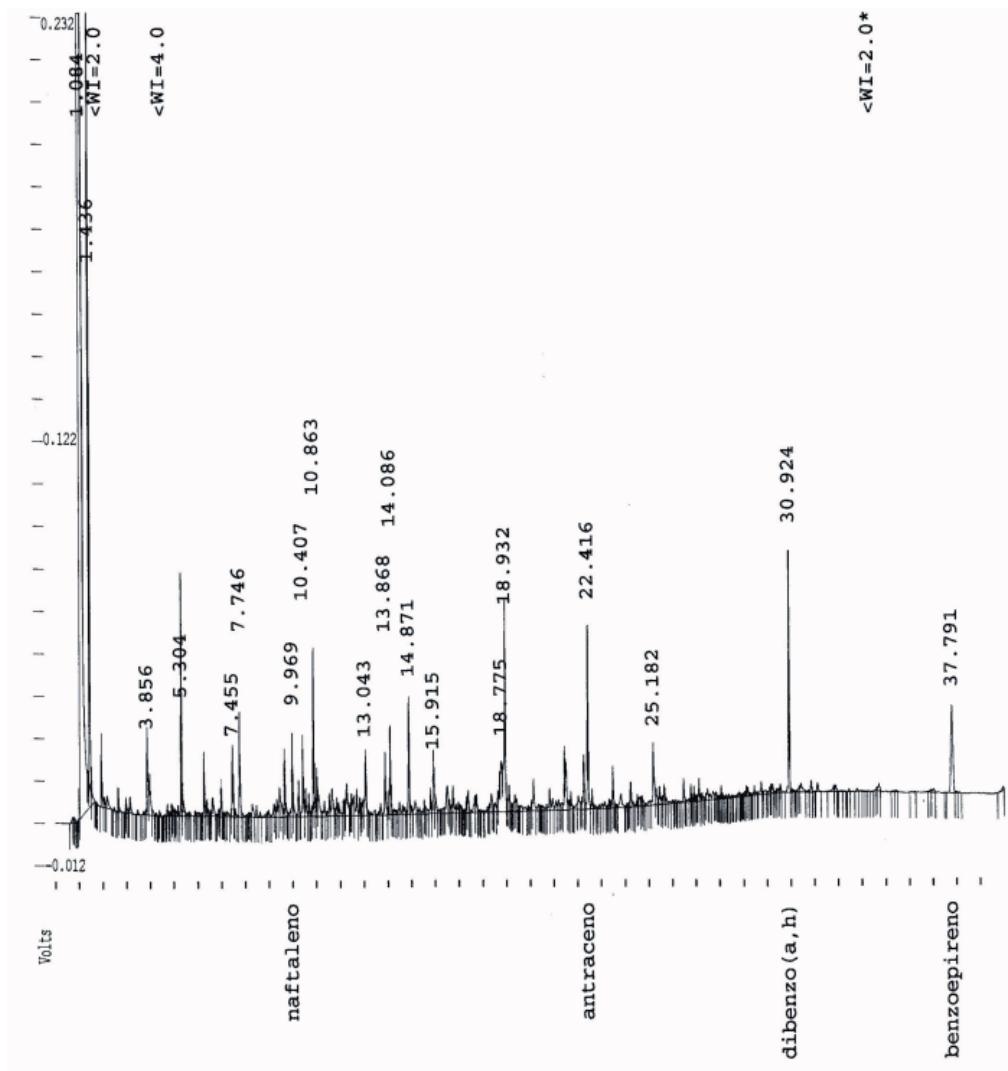


FIGURA 2- CROMATOGRAMA DO EXTRATO DA FULIGEM DA CANA-DE-AÇÚCAR COLETADA NA REGIÃO DE RIBEIRÃO PRETO (SP)

O dibenzo[a,h]antraceno mostrou-se carcinógeno quando administrado oralmente em camundongos (SNELL e STEWART, 1963), como também mediante injeções subcutâneas, induzindo tumores no local da aplicação em várias espécies de animais (LUBET, *et al.*, 1983). Numerosos estudos que demonstram carcinogenicidade do dibenzo[a,h]antraceno foram reunidos pela USEPA (1990). Dibenzo[a,h]antraceno produziu resultados positivos em testes que avaliaram danos no DNA e mutação em bactérias (HERMANN, 1981) e em células de mamíferos (MARTIN, McDERMID e GARNER, 1978). Na década de 60, alguns estudos relacionaram o dibenzo[a,h] antraceno com a indução de tumores no trato respiratório, no estômago e na pele de camundongos (SNEL e STEWART, 1963). Também foram obtidos resultados positivos na indução de micronúcleos em células da medula óssea e do fígado de ratos após instilação intratraqueal do dibenzo[a,h] antraceno na dose de 8,5 mg/Kg de peso corporal (ZHONG *et al.*, 1995). No presente estudo, obteve-se resultado significativamente positivo na indução de micronúcleos em reticulócitos do sangue periférico somente na dose de 34,0 mg/Kg de peso corporal. A diversidade de respostas observadas em vários estudos podem ser explicadas pela diferença na sensibilidade de células de diferentes tecidos e distintas rotas de administração utilizadas nesses estudos.

Em relação ao benzo[e]pireno, os resultados experimentais em animais e em humanos são

ainda inadequados para permitir avaliação precisa dos efeitos carcinogênicos e mutagênicos. Os resultados obtidos mostraram que o benzo[e]pireno induziu aumento na frequência de micronúcleos somente na dose de 34,0 mg/Kg de peso corporal 24 horas após a administração da substância. O tempo do pico de resposta para a formação de micronúcleos após o tratamento varia entre diferentes substâncias químicas, tanto que MacGregor, Heddle e Seiber (1987) recomendaram múltiplos tratamentos ou múltiplas amostragem para testes *in vivo*. Neste estudo foram utilizados dois tempos de amostragem (24 e 48 horas) já que o pico de resposta para a maioria das substâncias se encontra entre esses dois períodos (ENGELHARDT, 2006; SHI *et al.*, 1992). No caso do benzo[e]pireno, o pico de resposta provavelmente se encontra em torno de 24 horas, uma vez que não foi observado aumento significativo na frequência de micronúcleos 48 horas após a sua administração.

Embora, no teste de micronúcleo, possam ser analisadas células de diferentes órgãos, os eritrócitos da medula óssea e os reticulócitos do sangue periférico são mais frequentemente empregados como células-alvo (HAMADA *et al.*, 2003; HAYASHI *et al.*, 1992), permitindo avaliar danos citogenéticos cumulativos, já que essas células persistem na circulação (HAMADA *et al.*, 2001; ASANAMI *et al.*, 1995).

**TABELA 1 - FREQUÊNCIA DE MICRONÚCLEOS EM RETICULÓCITOS (MNRET)
DE SANGUE PERIFÉRICO DE CAMUNDONGOS TRATADOS COM DIMETILSULFÓXIDO
(DMSO), CICLOFOSFAMIDA (CPA), ANTRACENO (ANT), NAFTALENO (NAF),
DIBENZO[A,H]ANTRACENO (DBA) E BENZO[E]PIRENO (BEP) ATRAVÉS DE
ADMINISTRAÇÃO INTRAPERITONEAL**

GRUPOS	DOSE ^b (mg/Kg)	MNRET/1000 células (média ± SD)	
		24 horas	48 horas
DMSO ^a	-----	1.7 ± 0.58	2.3 ± 0.58
CPA	25.0	9.0 ± 1.00	12.7 ± 0.58
	8,5	1.7 ± 0.58	2.7 ± 0.58
ANT	17.0	3.3 ± 0.58	4.7 ± 0.58
	34.0	4.3 ± 0.58	6.3 ± 2.52
NAF	8,5	2.3 ± 0.58	3.0 ± 1.73
	17.0	3.3 ± 0.58	1.3 ± 1.16
DBA	34.0	2.0 ± 1.00	3.7 ± 0.58
	8,5	3.7 ± 0.58	2.7 ± 2.52
BEP	17.0	3.3 ± 1.53	5.7 ± 2.52
	34.0	9.7 ± 1.53*	11.7 ± 2.52*
	8,5	3.0 ± 1.00	5.0 ± 1.00
	17.0	5.3 ± 1.53	6.0 ± 1.73
	34.0	10.3 ± 2.08*	9.3 ± 2.52

^a DMSO, 3 mL/Kg.

^b 6000 RET foram contados em cada dose.

* P < 0.05, significativamente diferente do controle negativo (DMSO) e significativamente semelhante ao controle positivo (CPA).

4 CONCLUSÃO

Verificou-se a presença de antraceno, naftaleno, dibenzo[a,h]antraceno e benzo[e]pireno na fuligem da cana-de-açúcar. A análise do número de micronúcleos em células da medula óssea

mostrou que o benzo[e]pireno e o dibenzo[a,h]antraceno induziram aumento na frequência de micronúcleos, entretanto o antraceno e o naftaleno não apresentaram potencial genotóxico nas doses testadas.

É importante ressaltar que o aparecimento do câncer, na dose de 34,0 mg/Kg de peso corporal, envolve muitas outras etapas além das alterações cromossômicas, resultando na formação de adutos entre os HPA e o DNA, causando transformação e toxicidade celular. Todavia, a detecção da presença desses HPA na fuligem da cana-de-açúcar representa alerta para a população em geral que se encontra exposta a esses contaminantes.

ABSTRACT

DETERMINATION OF GENOTOXIC POTENTIAL *IN VIVO* OF BENZO[E]PYRENE, DIBENZ[A,H]ANTHRACENE, NAPHTHALENE AND ANTHRACENE PRESENT IN SOOT FROM BURNING SUGARCANE

This study aimed to detect the presence of anthracene, naphthalene, benzo[e]pyrene and dibenzo[a,h]anthracene in soot of sugarcane and evaluate the toxicity *in vivo* through average frequency of chromosomal abnormalities. Gas chromatography analysis of the soot revealed the presence of the polycyclic aromatics hydrocarbons (PAH) studied. The micronucleus test performed in bone marrow cells of mice showed that benzo[a]pyrene and dibenzo[a,h]anthracene had an increased frequency of micronuclei on the tested doses. However anthracene and naphthalene presented no genotoxic potential. Data suggest that the potential risk offered by the soot to sugar cane cutters and the general population living in the sugarcane areas, should be observed.

KEY-WORDS: POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS; CHROMOSOME MUTATIONS; MICRONUCLEUS TEST.

REFERÊNCIAS

- 1 ANDRAE, M. O. Atmospheric aerosols versus greenhouse gases in the twenty-first century. **Philos Transact A Math Phys. Eng. Sci.**, v. 365, p. 1915-1923, 2007.
- 2 ANGERER, J.; MANSCHRECK, C.; GUNDEL, J. Biological monitoring and biochemical effect monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, v. 70, p. 365-377, 1997.
- 3 ARFSTEN, D. P.; DAVENPORT, R.; SCHAEFFER, D. J. Reversion of bioluminescent bacteria (Mutatox) to their luminescent state upon exposure to organic compounds, munitions, and metal salts. **Biomed Environ Sci**, v. 7, p. 144-149, 1994.
- 4 ASANAMI, S.; SHIMONO, K.; SAWAMOTO, O.; KURISU, K.; UEJIMA, M. The suitability of rat peripheral blood in subchronic studies for the micronucleus assay. **Mutat. Res.**, v. 347, p. 73-78, 1995.
- 5 BALANSKY, R.; D'AGOSTINI, F.; GANCHEV, G.; IZZOTTI, A.; DI MARCO, B.; LUBET, R. A.; ZANESI, N.; CROCE, C.M.; DE FLORA, S. Influence of FHIT on benzo[a]pyrene-induced tumors and alopecia in mice: chemoprevention by budesonide and N-acetylcysteine. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 103, p. 7823-7828, 2006.
- 6 BOS, R.P.; THEUWS, J.L.; JONGENEELLEN, F.J.; HENDERSON, P.T. Mutagenicity of bi-, tri- and tetra-cyclic aromatic hydrocarbons in the "taped-plate assay" and in the conventional salmonella mutagenicity assay. **Mutat. Res.**, v. 204, p. 203-206, 1988.
- 7 BOUCHEZ, M.; BLANCHET, D.; BARDIN, V.; HAESELER, F.; VANDECASTEELE, J. P. Efficiency of defined strains and of soil consortia in the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) mixtures. **Biodegradation**, v.10, p. 429-435, 1999.
- 8 COBEA. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Princípios éticos na experimentação animal**. São Paulo, 1991.
- 9 DAI, Q.; RAN, C.; HARVEY, R. G. Synthesis of adducts of o-quinone metabolites of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons with 2'-deoxyribonucleosides. **Org. Lett.**, v. 7, p. 999-1002, 2005.
- 10 DAISY, B. H.; STROBEL, G. A.; CASTILLO, U.; EZRA, D.; SEARS, J.; WEAVER, D. K.; RUNYON, J. B. Naphthalene, an insect repellent, is produced by *Muscodor vitigenus*, a novel endophytic fungus. **Microbiology**, v. 148, p. 3737-3741, 2002.
- 11 DE FLORA, S.; ZANACCHI, P.; CAMOIRANO, A.; BENNICELLI, C.; BADOLATI, G. S. Enotoxic activity and potency of 135 compounds in the Ames reversion test and in a bacterial DNA-repair test. **Mutat. Res.**, v. 133, p. 161-168, 1984.

- 12 DELGADO-RODRIGUEZ, A.; ORTIZ-MARTTELO, R.; GRAF, U.; VILLALOBOS-PIETRINI, R.; GOMEZ-ARROYO, S. Genotoxic activity of environmentally important polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro derivatives in the wing spot test of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res.*, v. 341, p. 235-247, 1995.
- 13 DELGADO-RODRIGUEZ, A.; ORTIZ-MARTTELO, R.; VILLALOBOS-PIETRINI, R.; GOMEZ-ARROYO, S.; GRAF, U. Genotoxicity of organic extracts of airborne particles in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere*, v. 39, p. 33-43, 1999.
- 14 ENGELHARDT, G. *In vivo* micronucleus test in mice with 1-phenylethanol. *Arch. Toxicol.*, v. 80, p. 868-872, 2006.
- 15 GRIMMER, G.; JACOB, J.; DETTBARN, G.; NAUJACK, K. W. Determination of urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) for the risk assessment of PAH-exposed workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, v. 69, p. 231-239, 1997.
- 16 GUTTENPLAN, J. B.; CHEN, M.; KOSINSKA, W.; THOMPSON, S.; ZHAO, Z.; COHEN, L. A. Effects of a lycopene-rich diet on spontaneous and benzo[a]pyrene-induced mutagenesis in prostate, colon and lungs of the lacZ mouse. *Cancer Lett.*, v. 164, p. 1-6, 2001.
- 17 HAMADA, S.; NAKAJIMA, K.; SERIKAWA, T.; HAYASHI, M. The effect of aging on the results of the rat micronucleus assay. *Mutagenesis*, v. 18, p. 273-275, 2003.
- 18 HAMADA, S.; SUTOU, S.; MORITA, T.; WAKATA, A.; ASANAMI, S.; HOSOYA, S.; OZAWA, S.; KONDO, K.; NAKAJIMA, M.; SHIMADA, H.; OSAWA, K.; KONDO, Y.; ASANO, N.; SATO, S.; TAMURA, H.; YAJIMA, N.; MARSHALL, R.; MOORE, C.; BLAKELY, D. H.; SCHECHTMAN, L. M.; WEAVER, J. L.; TOROUS, D. K.; PROUDLOCK, R.; ITO, S.; NAMIKI, C.; HAYASHI, M. Evaluation of the rodent micronucleus assay by a 28-day treatment protocol: summary of the 13th collaborative study by the Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT)/Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 37, p. 93-110, 2001.
- 19 HARPER, B. L.; RAMANUJAM, V. M. S.; GAD-EL-KARIM, M. M. The influence of simple aromatics on benzene clastogenicity. *Mutat. Res.*, v. 128, p. 105-114, 1984.
- 20 HARVEY, R. G.; DAI, Q.; RAN, C.; PENNING, T. M. Synthesis of the o-quinones and other oxidized metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons implicated in carcinogenesis. *J. Org. Chem.*, v. 69, p. 2024-2032, 2004.
- 21 HARVEY, R. G. **Polycyclic aromatic hydrocarbons**: chemistry and carcinogenesis. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. v.3.
- 22 HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, J. R. M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine Orange-coated slides. *Mutat. Res.*, v. 245, p. 245-249, 1990.
- 23 HECHT, S. S. Tobacco smoke carcinogens and breast cancer. *Environ. Mol. Mutagen.*, v. 39, p. 119-126, 2002.
- 24 HERMANN, M. Synergistic effects of individual polycyclic aromatic hydrocarbons on the mutagenicity of their mixtures. *Mutat. Res.*, v. 90, p. 399-409, 1981.
- 25 JONGENEELLEN, F.J. Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ann. Occup. Hyg.*, v. 45, p. 3-13, 2001.
- 26 KALAITZOGLOU, M.; TERZI, E.; SAMARA, C. Patterns and sources of particle-phase aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in urban and rural sites of western Greece. *Atmos. Environ.*, v. 38, p. 2545-2560, 2004.
- 27 KHALILI, H.; ZHANG, F. J.; HARVEY, R. G.; DIPPLE, A. Mutagenicity of benzo[a]pyrene-deoxyadenosine adducts in a sequence context derived from the p53 gene. *Mutat. Res.*, v. 465, p. 39-44, 2000.
- 28 KOSINSKA, W.; PRESSENTIN, M. D.; GUTTENPLAN, J. B. Mutagenesis induced by benzo[a]pyrene in lacZ mouse mammary and oral tissues: comparisons with mutagenesis in other organs and relationships to previous carcinogenicity assays. *Carcinogenesis*, v. 20, p. 1103-1106, 1999.
- 29 LEE, M. L.; NOVOTNY, M.; BARTLE, K. D. Gas chromatography/mass spectrometric and nuclear magnetic resonance determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in airborne particulates. *Anal. Chem.*, v. 48, p. 1566-1572, 1976.
- 30 LEE, M. L.; WRIGHT, B. W. Capillary column gas chromatography of polycyclic aromatic compounds: a review. *J. Chromatogr. Sci.*, v. 18, p. 345-358, 1980.
- 31 LIU, A. L.; LU, W. Q.; WANG, Z. Z.; CHEN, W. H.; LU, W. H.; YUAN, J.; NAN, P. H.; SUN, J. Y.; ZOU, Y. L.; ZHOU, L. H.; ZHANG, C.; WU, T. C. Elevated levels of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, lymphocytic micronuclei, and serum glutathione S-transferase in workers exposed to coke oven emissions. *Environ. Health Perspect.*, v. 114, p. 673-677, 2006.
- 32 LOPEZ, W. A.; DE ANDRADE, J. B. Fontes, formação e quantificação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) na atmosfera. *Química Nova*, v. 19, p. 497-516, 1996.

- 33 LUBET, R. A.; KISS, E.; GALLAGHER, M. M.; DIVELY, C.; KOURI, R. E.; SCHECHTMAN, L. M. Induction of neoplastic transformation and DNA single-strand breaks in C3H/10T1/2 clone 8 cells by polycyclic hydrocarbons and alkylating agents. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 71, p. 991-997, 1983.
- 34 MCCARROLL, N. E.; PIPER, C. E.; KEECH, B. H. An *E. coli* microsuspension assay for the detection of DNA damage induced by direct-acting agents and promutagens. *Environ. Mutagen.*, v. 3, p. 429-444, 1981.
- 35 MACGREGOR, J. T.; HEDDLE, J. A.; HITE, M. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Research*, v. 189, p. 103-112, 1987.
- 36 MAGALHAES, Dulce; BRUNS, Roy E.; VASCONCELLOS, Pérola de Castro. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos como traçadores da queima de cana-de-açúcar: uma abordagem estatística. *Quím. Nova* [online], v.30, n.3, p. 577-581, 2007.
- 37 MARTIN, C. N.; MCDERMID, A. C.; GARNER, R. C. Testing of known carcinogens and noncarcinogens for their ability to induce unscheduled DNA synthesis in HeLa cells. *Cancer Res.*, v. 38, p. 2621-2627, 1978.
- 38 MAST, T. J.; HSIEH, D. P. H.; SEIBER, J. N. Mutagenicity and chemical characterization of organic constituents in rice straw smoke particulate matter. *Environ. Sci. Technol.*, v. 18, p. 338-348, 1984.
- 39 MAVOURNIN, K. H.; BLAKELY, D. H.; CIMINO, M. C.; SALAMONE, M. F.; HEDDLE, J. A. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat. Res.*, v. 239, p. 29-80, 1990.
- 40 MERSCH-SUNDERMANN, V.; MOCHAYEDI, S.; KEVEKORDES, S.; KERN, S.; WINTERMANN, F. The genotoxicity of unsubstituted and nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons polymorphisms are not associated with susceptibility to squamous-cell carcinoma of the esophagus. *Int. J. Cancer*, v. 71, p. 192-195, 1997.
- 41 MIELZYNsKA, D.; SIWINSKA, E.; KAPKA, L.; SZYFTER, K.; KNUDSEN, L. E.; MERLO, D. F. The influence of environmental exposure to complex mixtures including PAHs and lead on genotoxic effects in children living in Upper Silesia, Poland. *Mutagenesis*, v. 21, p. 295-304, 2006.
- 42 MORITA, S.; YANO, M.; SHIOZAKI, H.; TSUJINAKA, T.; EBISUI, C.; MORIMOTO, T.; KISHIBUTI, M.; FUJITA, J.; OGAWA, A.; TANIGUCHI, M.; INOUE, M.; TAMURA, S.; YAMAZAKI, K.; KIKKAWA, N.; MIZUNOYA, S.; MONDEN, M. CYP1A1, CYP2E1 and GSTM1 polymorphisms are not associated with susceptibility to squamous-cell carcinoma of the esophagus. *Int. J. Cancer*, v. 71, p. 192-195, 1997.
- 43 NETTO, A. D. P.; MOREIRA, J. C.; DIAS, A. E. X. O. D.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L. F. V.; OLIVEIRA, A. S.; BAREK, J. Evaluation of human contamination with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their nitrated derivatives (NHPAs): a review of methodology. *Química Nova*, v. 23, p. 765-773, 2000.
- 44 O'NEILL, I. K.; FISHBEIN, L. An IARC manual series aimed at assisting cancer epidemiology and prevention. Environmental carcinogens: selected methods of analysis. *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, v. 26, p. 229-240, 1986.
- 45 PERERA, F. P. Environment and cancer: who are susceptible? *Science*, v. 278, p. 1068-1073, 1997.
- 46 ROSENKRANZ, H. S.; POIRIER, L. A. Evaluation of the mutagenicity and DNA-modifying activity of carcinogens and noncarcinogens in microbial systems. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 62, p. 873-892, 1979.
- 47 SABBIONI, G.; JONES, C.R.; SEPPI, O.; HIRVONEN, A.; NORPPA, H.; JARVENTAUS, H.; GLATT, H.; POMPLUN, D.; YAN, H.; BROOKS, L. R.; WARREN, S. H.; DEMARINI, D. M.; LIU Y.Y. Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility in workers exposed to nitrotoluenes. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, v. 15, p. 559-566, 2006.
- 48 SANTOS, C. Y. M.; AZEVEDO, D. A.; AQUINO-NETO, F. R. A. Selected organic compounds from biomass burning found in the atmospheric particulate matter over sugarcane plantation areas. *Atmos. Environ.*, v. 26, p. 3009-19, 2002.
- 49 SARTO, F.; FINOTTO, S.; GIACOMELLI, L.; MAZZOTTI, D.; TOMANIN, R.; LEVIS, A. G. The micronucleus assay in exfoliated cells of the human buccal mucosa. *Mutagenesis*, v. 2, p. 11-17, 1987.
- 50 SASAKI, Y. F.; SEKIHASHI, K.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; SAGA, A.; ISHIDA, K.; TSUDA, S. The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database. *Crit. Rev. Toxicol.*, v. 30, p. 629-799, 2000.
- 51 SHI, L.; GAST, R. T.; GOPALRAJ, M.; OLSZEWSKI, N. E. Characterization of a shoot-specific, GA3- and ABA-regulated gene from tomato. *Plant. J.*, v. 2, p. 153-159, 1992.
- 52 SHIMADA, T. Xenobiotic-metabolizing enzymes involved in activation and detoxification of carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Drug. Metab. Pharmacokinet.*, v. 21, p. 257-276, 2006.
- 53 SIMMON, V. F. *In vitro* assays for recombinogenic activity of chemical carcinogens and related compounds with *Saccharomyces cerevisiae* D3. *J. Natl. Cancer Inst.*, v. 62, p. 901-909, 1979.

- 54 SNELL, K. C.; STEWART, H. L. Induction of pulmonary adenomatose in DBA/2 mice by the oral administration of dibenz[a,h]anthracene. **Acta Unio Int. Contra Cancrum**, v. 19, p. 692-694, 1963.
- 55 STATSOFT INC. **Statistica for Windows**. Version 6.0. Tulsa, OK, 1998.
- 56 TAKAHASHI, G.; KINOSHITA, K.; HASHIMOTO, K.; YASUHIRA, K. Identification of benzo(a)pyrene metabolites by gas chromatograph-mass spectrometer. **Cancer Res.**, v. 39, p. 1814-1818, 1979.
- 57 TOKIWA, H.; SERA, N.; NAKASHIMA, A.; NAKASHIMA, K.; NAKANISHI, Y.; SHIGEMATU, N. Mutagenic and carcinogenic significance and the possible induction of lung cancer by nitro aromatic hydrocarbons in particulate pollutants. **Environ Health Perspect.**, v. 4, p. 107-110, 1994.
- 58 TONG, C.; BRAT, S. V.; WILLIAMS, G. M. Sister-chromatid exchange induction by polycyclic aromatic hydrocarbons in an intact cell system of adult rat-liver epithelial cells. **Mutat. Res.**, v. 91, p. 467-473, 1981.
- 59 USEPA. United States Environmental Protection Agency. **Drinking water criteria document for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)**. Washington, DC, 1990.
- 60 VASCONCELOS, P. C.; VASCONCELOS, P.; ARTAXO, P.; CICCIOLI, P.; CECINATO, A.; BRACALEONI, E.; FRATTINI, M. Determinação dos hidrocarbonetos saturados e policíclicos aromáticos na atmosfera Amazônica. **Química Nova**, v. 21, p. 385-393, 1998.
- 61 WATERS, M. D.; STACK, H. F.; JACKSON, M. A. Genetic toxicology data in the evaluation of potential human environmental carcinogens. **Mutat. Res.**, v. 437, p. 21-49, 1999.
- 62 WILD, S. R.; JONES, K.C. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. **Environ. Pollut.**, v. 88, p. 91-108, 1995.
- 63 ZHONG, B. Z.; GU, Z. W.; STEWART, J.; ONG, T. Micronucleus formation induced by three polycyclic aromatic hydrocarbons in rat bone marrow and spleen erythrocytes following intratracheal instillation. **Mutat. Res.**, v. 326, p. 147-153, 1995.