

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Farmácia
Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

Genotoxicidade *in vitro* das frações orgânica e solúvel em água de material particulado de ar em três locais do Estado de São Paulo

Isabel Cristina Palacio Betancur

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros

Co-orientador: Dra. Deborah Arnsdorff Roubicek

São Paulo

2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-graduação em Farmácia
Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

Genotoxicidade *in vitro* das frações orgânica e solúvel em água de material particulado de ar em três locais do Estado de São Paulo

Isabel Cristina Palacio Betancur

Versão Original

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros

Co-orientador: Dra. Deborah Arnsdorff Roubicek

São Paulo

2016

Isabel Cristina Palacio Betancur

Genotoxicidade *in vitro* das frações orgânica e solúvel em água de material particulado de ar em três locais do Estado de São Paulo

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dr.
Orientador/presidente

1o. examinador

2o. examinador

3o. examinador

4o. examinador

São Paulo, _____ de _____ de 2016.

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Palacio Betancur, Isabel Cristina

P153g Genotoxicidade *in vitro* das frações orgânica e solúvel em
água de material particulado de ar em três locais do Estado de
São Paulo / Isabel Cristina Palacio Betancur. -- São Paulo, 2016.
132p.

Tese (doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Barros, Silvia Berlanga de Moraes

Co-orientador: Roubicek, Deborah Arnsdorff

1. Poluição ambiental : Toxicologia I. T. II. Moraes, Silvia
Berlanga de, orientador. III. Roubicek, Deborah Arnsdorff, co-
orientador

615.9 CDD

RESUMO

PALACIO, I. C. **Genotoxicidade *in vitro* das frações orgânica e solúvel em água de material particulado de ar em três locais do Estado de São Paulo.** 2016. 132 f. Tese (Doutorado) -Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

O aumento na poluição ambiental é na atualidade uma das grandes preocupações em nível mundial. Especificamente, a poluição atmosférica por material particulado tem demonstrado ser um fator determinante no desenvolvimento de doenças cardiopulmonares e câncer de pulmão nas populações expostas. O material particulado é constituído por uma mistura complexa de compostos orgânicos e inorgânicos, muitos dos quais possuem potencial mutagênico e genotóxico. As características destes compostos variam em função da suas propriedades físicas, químicas e em razão das condições meteorológicas prevalecentes. A maior parte dos estudos tem se focado em avaliar o potencial genotóxico da fração orgânica do material particulado e poucos estudos têm explorado a fração solúvel em água e a contribuição diferencial das diversas espécies químicas presentes nesta fração para o dano genotóxico. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos mutagênicos e genotóxicos *in vitro* da fração orgânica e da fração solúvel em água de material particulado (MP_{10}) coletado em três locais diferentes do estado de São Paulo e estabelecer a relação entre a composição química e o efeito biológico observado. Para isto, realizou-se a extração orgânica e solúvel em água de 12 amostras de MP_{10} . A mutagenicidade e genotoxicidade foram avaliadas usando o ensaio de *Salmonella/microssoma* e o teste de micronúcleos (MN) em células A549 e 16 hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) e 15 metais hidrossolúveis presentes nas amostras foram determinados quimicamente. Adicionalmente, foi determinada a metodologia de extração da fração solúvel em água e se avaliou a estabilidade química e biológica desta fração. Os resultados indicam que a extração assistida por micro-ondas é um método eficiente para a extração da fração solúvel em água do MP e que um tempo superior a 60 dias de armazenamento e congelamento deste tipo de extrato tem um efeito significativo sobre os resultados analíticos e a resposta biológica. Foi demonstrado ainda que as duas frações de MP estudadas são responsáveis pela indução do dano ao DNA e que não existe uma relação direta entre a concentração de MP e o efeito genotóxico observado, confirmando a importância do uso de bioensaios na avaliação da genotoxicidade de misturas complexas como o MP. Os HPAs prevalecentes nas amostras de PM_{10} foram fluorantene e benzo(ghi)períleno. Nos extratos solúveis em água, as maiores concentrações de metais foram determinadas para zinco, ferro e cobre. Confirmou-se que a indução de MN e o ensaio de *Salmonella/microssoma* representam uma poderosa ferramenta na avaliação da poluição atmosférica e que as análises químicas por si só não são suficientes para a proteção e predição dos efeitos biológicos em populações expostas.

Palavras chaves: MP_{10} , genotoxicidade, micronucleos, *Salmonella/microssoma*, HAPs, metais hidrossolúveis.

ABSTRACT

PALACIO, I. C. **Genotoxicity *in vitro* of organic and soluble water fractions of airborne particulate matter in three sites of São Paulo State.** 2016. 132 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The increase of environmental pollution is today one a major concern worldwide. Specifically, air pollution by particulate matter has been shown to be a determining factor in the development of cardiopulmonary disease and lung cancer in exposed populations. The particulate material consists of a complex mixture of organic and inorganic compounds, many of which have mutagenic and genotoxic activity. The characteristics of these compounds vary according to their physical and chemical properties and also to the prevailing weather conditions. Most studies have focused on evaluating the genotoxic potential of the organic fraction of particulate material, but few studies have explored the water-soluble fraction, and the differential contributions of different chemical species present in this fraction to genotoxic damage. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* mutagenic and genotoxic effects of organic and water-soluble fractions of 12 samples of particulate matter (PM_{10}) collected at three different sites in the state of São Paulo and establish the relationship between the chemical composition and the biological effect observed. The mutagenicity and genotoxicity were evaluated using the *Salmonella/microsome* test and the micronucleus assay (MN) in A549 cells and 16 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and 15 water-soluble metals present in the samples were chemically determined. Additionally, the extraction method of water-soluble fraction was determined and the chemical and biological stability of this fraction evaluated. The results indicate that the microwave-assisted extraction is an efficient method for the extraction of the water-soluble compounds of PM and that the freezing and storage of the extract over 60 days has a significant effect on the mutagenic and analytical results of PM samples. It was demonstrated that the two PM fractions studied are responsible for the induction of DNA damage and that there is no direct relationship between the MP concentration and the genotoxic effect observed, confirming the importance of using bioassays in the genotoxicity evaluation of complex mixtures as PM. The PAHs prevailing in our samples were fluoranthene and benzo(ghi)perylene. In the water-soluble extracts, highest concentrations of the elements studied were found for zinc, iron, and copper in the three places of sampling. We confirmed that MN induction and *Salmonella/microsome* assay represents a powerful tool to evaluate the atmospheric air pollution and that the total concentration of PM and the chemical analyses alone would not be sufficient for the prognosis of biological effects in exposed populations.

Keywords: PM_{10} , genotoxicity, *Salmonella/microsome*, PAHs, water-soluble metals.

Agradecimentos

Muitas foram as pessoas e instituições que eu encontrei no caminho e que de alguma ou outra forma contribuíram para a realização de esta tese e as quais eu gostaria de agradecer.

Agradeço imensamente a minha orientadora a Professora Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros por ter confiado em mim e no meu projeto, sempre desposta a me ajudar. Professora Silvia, foi um privilégio contar com você, obrigada por todas as oportunidades que me brindou e que me permitiram crescer como pessoa e professional. Por sempre minha admiração e respeito.

A minha co-orientadora Dra. Deborah Roubicek, Gerente Setor Toxicologia e Genotoxicidade da CETESB. Debby, a você dedico esta tese de doutorado, sem você não teria sido possível cumprir este sonho. Além de seu conhecimento, você me brindou a sua amizade e apoio incondicional e me deu o incentivo e tranquilidade que precisava em alguns dos momentos mais difíceis de este processo. As palavras não conseguem expressar todo o carinho e respeito que eu tenho por você. Você estará por sempre no meu coração.

Agradeço a CAPES–Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo apoio econômico e a oportunidade para realizar meu doutorado.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP e ao Programa de pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas pelo processo de formação do qual foi parte. Aos coordenadores do Programa, Prof. Dra. Sandra Polisselli Farsky e Prof. Dr. Ernani Pinto Junior, e a secretaria Samantha Carvalho pela disposição e colaboração com assuntos acadêmicos e burocráticos e pela grande ajuda na solução dos problemas que uma colombiana pode gerar.

Agradeço à Companhia Ambiental do estado de São Paulo (CETESB) pelo apoio técnico, humano e institucional prestado durante o meu trabalho. Ao Doutor Carlos Roberto Dos Santos, Diretor de Engenharia e Qualidade Ambiental e à Doutora Maria Inês Z. Sato

Gerente do Departamento de Analises Ambientais por permitir a realização da minha pesquisa dentro das instalações de CETESB.

Aos meus amigos do Setor de Toxicologia Humana e Saúde Ambiental (ELTT) da CETESB: Debby, Flavia, Cynthia, Celia, Celso, Rubia e Simone pelas contribuições feitas a este trabalho. Com vocês comparti momentos maravilhosos que sempre ficaram no meu coração. Obrigada por todo o carinho, paciência e ajuda que sempre recebi de todos vocês. Com vocês sempre me senti parte do time.

A Flavia Mazzini e Cynthia Soares, minhas confidentes e amigas incondicionais, com vocês comparti meus momentos felizes e tristes de estes últimos anos e aprendi que a vida está cheia de “muitas emoções”, que todo “faz parte do processo”, mas que o importante é que no final “todo dá certo” e “se não deu certo e porque ainda não é o final”.

Aos funcionários do Departamento de Analises Ambientais (CETESB) pelo carinho com que foi recebida e todos os bons momentos compartidos. Especialmente, gostaria de agradecer a Ivo Freitas de Oliveira (Setor de Analises Toxicológicas), pela ajuda e paciência no meu processo de aprendizagem dos protocolos de extração. A Robson Leocádio Franklin (Setor de Química Orgânica) e Carlos Alberto Marquez de Souza (Setor de Química Inorgânica) pelas análises químicas executadas e a boa disposição para responder a todas as minhas dúvidas. A Maria Cristina Coelho (Divisão de Microbiologia e Parasitologia) por ter me ensinado a usar o leitor de Elisa e estar sempre disposta a me ajudar.

Agradeço ao Setor de Amostragem e Análise do Ar (CETESB), especialmente a Maria Cristina N. de Oliveira e Cristiane F. Fernandes Lopez por ter me proporcionado os filtros de material particulado utilizados no trabalho.

Ao Antonio de Castro Bruni, pela grande ajuda nas análises estadísticas, especialmente na primeira parte do trabalho.

A Fernanda Sayuri, Giovana, Fernanda Arroyo, Aparecida, Halyne, Fernanda Venturin, Vanessa e Marcos, os estagiários que me acompanharam durante este processo. Obrigada por sua valiosa ajuda e tantos almoços compartidos.

Ao Brasil, este país extraordinário que me abreu suas portas e onde conheci pessoas especiais e lugares maravilhosos.

A minha família, que embora longe sempre esteve perto para me apoiar. Obrigada por todo o amor, vocês são parte fundamental do motor que movimenta a minha vida.

Ao Juan Camilo, pela felicidade de ter você na minha vida, o amor, a compreensão e tantas aventuras compartidas. Obrigada meu amor porque estando junto a você acredito que posso conseguir tudo o que me proponho.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1: Distribuição do MP nas vias aéreas com relação ao seu tamanho aerodinâmico.	2
Figura 2: Estrutura e nomenclatura dos 16 HPAs considerados como poluentes prioritários pela USEPA.	7
Figura 3: Esquema geral da ação mutagênica e carcinogênica dos HPAs.	10
Figura 4: Captação celular e distribuição intracelular dos compostos metálicos.	12
Figura 5: Esquema das reações de Fenton e Haber-Weiss a partir de íons de metais de transição como o Fe.	13
Figura 6: Número de amostras positivas e não detectáveis para mutagenicidade em cada método de extração - Ensaios preliminares (Etapa 1).	49
Figura 7: Tendência de decréscimo nas concentrações dos metais hidrossolúveis em função do tempo de congelamento após extração em micro-ondas.	58
Figura 8: Concentrações dos HPAs nos extratos orgânicos coletados nos Locais 1, 2 e 3 nas diferentes estações climáticas.	61
Figura 9: Abundância relativa dos HPAs nas amostras de MP ₁₀ nos três locais de coleta.	64
Figura 10: Resultados de BaP-TEQ e BaP-MEQ e concentração de HAP.	75
Figura 11: Concentrações dos metais hidrossolúveis por local e estação de amostragem.	78
Figura 12: Células A549 binucleadas sem micronúcleo (A, B) e células binucleadas com micronúcleo (C, D).	87
Figura 13: Resultados (porcentagem média) dos ensaios de viabilidade celular pelo método do MTT dos extratos orgânicos e solúveis em agua de MP ₁₀ .	89
Figura 14: Resultado da frequência de MN em células A549 tratadas com diferentes concentrações de extrato orgânico de MP ₁₀ em diferentes períodos de coleta e sua significância estatística comparado com o controle negativo	90
Figura 15: Resultado da frequência de MN em células A549 tratadas com diferentes concentrações de extrato orgânico de MP ₁₀ em diferentes períodos de coleta e sua significância estatística comparado com o controle negativo	91
Figura 16: Correlação entre a frequência de MN em células A549 e os compostos orgânicos e hidrossolúveis em: a. Local 1, b. Local 2 e c. Local 3	93
Figura 17: Correlação entre revertentes/m ³ e os compostos orgânicos e hidrossolúveis em: a. Local 1, b. Local 2 e c. Local 3.	101

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1: Algumas características físico-químicas das partículas atmosféricas em relação ao diâmetro da partícula.	5
Tabela 2: Características genéticas das linhagens de <i>S. Typhimurium</i> mais comumente utilizadas no teste de Ames.	17
Tabela 3: Estudos do potencial genotóxico do MP no Brasil através do teste de Ames e indução de Micronúcleos.	21
Tabela 4: Características das amostras de MP de ar utilizadas para a determinação da metodologia de extração de compostos hidrossolúveis.	28
Tabela 5: Período de coleta, massa, volume e concentração total de MP ₁₀ .	29
Tabela 6: Esquema do procedimento utilizado para a extração em banho de ultrassom.	30
Tabela 7: Procedimento para a verificação das características genéticas das linhagens TA98 e TA100 de <i>S. Typhimurium</i> .	33
Tabela 8: Limites de quantificação para os metais analisados nos extratos hidrossolúveis.	40
Tabela 9: Características dos HPAs determinados nas amostras de MP ₁₀ e seus limites de quantificação na metodologia utilizada para a análise.	42
Tabela 10: Concentração* dos metais (ng/m ³) determinados por ICP-OES nos extratos hidrossolúveis de TPS e MP ₁₀ extraídos com a metodologia assistida por micro-ondas e banho de ultrassom.	46
Tabela 11: Resultados do ensaio de <i>Salmonella</i> /microssoma dos extratos solúveis de MP das amostras preliminares.	48
Tabela 12: Resultados do teste de Wilcoxon da resposta mutagênica nas amostras preliminares.	50
Tabela 13: Valores em peso seco (mg/Kg) para os elementos extraídos pelo método assistido por micro-ondas e banho de ultrassom do material de referência NIST 1648a e a recuperação (%).	53
Tabela 14: Resultado do teste F-Fisher do ajuste do Modelo Linear Geral Univariado (MLGU) dos dados transformados.	54
Tabela 15: Coeficiente estimado para a interação elemento-método e sua significância.	55
Tabela 16: Concentração dos elementos hidrossolúveis (μg/L) de uma amostra de MP ₁₀ armazenada a -20°C por diferentes períodos de tempo.	57
Tabela 17: Anova do ajuste do Modelo Linear Geral Univariado para Medidas Repetidas (MLGUMR).	57

Tabela 18: Resultado do teste de Bonferroni para comparação de medias em função do tempo dos extratos hidrossolúveis.	57
Tabela 19: Atividade mutagênica ($\text{rev/g} \times 10^3$) do extrato hidrossolúvel armazenado a -20°C por diferentes períodos de tempo.	58
Tabela 20: Concentrações (ng/m^3) dos 16 HPAs quantificados nos extratos orgânicos coletados em três locais diferentes do Estado de São Paulo, Brasil.	62
Tabela 21: Resultado do teste de Kruskal-Wallis para comparação das concentrações de HPAs nas diferentes estações climáticas e locais de amostragem.	63
Tabela 22: Razões das concentrações dos HPAs relatadas na literatura para as diferentes fontes de emissão.	65
Tabela 23: Razões das concentrações de HPAs calculadas neste estudo para os três locais de amostragem.	66
Tabela 24: Resultados da Correlação de Spearman dos HPAs determinados* nas amostras de MP_{10} .	68
Tabela 25: Resultados comparativos das concentrações dos HPAs classificados pela IARC como possíveis carcinógenos para humanos.	69
Tabela 26: Peso de cada HPA nos dois primeiros componentes principais (CP) da PCA realizada com os HPAs determinados nas amostras de MP_{10} no L1, L2 e L3.	70
Tabela 27: Concentrações (ng/m^3) dos 16 HPAs (EPA), BaP e equivalente carcinogênico (TEQ) e mutagênico (MEQ) relatados na literatura para diferentes cidades do Brasil e o mundo.	72
Tabela 28: Resultados do BaP-TEQ dos extratos orgânicos de MP_{10} .	73
Tabela 29: Resultados do BaP-MEQ dos extratos orgânicos de MP_{10} .	73
Tabela 30: Concentração (ng/m^3) média dos metais hidrossolúveis determinados nas amostras de MP_{10} .	77
Tabela 31: Resultado do teste de Kruskal-Wallis para comparação das concentrações dos metais hidrossolúveis nas diferentes estações climáticas e locais de amostragem.	78
Tabela 32: Concentrações hidrossolúveis (ng/m^3) de metais relatados na literatura em áreas urbanas.	82
Tabela 33: Resultados da Correlação de Spearman dos metais hidrossolúveis nas amostras de MP_{10} .	84
Tabela 34: Peso de cada um dos metais nos três primeiros componentes principais (CP) da PCA realizada com os metais hidrossolúveis determinados nas amostras de MP_{10} no L1, L2 e L3.	85
Tabela 35: Frequência de micronúcleos (MN)/1000* células e índice de divisão nuclear (IDN) da fração orgânica de MP_{10} .	88

Tabela 36: Frequência de micronúcleos (MN)/1000* células A549 e índice de divisão nuclear (IDN) da fração solúvel em água de MP ₁₀ .	88
Tabela 37: Mutagenicidade da fração orgânica de MP ₁₀ expressa em revertentes por m ³ .	97
Tabela 38: Mutagenicidade da fração solúvel em água de MP ₁₀ expressa em revertentes por m ³ .	97
Tabela 39: Resultado da regressão linear entre as concentrações de MP ₁₀ , HPAs e metais hidrossolúveis com a resposta mutagênica.	98
Tabela 40: Resultado do teste de Dunnett para comparação das concentrações da resposta mutagênica nos diferentes locais de amostragem.	99

LISTA DE ABREVIATURAS/SIGLAS

16HPA	Os 16 HPAs determinados como prioritários pela USEPA
2AA	2-aminoantraceno
4NQO	4-nitroquinolina-1-óxido
8HPA	HPAs não voláteis de peso molecular ≥ 228
A549	Linhagem celular de adenocarcinoma humano de pulmão
Ace	Acenaftileno
Acp	Acenafteno
Al	Alumínio
ANOVA	Análise de variância
Ant	Antraceno
AP	Sítios apurínicos/apirimídicos do DNA
As	Arsênio
BaA	Benzo(a)antraceno
BaP	Benzo(a)pireno
BaP-MEF	Fator de equivalência mutagênica do benzo(a)pireno
BaP-MEQ	Concentrações mutagênicas equivalentes do benzo(a)pireno
BaP-TEF	Fatores de equivalência carcinogênica do benzo(a)pireno
BaP-TEQ	Concentrações carcinogênicas equivalentes do benzo(a)pireno
BbF	Benzo(b)fluoranteno
BghiP	Benzo(g,h,i)perileno
BkF	Benzo(K)fluoranteno
CBMN	Teste de micronúcleos com bloqueio da citocinese
Cd	Cádmio
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
Cito-B	Citocalasina B
Co	Cobalto
CO	Monóxido de carbono

CO₂	Dióxido de carbono
Cr	Cromo
Cry	Criseno
Cu	Cobre
CYP1A1	Citocromo P450, família 1, Subfamília A, Polipeptídio 1
CYP1B1	Citocromo P450, família 1, Subfamília B, Polipeptídio 1
DahA	Dibenzo(a,h)antraceno
DMEM	Meio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle's
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA/USEPA	Agência de Proteção Ambiental dos EUA – United States Environmental Protection Agency
ERO	Espécies reativas de oxigênio
Fe	Ferro
Flt	Fluoranteno
Flu	Fluoreno
H⁺	Hidrogênio
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
H₃BO₃	Ácido bórico
HF	Ácido fluorídrico
his⁻	Histidina
HNO₃	Nitrato de amônio
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de fluorescência
IARC	Agência Internacional de Pesquisa de Câncer – International Agency for Research on Cancer
ICP-MS	Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente
ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente
IDN	Índice de divisão nuclear
IP	Indeno (1,2,3-cd)pireno
MEF	Fator de equivalência mutagênico

Meⁿ⁺	Composto metálico solúvel
MEQ	Concentração mutagênica equivalente
Mg	Magnésio
Mn	Manganês
MN	Micronúcleos
MP	Material particulado
MP₁₀	Material particulado com diâmetro ≤ 10µm
MP_{2,5}	Material particulado com diâmetro ≤ 2,5µm
MTT	3- (4,5 dimethyltiazol-2-il)-2,5-difenil-2H tetrazolato de bromo
Naph	Naftaleno
NH₄⁺	Amônio
Ni	Níquel
NIST	National Institute of Standards and Technology
NO₃⁻	Nitrato
NO_x	Óxidos de nitrogênio
O₃	Ozônio
Pb	Chumbo
Phe	Fenanreno
PTS	Partículas Totais em Suspensão
Pyr	Pireno
RM	Razão de mutagenicidade
RMSP	Região Metropolitana de São Paulo
rpm	Revoluções por minuto
S9	Homogenado de fígado de ratos Sprague Dawley, induzido por aroclor 1254, liofilizado
Salanal	Salmonella Assay Analysis
Sb	Antimônio
Sc	Escândio
Se	Selênio
SO₂	Dióxido de enxofre

SO₄⁼	Sulfato
SO_x	Óxidos de enxofre
SRM 1648a	Material de referencia de MP urbano – Urban Particulate Matter
TEF	Fator de equivalência carcinogênico
TEQ	Concentração carcinogênica equivalente
Ti	Titânio
V	Vanádio
WHO	World Health Organization – Organização mundial da saúde
Zn	Zinco

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3. MATERIAIS E MÉTODOS	27
 3.1 AMOSTRAS DE MATERIAL PARTICULADO DE AR	27
3.1.1 Amostragem	27
3.1.2 Amostras para determinação da metodologia de extração de amostras hidrossolúveis (Etapa 1)	28
3.1.3 Amostras de MP ₁₀ para avaliação de mutagenicidade (Etapa 2)	28
 3.2 EXTRAÇÃO DE MATERIAL PARTICULADO DE AR	29
3.2.1 Determinação da metodologia de extração de compostos hidrossolúveis (Etapa 1)	29
3.2.1.1 Extração assistida por micro-ondas	29
3.2.1.2 Extração em banho de ultrassom	29
3.2.2 Extração de MP ₁₀ para avaliação da mutagenicidade (Etapa 2)	30
3.2.2.1 Extração da fração solúvel em água de MP ₁₀	31
3.2.2.2 Extração da fração orgânica de MP ₁₀	31
 3.3 ANÁLISES BIOLÓGICAS	31
3.3.1 Ensaio de <i>Salmonella</i> /microssoma - Teste de Ames	32
3.3.1.1 Linhagens de <i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium	32
3.3.1.2 Teste de <i>Salmonella</i> /Microssoma - Método direto	34

3.3.1.3 Teste de <i>Salmonella</i> /Microssoma - método em microssuspensão	35
3.3.1.4 Viabilidade das linhagens bacterianas	35
3.3.1.5 Interpretação e expressão dos resultados	36
3.3.2 Teste de Micronúcleos	36
3.3.2.1 Cultura celular	36
3.3.2.2 Avaliação da citotoxicidade - MTT	37
3.3.2.3 Teste de micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN)	38
3.3.2.4 Interpretação e expressão dos resultados	38
3.4 ANÁLISES QUÍMICAS	39
3.4.1 Compostos solúveis em água – Metais	39
3.4.2 Compostos orgânicos-HPA	41
3.4.2.1 Determinação dos Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HPAs) nas amostras de MP ₁₀	41
3.4.2.2 Concentrações equivalentes de BaP	42
3.5 ESTABILIDADE DA FRAÇÃO HIDROSSOLÚVEL DO MP	43
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1 DETERMINAÇÃO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM ÁGUA DO MATERIAL PARTICULADO (Etapa 1)	45
4.1.1 Validação do método de extração da fração solúvel em água.	45
4.1.2 Estabilidade da fração hidrossolúvel do MP	56
4.2 ETAPA 2- AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS DE MATERIAL PARTICULADO DE AR COLETADAS EM TRÊS LOCAIS DO ESTADO DE SÃO PAULO	60
4.2.1 AMOSTRAS DE MP ₁₀	60
4.2.2 ANÁLISES QUÍMICAS	60

4.2.2.1 Compostos orgânicos – HPAs	60
4.2.2.2 Concentrações equivalentes de BaP	71
4.2.2.3 Compostos solúveis em água - Metais	76
4.2.3 ANÁLISES BIOLÓGICAS	87
4.2.3.1 Teste de micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN)	87
4.2.3.2 Ensaio de <i>Salmonella</i> /microssoma - Teste de Ames	96
5. CONCLUSÕES	105
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

1. INTRODUÇÃO

O aumento da poluição do ar é um dos principais problemas ambientais que o mundo enfrenta hoje. Estima-se que o material particulado (MP) é um dos contaminantes ambientais mais perigosos, devido à complexidade de sua composição química e aos tipos de interações entre as sustâncias (aditivas, sinérgicas e antagônicas) nos sistemas biológicos (Bonetta et al., 2009; Wickramasinghe et al., 2011).

O MP é uma mistura complexa, heterogênea, cuja composição (distribuição de tamanho de partícula, características químicas) muda no tempo e no espaço e depende das várias fontes de emissões, da química atmosférica e das condições meteorológicas (Kelly e Fussell, 2012). Verificou-se que os constituintes químicos do MP são muito diversos e incluem ácidos, tais como os nítrico e sulfúrico, compostos orgânicos como por exemplo, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), nitro-HPAs e quinonas, metais, partículas de poeira do solo e de origem geológica, e materiais de origem biológica, entre eles, endotoxinas, bactérias, vírus, detritos animais e vegetais e compostos voláteis biogênicos emitidos a partir de incêndios florestais (Alves et al., 2011).

Esta mescla complexa de contaminantes que podem ser de origem natural (vulcanismo, decomposição de matéria orgânica, incêndios florestais naturais) ou antropogênica (atividade industrial e agrícola, emissões veiculares ou queima de biomassa), tornou-se um dos maiores desafios para a saúde pública em muitas regiões urbanas no mundo (Srimuruganandam e Shiva Nagendra, 2012). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2013), o MP é o responsável pela morte prematura de 3,1 milhões de pessoas em todo o mundo, especialmente nos países em desenvolvimento, onde os níveis de MP são muito mais altos que nos países desenvolvidos.

Estudos epidemiológicos relataram a associação entre a exposição das populações humanas a altos níveis de MP e o incremento na morbidade e mortalidade por doenças respiratórias e cardiovasculares (Anderson et al., 2012) e câncer de pulmão (Demetriou e Vineis, 2015). Está bem determinado que as partículas com maior impacto sobre a saúde humana são aquelas com um diâmetro menor que 10 μm (MP₁₀, partículas inaláveis). Estas partículas podem penetrar no trato respiratório e alcançar os alvéolos (Kim et al., 2015). Os efeitos da fração MP₁₀ do MP sobre a saúde estão bem documentados (Chen et al., 2013; Lewtas, 2007; Pope et al., 2011; Raaschou-Nielsen et al., 2013) e são o resultado tanto de exposições a curto prazo (horas, dias) como exposições crônicas (meses, anos) (WHO, 2013). Partículas com diâmetros entre 5 e 10 μm têm uma maior probabilidade de se depositarem na árvore traqueobrônquica, enquanto aquelas com diâmetro inferior a 2,5 μm (MP_{2,5}) se depositam nos bronquíolos respiratórios e nos alvéolos onde ocorrem as trocas gasosas. Estas partículas podem afetar as trocas gasosas nos pulmões e podem mesmo penetrar no tecido pulmonar. Ainda, estas partículas têm a capacidade escapar para a corrente sanguínea, podendo causar problemas significativos para a saúde humana (Kim et al., 2015) (Figura 1).

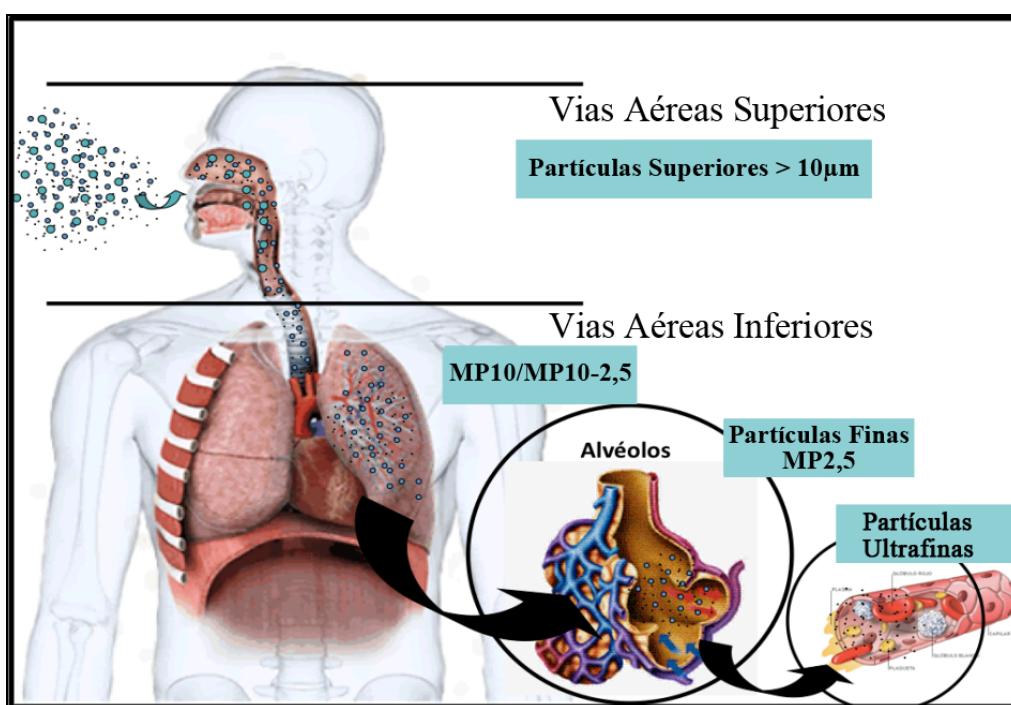


Figura 1: Distribuição do MP nas vias aéreas com relação ao seu tamanho aerodinâmico. Adaptado de Guarieiro e Guarieiro (2013).

Devido à heterogeneidade de composição do MP, a toxicidade e o potencial de causar dano à saúde têm sido associados com suas diferentes características. Alguns autores relatam que os riscos de exposição a este material dependem das suas propriedades físicas (tamanho, concentração, área de superfície), das propriedades químicas (acidez, polaridade), tanto dos componentes inorgânicos (sais e óxidos de metais), orgânicos (HPAs e seus derivados), e biológicos (alergênicos e endotoxinas), e da sua interação com outros contaminantes gasosos (O_3 , SO_x , NO_x , CO) (Dreher, 2000). Estes fatores influenciam na farmacocinética, na biodisponibilidade e na interação das substâncias com o alvo biológico (Karlsson et al., 2004).

Além do efeito negativo sobre a saúde humana, o material particulado diminui a intensidade da irradiação solar que chega até a superfície da terra, interferindo nos processos climáticos de forma direta e na regulação do ciclo hidrológico natural pela formação de núcleos de condensação das nuvens (Seinfeld e Pandis, 2006). Adicionalmente, as partículas podem ser transportadas por longas distâncias pelo vento e depositadas no solo ou água. Os efeitos dessa sedimentação incluem a acidificação de lagos e pequenos rios, alteração do equilíbrio de nutrientes nas águas costeiras e as grandes bacias hidrográficas, danificação de florestas sensíveis e culturas agrícolas e alterações da diversidade dos ecossistemas (USEPA, 2016).

O material particulado pode ser caracterizado por meio de diferentes parâmetros físicos e químicos tais como a concentração da massa, a composição, o tamanho da partícula e as fontes de emissão. O diâmetro aerodinâmico da partícula é uma característica importante na determinação da distribuição do MP, o que em grande parte regula o seu desempenho ambiental e determina os efeitos adversos para a saúde humana (Kelly e Fussell, 2012). O tamanho do MP pode ser relacionado com a sua fonte, devido aos processos físicos que formam as partículas e os processos atmosféricos que controlam o destino, a evolução e a distribuição do tamanho das partículas na atmosfera.

Partículas de maior diâmetro (partículas totais em suspensão - PTS e MP₁₀) são geradas principalmente por processos físicos como a ressuspensão do solo e poeira de estradas, lavrado agrícola, abrasão de veículos e emissão de poeira industrial (IARC, 2015), permanecem suspensas por um período relativamente curto de tempo (minutos a horas) e viajam distâncias curtas. As partículas finas ($\leq\text{MP}_{2,5}$) compreendem predominantemente a condensação de compostos inorgânicos e orgânicos secundários e são originadas a partir de fontes de combustão. Estas partículas têm tempos de residência mais longos na atmosfera, taxas de deposição mais baixas e podem ser transportadas por longas distâncias (Valavanidis et al., 2008). Porém, se houver alterações nos padrões de ocorrência de vento e na estabilidade atmosférica, as concentrações das diferentes fracções de MP podem variar muito de um dia para o outro ou mesmo de hora em hora (Johansson et al., 2007) (Tabela 1).

Alguns pesquisadores indicam que o tráfego veicular é um dos fatores que mais contribui com as concentrações do material particulado no ar (Kok et al., 2006). No entanto, o efeito desta e de outras fontes antropogênicas sobre os organismos expostos e sobre o ambiente varia muito com o tamanho da fração da partícula e com sua composição química, mas com as concentrações totais do material particulado (Coronas et al., 2009). Apesar da complexidade das suas características e o fato de que muitas dessas propriedades são independentes, os limites regulamentares para a qualidade do ar baseiam-se geralmente na concentração de MP de acordo com o tamanho aerodinâmico da partícula (Alves et al., 2014).

Tabela 1: Algumas características físico-químicas das partículas atmosféricas em relação ao diâmetro da partícula. Modificado de Gutiérrez-Castillo et al. (2006).

Característica	MP ₁₀ ($\leq 10 \mu\text{m}$)		
	MP _{2,5} ($\leq 2,5 \mu\text{m}$)	Ultrafinas MP _{0,1}	Finas MP _{0,1-2,5}
Tamanho	$\leq 0,1 \mu\text{m}$	$< 0,1 \leq 2,5 \mu\text{m}$	$< 2,5 \leq 10 \mu\text{m}$
Formação	Nucleação	Acumulação	Mecânica
Mecanismos	Condensação e coagulação de gases e vapores.	Condensação e coagulação, evaporação (água e gases que se dissolvem e reagem).	Fracionamento e ressuspensão de poeira. Evaporação de spray, geralmente marinho. Reações de gases com ou sobre partículas.
Composição	SO ₄ ⁼ , carvão elementar, compostos metálicos e orgânicos voláteis.	SO ₄ ⁼ , NO ₃ ⁻ , NH ₄ ⁺ , H ⁺ , carbono elementar, carvão orgânico e metais.	Solo e poeira suspensa, cinzas de carvão, sal marinho, óxidos de origem geológica, material biogênico e NO ₃ ⁻ .
Origem	Antropogênico – Processos de combustão a altas temperaturas e reações atmosféricas.	Basicamente origem natural e primária, erosão eólica, poeira industrial, de construção e demolição; material biogênico, incêndios florestais, erupções vulcânicas, spray oceânico.	
Primário	Subprodutos de combustão a altas temperaturas (Cinza produto de processos orgânicos e inorgânicos).		
Secundário	SO ₂ e alguns compostos orgânicos.	NO _x , SO ₂ e compostos orgânicos, incluindo material biogênico.	
Transformações atmosféricas			
Tempo de vida médio	De minutos a horas.	De dias a semanas.	De minutos a horas.
Distância percorrida	< 1 a 10 km	100 a 1000 km	< 1 a 10 km

Muitos compostos orgânicos e inorgânicos, identificadas como contaminantes perigosos pela sua capacidade mutagênica estão presentes no MP de ambientes urbanos. Foi relatado que o MP tem a capacidade de induzir lesões genéticas em bactérias, células de mamíferos e plantas (Alves et al., 2014; Coronas et al., 2009; Dubey et al., 2015; Senthilkumar et al., 2014), com efeitos que vão desde mutações de ponto até efeitos epigenéticos (Traversi et al., 2011). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o MP pode causar aberrações cromossômicas, troca de cromátides irmãs, micronúcleos, adutos de DNA, tumorigênese e toxicidade embrionária (Baja et al., 2010; Cheng et al., 2004; Lepers et al., 2014; Roubicek et al., 2007). A magnitude do efeito observado depende não

apenas do tamanho do MP (Valavanidis et al., 2008), mas também da composição química e gravimétrica (Danielsen et al., 2008; Dumax-Vorzet et al., 2015; Gaultieri et al., 2010).

A maior parte dos estudos sobre o potencial genotóxico do MP tem avaliado a fração orgânica extraível (Alves et al., 2016; Brito et al., 2013; Jung et al., 2012; Umbuzeiro et al., 2008a). Os compostos orgânicos associados com o MP incluem centenas de compostos, dentre os quais os HPAs têm sido os mais investigados em estudos exploratórios de atividade mutagênica e potencial carcinogênico do MP (Carreras et al., 2013). Alguns HPAs foram classificados pela Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (International Agency for Research on Cancer – IARC, 2010), como cancerígenos (Grupo 1), ou como prováveis (Grupo 2A) ou possíveis (Grupo 2B) cancerígenos para humanos e a Agência de Proteção Ambiental dos EUA (USEPA) listou 16 HPAs como poluentes prioritários para o controle e monitoramento ambiental devido às suas propriedades genotóxicas e cancerígenas (Keith, 2015) (Figura 2).

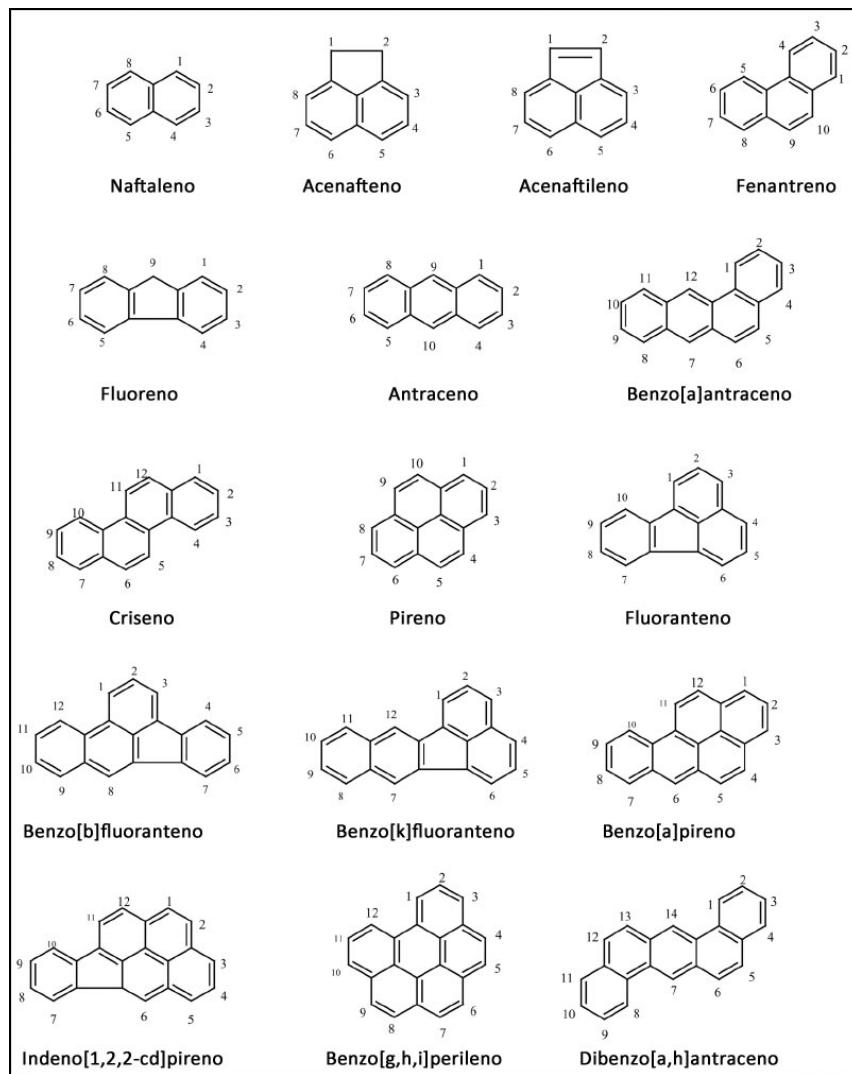


Figura 2: Estrutura e nomenclatura dos 16 HPAs considerados como poluentes prioritários pela USEPA. Adaptado de Yan et al. (2004).

Os HPAs são produtos de reações de combustão incompleta de materiais orgânicos como a queima de combustíveis fósseis (petróleo e produtos petrolíferos) e biomassa (incineração de resíduos) em usinas de energia e produzidos em emissões industriais (Hanedar et al., 2014). Em áreas urbanas e industriais, os HPAs são emitidos na sua maioria por fontes antrópicas, enquanto que a contribuição das fontes naturais (incêndios florestais, emissões vulcânicas, etc.) é muito limitada (Hong et al., 2007). Estes contaminantes têm elevada persistência no ambiente e baixa biodegradabilidade (Khairy e Lohmann, 2013; Khan et al., 2015). Sua natureza semi-volátil os torna altamente móveis através da atmosfera, com processos de deposição e ressuspensão que os distribuem

entre as diferentes matrizes ambientais (Castro et al., 2009). Os HPAs de baixo peso molecular (2-3 anéis) são encontrados predominantemente na fase de vapor, enquanto que aqueles com quatro ou mais anéis de benzeno aderem ao MP (Ravindra et al., 2006; Tavares et al., 2004), são altamente lipofílicos e representam maior preocupação ambiental por suas propriedades mutagênicas e carcinogênicas (Dallarosa et al., 2008; WHO, 2010).

Os HPAs reagem com vários compostos químicos da atmosfera, produzindo derivados que podem ser mais tóxicos do que o composto original (Larry D. Claxton, 2015; Franco et al., 2010). A presença de compostos mutagênicos em extratos orgânicos de MP atmosférico foi relatada pela primeira vez em 1975 (Pitts Jr. et al., 1982; Pitts Jr et al., 1977) e, desde então, pesquisas por todo o mundo têm buscado quantificar, caracterizar, apontar as fontes emissoras e fatores interferentes, além de identificar sua capacidade genotóxica e o risco de exposição diante desse grupo de poluentes atmosféricos (Claxton e Woodall, 2007; Claxton, 2015).

Os HPAs têm baixa reatividade química com sistemas biológicos e devem ser metabolicamente ativados para intermediários eletrofílicos para exercer os efeitos genotóxicos e cancerígenos. A ativação metabólica dos HPAs ocorre pelas enzimas de biotransformação de Fase I (oxidação, redução, hidrólise) e de Fase II (que formam conjugados polares) (Billet et al., 2008; Shimada et al., 2013).

Três vias principais de ativação metabólica de HPAs têm sido propostas na literatura. De maneira geral, a primeira via é a geração de diolepóxidos catalizada por citocromo P450, levando à formação de adutos de DNA, considerado um processo essencial no mecanismo da carcinogênese e mutagênese dos HPAs (Ohnishi e Kawanishi, 2002). Esta via de ativação metabólica tem sido descrita para muitos HPAs associados ao MP, incluindo o benzo(a)antraceno, o benzo(b)fluoranteno, o benzo(a)pireno e o dibenzo(a,h)antraceno, tanto *in vitro* (extratos de células, microssomas, e sistemas de cultura de células), como

em alguns estudos *in vivo* (IARC, 2013). De acordo com Shimada e Fujii-Kuriyama (2004) o CYP1A1 e o CYP1B1 são os responsáveis pela ativação dos HPAs por meio de epoxidação para epóxidos intermediários, que são ainda transformados em diolepóxidos mais reativos pela hidratação do epóxido (epóxido hidrolase) e a subsequente epoxidação ao longo da ligação olefínica.

A segunda via de biotransformação dos HPAs consiste na formação de radicais catiônicos catalisada por citocromo P450 peroxidase ou outras peroxidases, atuando como um co-redutor de complexo-1 (Jiang et al., 2007). Algumas evidências indicam que o benzo(a)pireno e o dibenzo(a,l)pireno exercem sua ação tumorigênica por meio deste mecanismo em pele e glândula mamária de ratos (IARC, 2013).

Na terceira via, a formação de quinonas com atividade redox catalisadas por dihidrodiol desidrogenase contribui para a carcinogênese dos HPAs (Valavanidis et al., 2008). Esta via de ativação metabólica tem sido observada para vários HPAs presentes em amostras de MP atmosférico, incluindo criseno, benzo(a)antraceno e benzo(a)pireno em sistemas *in vitro* (enzimas recombinantes) e culturas de células do pulmão humano (IARC, 2013; Park et al., 2008).

Os metabólitos reativos dos HPAs são capazes de interagir com macromoléculas e induzir danos ao DNA (Senthilkumar et al., 2014). Os HPAs associados ao MP são capazes de produzir e aumentar as espécies reativas de oxigênio (ERO) e os adutos de DNA (Feng et al., 2016) (Figura 3). Tanto o dano oxidativo como os adutos de DNA podem iniciar um processo de ruptura das duas fitas do DNA (Wilk et al., 2013).

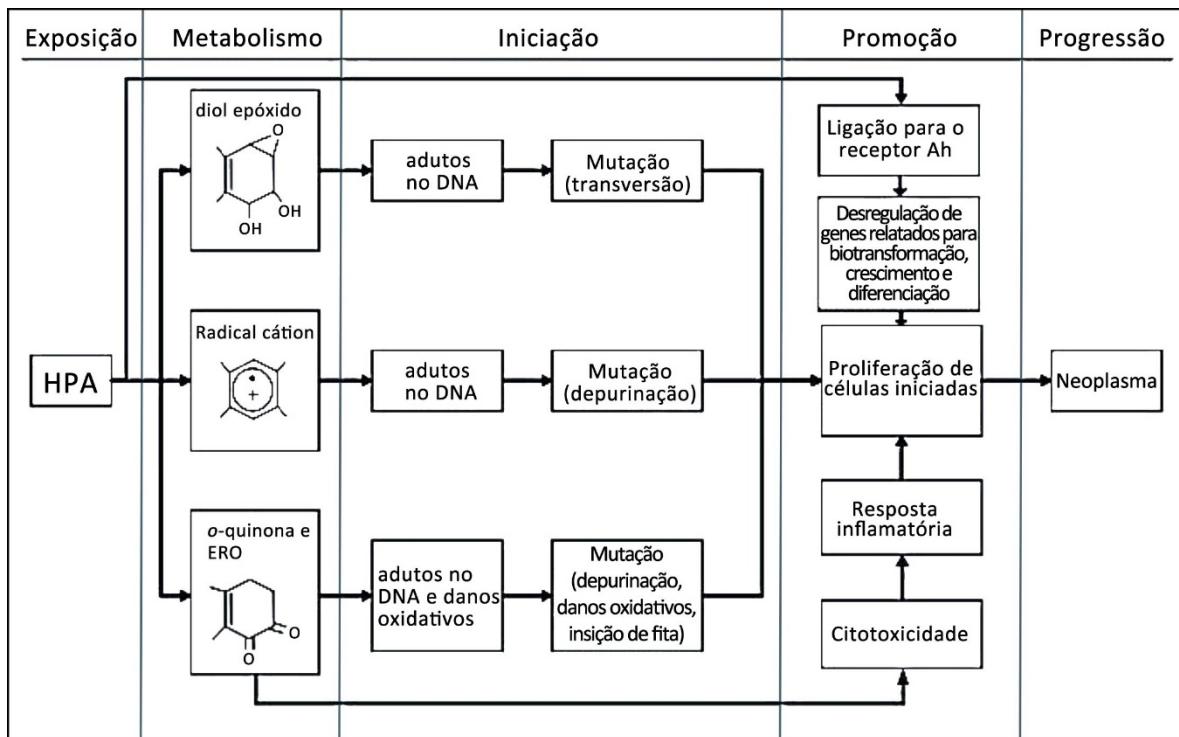


Figura 3: Esquema geral da ação mutagênica e carcinogênica dos HPAs. Fonte: Alves et al. (2014).

O benzo(a)pireno (BaP) é considerado como o HPA mais tóxico e é o melhor avaliado toxicologicamente, no entanto, poucas informações estão disponíveis para a maioria dos HPAs (Jung et al., 2010). Em muitos estudos, o BaP costuma ser considerado como um composto indicador do potencial de risco de exposição a uma mistura complexa de HPAs devido ao seu potencial carcinogênico (IARC, 2013) e sua estreita relação com outros HPAs (Hanedar et al., 2014). A mutagenicidade e carcinogenicidade relativa dos HPAs individuais em relação ao BaP tem sido avaliada por meio de fatores de equivalência mutagênica (BaP-MEF) e carcinogênica (BaP-TEF) proposto por Durant et al. (1999, 1996). Os valores de MEF e TEF combinados com as concentrações dos HPAs associados ao MP atmosféricos podem ser utilizados para calcular os equivalentes mutagênicos (MEQ) e carcinogênicos (TEQ) em amostras ambientais (Ohura et al., 2004), o que permite uma avaliação do risco potencial à exposição a misturas complexas de HPAs.

No entanto, os HPAs, que são as substâncias comumente monitoradas, não são os únicos responsáveis pela mutagenicidade associada a partículas do ar. Demonstrou-se que os

metais associados ao MP podem produzir efeitos celulares adversos, por meio de estresse oxidativo, geração de radicais livres de oxigênio, danos ao DNA, mutagenicidade e estimulação de fatores pró-inflamatórios (Roubicek et al., 2007; Velali et al., 2016). Embora estudos toxicológicos tenham determinado que a exposição a metais pode trazer consequências graves para a saúde humana como o desenvolvimento de doenças neurológicas e câncer (Heal et al., 2005), poucos estudos exploraram a fração solúvel em água e a contribuição diferencial das diversas espécies químicas presentes nesta fração para o dano genotóxico (Larry D. Claxton, 2015).

Metais como elementos ou compostos metálicos constituem uma parte da crosta terrestre. No ar, os metais podem estar como aerossóis e, em alguns casos, na forma de vapor. O MP atmosférico proveniente de combustão é frequentemente constituído por uma mistura de compostos de carbono e de metais. As partículas provenientes da crosta terrestre (fontes naturais) podem conter Al, Mg e Fe, enquanto que as partículas formadas a partir da queima de combustíveis fósseis (fontes antropogênicas) contêm metais de transição tais como Cr, Co, Ni, Cu, Zn, As, Se e Pb (USEPA, 2004).

A presença de metais em amostras de material particulado em diferentes regiões do mundo foi relatada por muitos pesquisadores (Kim et al., 2009; Loyola et al., 2006; Manalis et al., 2005; Samara and Voutsas, 2005; Thomaidis et al., 2003; Valavanidis et al., 2006; Zereini et al., 2005). Na maioria dos estudos sobre a poluição do ar e fontes de poluição, normalmente as concentrações totais dos metais são determinadas no material particulado e o papel específico da fração solúvel do material particulado é ainda pobemente descrito. No entanto, no planejamento de estratégias para o controle da poluição do ar, a determinação desses elementos nas frações solúveis em água pode fornecer informação valiosa sobre a especiação dos elementos, sua origem e sua biodisponibilidade (Fernández Espinosa et al., 2002).

O potencial genotóxico e carcinogênico dos metais é principalmente dependente do seu estado de oxidação, uma vez que este afeta a sua absorção através das membranas celulares (Figura 4), a distribuição e a biodisponibilidade intracelular (Beyersmann e Hartwig, 2008). Em particular, as espécies solúveis em água associadas com MP têm sido identificadas como prioritárias, devido à sua maior biodisponibilidade, e como consequência, provavelmente um maior potencial tóxico (Wiseman, 2015).

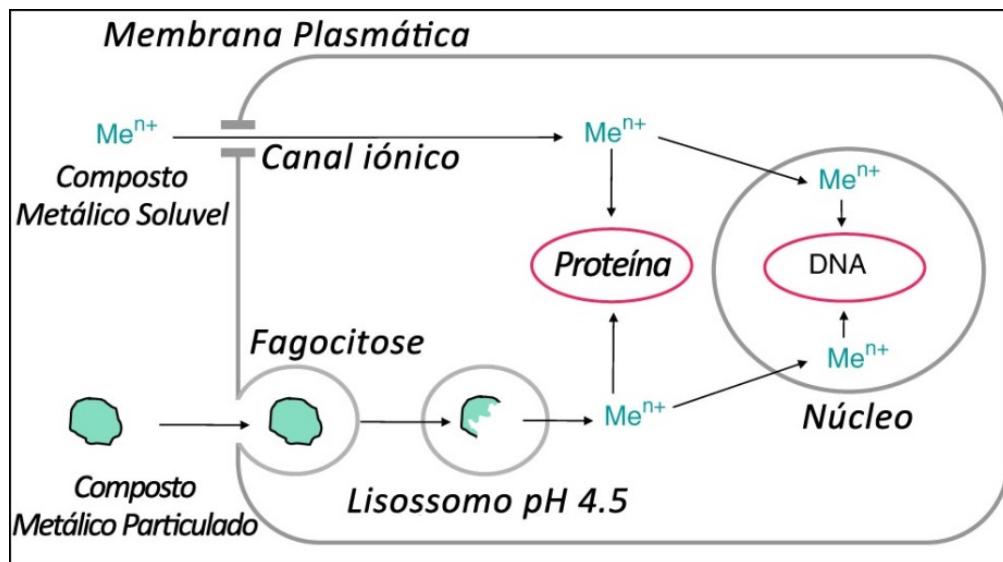


Figura 4: Captação celular e distribuição intracelular dos compostos metálicos. Adaptado de Beyersmann e Hartwig (2008).

A indução de estresse oxidativo é o principal padrão do modo de ação genotóxico dos metais (Annangi et al., 2016). O DNA é o alvo dos íons metálicos, devido à sua estrutura rica em elétrons, que oferece sítios ligantes e de complexação para os íons metálicos carregados positivamente (IARC, 2015). Os íons metálicos associados com MP com potencial redox podem contribuir para o aumento na produção de ERO e desempenham um papel importante no dano oxidativo do DNA (Kasprzak, 2002). Metais solúveis, tais como Fe, Ni, V, Co, Cu e Cr presentes em partículas inaladas foram associados com o aumento da produção de ERO seguido por estresse oxidativo em células epiteliais das vias respiratórias (Knaapen et al., 2002; Schaumann et al., 2004; Valavanidis et al., 2008).

O mecanismo geral de ativação de oxigênio por íons metálicos é baseado na reação de Fenton/Haber-Weiss (Figura 5) e reações de auto-oxidação (Bal e Kasprzak, 2002). Este mecanismo compreende a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por um íon de metal de transição, o que resulta na formação do radical hidroxila reativo e o íon de metal oxidado. A forma oxidada do metal também pode originar uma auto-oxidação na presença de oxigênio molecular, gerando H_2O_2 .

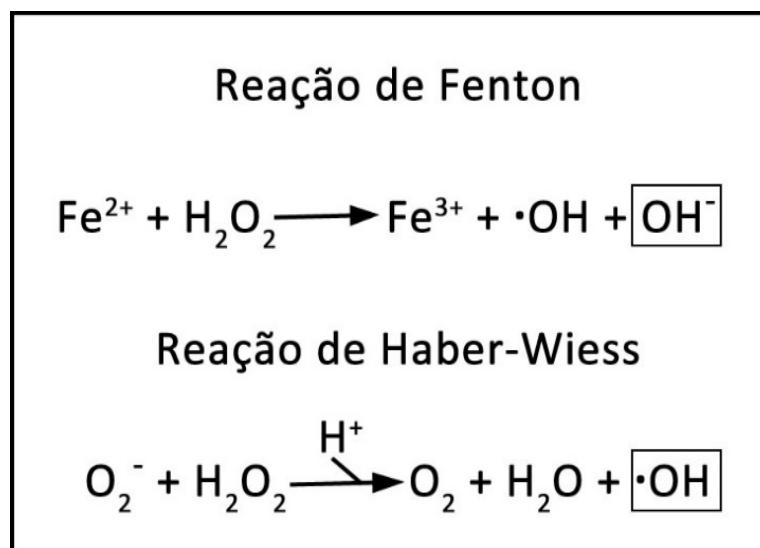


Figura 5: Esquema das reações de Fenton e Haber-Weiss a partir de íons de metais de transição como o Fe. Adaptado de Macedo-Márquez (2012).

Íons de metais de transição tais como os de ferro, cobre, cromo e níquel podem doar ou aceitar elétrons livres através de reações intracelulares, aumentando os níveis de radicais livres. As lesões do DNA induzidas por ERO incluem a quebra simples ou dupla dos filamentos de DNA em sítios apurínicos/apirimídicos (AP), “crosslinks” DNA-proteínas e modificação de bases de DNA (Beyersmann e Hartwig, 2008).

Além disso, os metais podem inibir os sistemas de reparo do DNA, resultando na instabilidade genômica e na acumulação de mutações críticas; desregular a proliferação celular pela indução das vias de sinalização ou inativação dos genes controladores de crescimento celular, como os genes supressores de tumor (Beyersmann e Hartwig, 2008).

Como a toxicidade do material particulado é influenciada pelo grau de solubilidade dos metais e da sua capacidade reativa, a determinação do teor de metais solúveis e seu potencial mutagênico em amostras de MP usando métodos simples e confiáveis é importante para compreender os seus efeitos sobre a saúde humana e o meio ambiente.

Da mesma forma como o preparo de amostras é uma etapa crítica do procedimento analítico, o método de extração pode afetar significativamente os resultados dos testes de genotoxicidade de misturas complexas. Estimou-se que aproximadamente entre 55 e 95% da variabilidade inter-laboratorial em relação à mutagenicidade de amostras de MP é devida às diferenças nos métodos analíticos, e não devido a diferenças reais no potencial mutagênico da amostra avaliada (Marvin e Hewitt, 2007).

Recentemente, tem havido um aumento da procura de novas técnicas de extração com alta eficiência e menor tempo de trabalho, pois numerosas amostras de MP são coletadas e analisadas nas redes de monitoramento de qualidade do ar de um grande número de países (Sathrugnan e Balasubramanian, 2005). A maior parte das amostras para o estudo dos efeitos mutagênicos de material particulado são extraídas usando banhos de ultrassom, no entanto, existe uma tendência crescente na utilização de procedimentos assistidos por radiação micro-ondas para o preparo de amostras.

Em geral, uma combinação de diferentes ácidos (HNO_3 , HF, H_2O_2 , H_3BO_3) é utilizada no processo de extração da fração inorgânica para quantificar o conteúdo de metais totais em MP de ar, esta metodologia não pode ser aplicada em alguns sistemas biológicos devido à alta sensibilidade à acidificação das amostras. Recentemente, vários pesquisadores (Heal et al., 2005; Karthikeyan et al., 2006) têm utilizado a água como solvente na extração da fração hidrossolúvel do MP de ar, com o objetivo de determinar a solubilidade dos metais nele contidos e posteriormente seus efeitos sobre a saúde humana.

O estudo dos efeitos genotóxico e mutagênico da fração solúvel do MP através de testes biológicos que empregam bactérias e células em cultura é ainda pouco comum, e é necessário o desenvolvimento de metodologias de extração que representem baixa interferência e alta eficiência que permita determinar as concentrações de elementos solúveis em agua em amostras de material particulado e o efeito sobre a saúde humana e o ambiente.

Em geral, apenas uma fração dos compostos mutagênicos presentes no ambiente pode interagir com os organismos e, portanto, a determinação de concentrações totais em um dado compartimento, independentemente das diferentes espécies da substância, apenas fornece informação parcial sobre os riscos potenciais da sua presença no meio ambiente e não permite a determinação da relação entre a exposição da população aos poluentes e o subsequente efeito biológico (Kakkar e Jaffery, 2005). A dificuldade de obter informações confiáveis sobre a atividade biológica de poluentes a partir dos resultados obtidos nas análises químicas (Claxton et al., 2004) indica que estas análises não devem constituir as bases para o prognóstico dos efeitos da poluição do ar sobre as populações humanas e o ambiente. Assim, além de métodos analíticos, é conveniente a aplicação de bioensaios no controle da qualidade do ar (Bełcik et al., 2014).

A combinação de bioensaios de curta duração com técnicas químico-analíticas tem sido usada com sucesso para a identificação de uma grande variedade de compostos mutagênicos em matrizes complexas como o ar (Marvin e Hewitt, 2007). Os bioensaios são ferramentas valiosas, pois permitem a detecção dos efeitos de uma grande variedade de substâncias químicas e suas interações, mesmo quando eles ocorrem em baixas concentrações (Kessler et al., 2012). Os diferentes bioensaios utilizados para avaliar a presença de compostos biologicamente ativos fornecem informações importantes sobre a identificação do perigo ao qual a população está exposta, permitem comparações entre diferentes locais, indicam as principais classes de compostos químicos presentes nas amostras e auxiliam na avaliação de risco à saúde humana e em programas de monitoramento da qualidade do ar (Claxton e Woodall, 2007).

O ensaio de *Salmonella*/microssoma, também conhecido como o teste de Ames, é um ensaio bacteriano de mutação reversa, de curta duração, que emprega linhagens de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium¹ derivadas da linhagem parental LT2, auxotrófica para histidina (*his*⁻), apresentando diferentes mutações no operon deste aminoácido, que são utilizadas para detectar mutações de ponto no DNA (substituição de pares de bases e alterações no quadro de leitura do DNA). Essas linhagens são incapazes de crescer em meio da cultura mínimo, a menos que ocorram mutações que restauram sua capacidade de síntese de histidina.

Além da mutação no operon da histidina, as linhagens apresentam características genéticas adicionais que lhes conferem maior sensibilidade e versatilidade na detecção de mutágenos, como um aumento na permeabilidade da parede bacteriana (mutação *rfa*) pela perda parcial da barreira de lipopolissacarídeos, facilitando a difusão de moléculas, e uma diminuição na capacidade de reparo devido a deleção do gene *uvrB*, o qual é um dos genes responsáveis pelo reparo da molécula de DNA por excisão (Mortelmans e Zeiger, 2000). A deleção no gene *uvrB* se estendeu através do gene da biotina e como consequência, essas linhagens também requerem a presença dessa vitamina para o seu crescimento (Tabela 2).

¹ O gênero *Salmonella* foi revisado quanto à sua taxonomia. *Salmonella typhimurium* foi alterado para *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhimurium (Brenner et al., 2000)

Tabela 2: Características genéticas das linhagens de *S. Typhimurium* mais comumente utilizadas no teste de Ames. Adaptado de Umbuzeiro e Roubicek (2008).

Linhagem	Mutação <i>his</i> ¹	Tipo de mutação	Alvo de mutação	Taxa de reversão espontânea	LPS ²	Reparo ³	Mutação para Biotina ⁴
TA1535	<i>hisG46</i>	Substituição de pares de bases	GC	20-35	<i>rfa</i>	ΔuvrB	<i>bio</i> ⁻
TA1537	<i>hisC3076</i>	Deslocamento do quadro de leitura	GC	5-25	<i>rfa</i>	ΔuvrB	<i>bio</i> ⁻
TA1538	<i>hisD3052</i>	Deslocamento do quadro de leitura	GC	15-35	<i>rfa</i>	ΔuvrB	<i>bio</i> ⁻
TA97a	<i>hisD6610</i>	Deslocamento do quadro de leitura	GC	90-180	<i>rfa</i>	ΔuvrB	<i>bio</i> ⁻
TA98	<i>hisD3052</i>	Deslocamento do quadro de leitura	GC	25-75	<i>rfa</i>	ΔuvrB	<i>bio</i> ⁻
TA100	<i>hisG46</i>	Substituição de pares de bases	GC	75-225	<i>rfa</i>	ΔuvrB	<i>bio</i> ⁻
TA102	<i>hisG428</i>	Substituição de pares de bases	AT	240-320	<i>rfa</i>	+	<i>bio</i> ⁺
TA104	<i>hisG428</i>	Substituição de pares de bases	AT	245-475	<i>rfa</i>	ΔuvrB	<i>bio</i> ⁻

¹ Mutação *his* responsável pela síntese da histidina

² Mutação *rfa* altera a permeabilidade da membrana de lipopolissacarídeos

³ ΔuvrB deleção do gene *uvrB*

⁴ Dependência a biotina

As linhagens mais comumente utilizadas pela maioria dos autores são TA98 e TA100, principalmente em estudos de triagem, pois elas têm se mostrado eficientes na detecção de um grande número de agentes mutágenos (Claxton et al., 1987).

Este bioensaio tem sido amplamente utilizado como metodologia de investigação da mutagenicidade de MP atmosférico em todo o mundo (Claxton e Woodall, 2007) e é considerado um bioensaio essencial para estudos de monitoramento ambiental que visam avaliar riscos genotóxicos (Villalobos-Pietrini et al., 2006).

As respostas obtidas neste ensaio, associadas às diferentes linhagens de *Salmonella* e à presença da fração de homogenado de fígado de rato para metabolização *in vitro* (fração

S9), podem indicar classes específicas de compostos encontrados nas amostras, o que demonstra que este ensaio é uma ferramenta apropriada para avaliar o dano do DNA resultante da exposição a misturas complexas influenciadas por diferentes fontes (Vargas et al., 2011). O teste de Ames apresenta outras vantagens importantes, podendo ser realizado com pequenas quantidades de amostra, é simples, relativamente rápido e de baixo custo comparado com outros ensaios e métodos analíticos (Claxton et al., 2004).

Além das mutações de ponto, as mutações cromossômicas podem ser verificadas com o uso de bioensaios citogenéticos, como a indução de micronúcleos, que tem sido relatada como ferramenta eficiente para detectar danos induzidos pela poluição do ar (Alves et al., 2014; Fenech, 2002; Roubicek et al., 2007). Os micronúcleos (MN) são fragmentos de cromatina que têm a forma de pequenos núcleos e são observados perto do núcleo em células em interfase. Estes corpos citoplasmáticos surgem espontaneamente ou como resultado da ação de agentes clastogênicos e/ou aneugênicos que geram fragmentos de cromossomos acêtricos e/ou cromossomos atrasados durante a anáfase mitótica (Fenech, 2007). O significado biológico dos micronúcleos depende da região do DNA envolvido na ruptura e/ou o cromossomo que não é preso ao fuso mitótico durante a divisão celular, podendo ter como consequência a morte celular ou estar relacionado com distúrbios genéticos mais graves, como o desenvolvimento de tumores ou efeitos sobre a prole (Pastor, 2002). O teste do micronúcleo é amplamente utilizado como biomarcador de dano cromossômico, porque é simples, confiável, sensível e não dependente de nenhuma característica cariotípica (Heddle et al., 1991).

Especificamente, o teste de micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN) é o método preferencialmente utilizado para a medição de MN *in vitro* em células de mamíferos pois a análise se restringe a células binucleadas, ou seja, aquelas que passaram por um ciclo de divisão após a exposição a um agente genotóxico. No CBNM as células que completaram uma divisão nuclear têm a citocinese bloqueada pela introdução de citocalasina B (Cito-B) no meio, um inibidor da polimerização nuclear da proteína actina, necessária para a formação do anel de microfilamentos responsável pela indução da

contração do citoplasma e consequente clivagem da célula em duas células filhas (Fenech, 2000; Fenech et al., 2003). Este método possibilita a comparação da frequência de danos cromossômicos entre populações celulares que podem diferir na cinética de divisão e confere à técnica boa reproduzibilidade e confiabilidade (Fenech, 2007).

Estudos do efeito genotóxico de material particulado de ar em áreas urbanas utilizando o teste de micronúcleo foram realizados com diversos organismos e tipos celulares, como vegetais do gênero *Tradescantia* (Carreras et al., 2013; Ceretti et al., 2015), células das raízes de *Vicia faba* (Corrêa et al., 2016), linhagem celular de macrófagos RAW264.7 (Poma et al., 2006), células de carcinoma de pulmão humano (Roubicek et al., 2007; Zeng et al., 2015), células BEAS-2B de epitélio brônquico humano (Oh et al., 2011) e linfócitos de sangue periférico humano (O'Callaghan-Gordo et al., 2015).

O uso da linhagem celular de adenocarcinoma humano de pulmão A549 parece ser uma ferramenta interessante para o estudo dos efeitos genotóxicos do material particulado de ar, uma vez que as células pulmonares representam o principal alvo biológico para os compostos genotóxicos inalados. Além disso, as células A549 mantêm muitas das características metabólicas das células do epitélio pulmonar tipo II, respondem à presença de compostos genotóxicos e têm a capacidade de biotransformar xenobióticos (Roubicek et al., 2007).

De acordo com (Brits et al., 2004), o uso de ambos, o teste de micronúcleos em células de mamíferos e o ensaio de *Salmonella*/microssoma, para avaliar o potencial genotóxico de misturas complexas, como material particulado, permite entender melhor os mecanismos de ação das substâncias que causam danos ao DNA em nível pontual ou cromossômico.

A identificação e quantificação dos efeitos genotóxicos de compostos químicos específicos em misturas complexas, tais como MP representam um dos maiores desafios da pesquisa em mutagênese ambiental. Em vários estudos, embora os valores da

concentração de partículas relatadas para áreas urbanas e industriais no Brasil (Andrade et al., 2011; Coronas et al., 2008; Ducatti e Vargas, 2003; Pereira et al., 2010; Umbuzeiro et al., 2008) tenham sido quantificados abaixo do máximo estabelecido por lei no país, os compostos testados apresentaram atividade mutagênica (Tabela 3). O controle e redução das emissões de material particulado são muito importantes, porque isto provavelmente reduz o risco associado à exposição. No entanto, estratégias de gestão e controle da poluição que incluem a caracterização química e toxicológica das amostras são provavelmente mais eficientes (Kok et al., 2006) e ajudariam a determinar quais são os componentes do material particulado e quais as características físicas e químicas responsáveis pela toxicidade (Kelly e Fussell, 2012).

Tabela 3: Estudos do potencial genotóxico do MP no Brasil através do teste de Ames e indução de Micronúcleos.

Material avaliado	Local	Teste	Material biológico exposto	Resultado	Referência
Fração orgânica de PTS	Cidades de São Paulo e Cubatão	<i>Salmonella/</i> microssoma +/- S9	TA98 TA100 TA98NR TA98/1,8DNP6	Maior atividade mutagênica em São Paulo do que na cidade de Cubatão. Resposta positiva para todas as amostras com TA98 com e sem ativação metabólica	Sato et al., 1995
Fração orgânica de PTS	Área de influência petroquímica – Triunfo/Rio Grande do Sul	<i>Salmonella/</i> microssoma +/- S9	TA98	Resposta mutagênica associada com a concentração do MP	Vargas, 2003
Fração orgânica de PTS	Áreas Urbanas na cidade de Porto Alegre	<i>Salmonella/</i> microssoma +/-S9	TA98 TA98NR TA98/1,8DNP6	Resposta mutagênica que varia de acordo a estação climática e o lugar. Relação positiva entre a concentração de TSP e a atividade mutagênica	Ducatti e Vargas, 2003
Fração orgânica de PTS e MP ₁₀	Área de influência petroquímica- Triunfo/Rio Grande do Sul	<i>Salmonella/</i> microssoma +/-S9	TA98 TA98 NR TA98/1,8 DNP YG1021 YG1024	Maior resposta mutagênica obtida nas amostras de MP ₁₀ comparada com PTS. O número de rev/m ³ foi significativamente maior nas amostras coletadas no inverno que na primavera	Coronas et al., 2008
Fração orgânica de PTS	Área de plantio de cana-de-açúcar Araraquara e Piracicaba	<i>Salmonella/</i> microssoma +/-S9	TA98 YG1041	Maior resposta mutagênica na fração mais polar. Decréscimo da resposta com ativação metabólica	Umbuzeiro et al., 2008a
Fração orgânica de PTS (HPA e nitro HPA)	São Paulo	<i>Salmonella/</i> microssoma +/-S9	TA98 YG1041	Maior potencial mutagênico da fração nitro- HPA com YG1041. A linhagem TA98 apresentou potências baixas de mutagenicidade para ambas as frações.	Umbuzeiro et al., 2008b

Tabela 3: Estudos do potencial genotóxico do MP no Brasil através do teste de Ames e indução de Micronúcleos - *continuação*

Material avaliado	Local	Teste	Material biológico exposto	Resultado	Referência
Fração orgânica do MP ₁₀	Área de influência de uma refinaria de petróleo – Canoas/Rio Grande do Sul	Salmonella/ microssoma +/- S9	TA98 YG1021 YG1024	Resposta mutagênica positiva que decresce na presença de S9, o que indica a presença predominante de compostos orgânicos que agem como mutágenos diretos	Coronas et al., 2009
Exposição ambiental numa área de refinaria de petróleo		Micronúcleos	Células da mucosa bucal de pessoas que residem ou trabalham na refinaria	Não houve aumento significativo de micronúcleos comparado com o grupo controle	
Exposição ambiental numa área com altas concentrações de ozônio e tráfego veicular	Santo André, S.P	Micronúcleos	Inflorescências de <i>Tradescantia pallida</i>	Aumento na frequência de micronúcleos, especialmente em zonas de alto tráfego veicular.	Savóia et al., 2009
Fração orgânica de TSP	Montenegro e Santo Antônio de Patrulha- Rio Grande do Sul	Salmonella/ microssoma +/- S9	TA98 TA100 YG1021 YG1024	Resposta mutagênica alta associada à presença de HPA e nitro compostos	Pereira et al., 2010
Fração orgânica do MP10	Cidade de São Paulo	Salmonella microssoma +/- S9	TA98 YG1041	Respostas significativamente maiores para a linhagem YG1041 que para TA98, sugerindo a presença de compostos nitroaromáticos.	Franco et al., 2010

Tabela 3: Estudos do potencial genotóxico do MP no Brasil através do teste de Ames e indução de Micronúcleos - *continuação*

Material avaliado	Local	Teste	Material biológico exposto	Resultado	Referência
Fração orgânica do MP ₁₀	Área de plantio de cana-de-açúcar Araraquara	<i>Salmonella microssoma</i> +/- S9	YG1024	O potencial mutagênico foi aproximadamente quatro vezes maior no período de colheita (queima) em comparação com o período de não colheita. A atividade mutagênica foi maior na ausência de ativação metabólica.	Andrade et al., 2011
Fração orgânica e solúvel em agua de PTS e MP 2,5	Áreas urbanas-industriais e urbanas-residenciais/Rio Grande do Sul	<i>Salmonella microssoma</i> +/- S9	TA98 YG1021 YG1024	Os extratos orgânicos apresentaram respostas negativas para mutagenicidade em todos os ensaios. Todas as amostras apresentaram atividade mutagênica com potencias diferentes na fração orgânica, sendo maior na fração fina.	Lemos et al., 2012
Fração orgânica de PTS	Local (1) com influência urbana e industrial e local (2) de referência/Rio Grande do Sul	<i>Salmonella microssoma</i> +/- S9	TA98 TA100 YG1021 YG1024	Resposta mutagênica associada com a presencia de HPA e nitro compostos. Local de referência apresentou baixos potencias mutagênicos e resultados negativos.	Pereira et al., 2013
Exposição ambiental		Micronúcleos	Células da Mucosa bucal de pessoas residentes nos locais de estudo	Frequênciade MN similar a relatada para populações saudáveis	

Tabela 3: Estudos do potencial genotóxico do MP no Brasil através do teste de Ames e indução de Micronúcleos - *continuação*

Material avaliado	Local	Teste	Material biológico exposto	Resultado	Referência
Fração orgânica de MP _{2,5}	Porto Alegre/Rio Grande do Sul	<i>Salmonella microssoma</i> +/- S9	TA98 YG2021 YG1024	Todas as amostras apresentaram respostas mutagênicas na presença e ausência da fração metabolizadora. Se observou uma predominância de mutágenos que agem de forma direta nas amostras, sem descartar a grande contribuição dos HPA	Brito et al., 2013
Fração orgânica de MP ₁₀	Amazonas durante queima de biomassa intensa e moderada	Micronúcleos	Inflorescências de <i>Tradescantia pallida</i> Linha celular V79	Não se observou um aumento significativo de micronúcleos comparado com o grupo controle em nenhum dos ensaios	Alves et al., 2014
Fração orgânica de PTS	Limeira-SP Influência da queima de cana-de-açúcar	<i>Salmonella microssoma</i> +/- S9	TA98 YG1041 YG1538	Incremento significativo da frequência de MN em todas as doses testadas na fração coletada durante a queima intensa de biomassa, ao contrário das amostras da queima moderada que só apresentaram um incremento significativo de MN nas doses mais altas	Alves et al., 2016
				Foi observada uma resposta mutagênica significativamente maior com a linhagem YG1041 com relação a TA98 e uma diminuição da potência na presença de S9, sugerindo que os compostos nitroaromáticos são os que mais contribuem para a resposta biológica.	

Apesar da grande quantidade de informação que existe atualmente sobre o assunto, é ainda necessário determinar com precisão a fonte ou fontes de emissão, a interação do material particulado com outras espécies na atmosfera e, principalmente, a composição química das partículas e a sua relação com a toxicidade, para assim estabelecer medidas para prevenir ou atenuar os efeitos causados pela exposição a estes compostos na saúde humana e ao meio ambiente. Também é importante desenvolver metodologias que possam ser usadas para avaliar as ações públicas que visam reduzir os problemas causados pela poluição do ar.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos mutagênicos e genotóxicos *in vitro* da fração orgânica e da fração solúvel em água de material particulado (MP_{10}) coletado em três locais diferentes do estado de São Paulo e estabelecer uma metodologia apropriada que poderá ser utilizada rotineiramente no monitoramento da qualidade do ar.

2.2 Objetivos específicos

Estabelecer uma metodologia para a extração e determinação da mutagenicidade da fração solúvel em agua do MP.

Analizar a composição química da fração orgânica (HPAs) e solúvel em agua (metais) do MP.

Estabelecer a atividade mutagênica da fração orgânica e solúvel em agua do MP utilizando-se o teste de *Salmonella/microssoma*.

Avaliar a atividade genotóxica *in vitro* de material particulado sobre células humanas em cultura de carcinoma humano de pulmão A549.

Estabelecer a relação entre a composição química do MP e o efeito biológico observado no teste de *Salmonella/microssoma* e nas células A549.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

A avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos da fração solúvel em água de material particulado de ar é ainda pouco comum, seja empregando-se o teste de *Salmonella*/microsoma ou ensaios biológicos que utilizam células em cultura. Por este motivo foram realizados ensaios preliminares para estabelecer um método adequado de extração da fração hidrossolúvel de MP e subsequente avaliação da mutagenicidade.

O presente estudo foi realizado em duas etapas: na etapa 1, dois diferentes métodos de extração de amostras foram comparados e avaliados e, na etapa 2, a técnica que se mostrou mais adequada na etapa 1 foi utilizada para avaliação da mutagenicidade do material particulado de ar de três locais do estado de São Paulo.

Serão apresentadas, a seguir, os métodos utilizados nas duas etapas do trabalho.

3.1 AMOSTRAS DE MATERIAL PARTICULADO DE AR

3.1.1 Amostragem

As amostras de MP foram coletadas em filtros de fibra de vidro (Pall Corporation) de 20,3 x 25,4 cm, com um amostrador de grande volume (Energética Ind. Com. LTDA) que opera com uma vazão de amostragem de 1,13 m³/min por 24 horas a cada seis dias. Filtros que não completaram o período de amostragem de 24 horas devido a problemas técnicos como falhas no motor do equipamento de amostragem e cortes da luz foram descartados.

O material coletado foi determinado gravimetricamente pelo setor de Amostragem e Análise do Ar da Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB). Os filtros foram pesados antes e depois da amostragem, secos em dessecador a temperatura de 15–30°C por 48 horas e umidade relativa controlada. A concentração de MP foi expressa em µg/m³ de PTS e MP₁₀ amostrado. Os filtros foram armazenados a temperatura ambiente e protegidos da luz até sua posterior análise.

3.1.2 Amostras para determinação da metodologia de extração de amostras hidrossolúveis (Etapa 1)

Um total de quatro amostras de partículas totais em suspensão (PTS) e quatro amostras de partículas inaláveis (MP_{10}) foram analisadas a fim de comparar dois diferentes métodos de extração (Tabela 4). As amostras foram coletadas em diferentes locais do estado de São Paulo com vocação econômica industrial. Para o propósito da comparação das metodologias de extração, as amostras foram reunidas em “pools”, utilizando-se um quarto de cada filtro, independentemente do local onde foram recolhidos.

Tabela 4: Características das amostras de MP de ar utilizadas para a determinação da metodologia de extração de compostos hidrossolúveis.

Identificação da Amostra	Tamanho de partícula	Número de filtros	Massa (mg)	Volume (m^3)	Concentração ($\mu g/m^3$)
PTS-1	PTS	4	409,3	2131,7	193,7
PTS-2	PTS	4	253,5	1629,8	155,5
PTS-3	PTS	4	86,0	1930,3	44,7
PTS-4	PTS	4	253,8	2177,6	117,2
MP_{10} -1	MP_{10}	4	129,6	1547,8	83,7
MP_{10} -2	MP_{10}	4	127,0	1575,1	81,0
MP_{10} -3	MP_{10}	4	104,9	1510,8	69,2
MP_{10} -4	MP_{10}	4	115,2	1542,9	74,5

3.1.3 Amostras de MP_{10} para avaliação de mutagenicidade (Etapa 2)

A amostragem foi realizada em três locais do estado de São Paulo (L1, L2 e L3), influenciados por diferentes fontes de poluição. O local 1 (L1) situa-se em área urbana com tráfego intenso de veículos, L2 está localizado em uma zona industrial petroquímica (refinarias de combustível pesado) e L3 em uma região produtora de cerâmica.

As amostras foram obtidas combinando um quarto ($\frac{1}{4}$) de todos os filtros individuais coletados nos períodos de primavera (setembro, outubro, novembro), outono (março, abril, maio) e inverno (junho, julho, agosto) de 2013, e no verão (dezembro, janeiro e fevereiro) 2013–2014, para cada um dos locais avaliados. O cálculo da massa, volume e concentração total de MP de cada amostra foi realizado somando-se a massa, volume e concentração de todos os $\frac{1}{4}$ de filtros pertencentes a essa amostra (Tabela 5).

Tabela 5: Período de coleta, massa, volume e concentração total de MP₁₀.

Local	Estação	Número de filtros	Massa (mg)	Volume (m ³)	Concentração (μg/m ³)
L.1	Primavera	12	199,7	4561,3	43,8
L.1	Verão	10	173,2	3861,7	44,9
L.1	Outono	14	212,1	5396,7	39,3
L.1	Inverno	14	226,8	5391,5	42,1
L.2	Primavera	13	286,6	7944,1	36,1
L.2	Verão	9	237,3	4659,3	49,0
L.2	Outono	12	243,8	7285,5	33,5
L.2	Inverno	16	428,6	9788,3	43,8
L.3	Primavera	15	480,9	5833,3	82,4
L.3	Verão	10	252,5	3907,8	64,6
L.3	Outono	12	384,1	4421,5	86,9
L.3	Inverno	12	489,7	4445,9	110,1

3.2 EXTRAÇÃO DE MATERIAL PARTICULADO DE AR

3.2.1 Determinação da metodologia de extração de compostos hidrossolúveis (Etapa 1)

3.2.1.1 Extração assistida por micro-ondas

Para a extração em micro-ondas, os filtros (¼ de cada) foram colocados nos tubos de teflon (TFM®) (Milestone, Sorisole-BG, Itália) com 20 ml de água ultrapura. A extração foi realizada usando-se uma potência de 1000 W e uma temperatura de 100°C durante 10 minutos logo após alcançar a temperatura programada. Após 30 minutos de resfriamento das amostras no interior do aparelho, os frascos foram abertos e a suspensão foi filtrada utilizando um filtro Millipore 0,45 μm.

3.2.1.2 Extração em banho de ultrassom

Os filtros foram fracionados e depositados em um erlenmeyer com 40 ml de água ultrapura. As amostras foram agitadas em agitador rotativo (Sola SL, 223, São Paulo - Brasil) durante 1 hora a 160 rpm e 36°C e posteriormente colocadas em banho de ultrassom (Unique USC-1800, São Paulo - Brasil) operado a 40 KHz e 154 W, durante 30

minutos em temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido duas vezes para cada amostra, conforme esquema apresentado na Tabela 6.

Tabela 6: Esquema do procedimento utilizado para a extração em banho de ultrassom.

Etapa	Tempo	Temperatura
Adição de água ultrapura	-	Ambiente
Agitação por agitador rotativo (160 rpm)	1 hora	36°C
Banho ultrassom	30 min	Ambiente
Adição de água ultrapura	-	Ambiente
Agitação por agitador rotativo (160 rpm)	1 hora	36°C
Banho ultrassom	30 min	Ambiente

Imediatamente após a extração, as amostras foram filtradas em filtro de 0,45 µm (Millipore, Billerica-MA, USA) e uma alíquota foi acidificada para posterior determinação química.

Para garantir a qualidade dos resultados, filtros limpos (brancos) foram extraídos seguindo a mesma metodologia da extração assistida por micro-ondas e banho de ultrassom para determinação dos metais e testes de mutagenicidade. Após a extração, parte da amostra foi separada para as análises químicas e o restante foi aliquotado e congelado até o momento dos ensaios biológicos. Antes da realização do teste de Ames, as amostras foram descongeladas e usadas diretamente.

Adicionalmente, material de referência SRM 1648a (Urban Particulate Matter), obtido do National Institute of Standards and Technology (NIST, Gaithersburg- MD, USA), foi utilizado para comparar a eficiência na recuperação de extração dos metais hidrossolúveis da metodologia assistida por micro-ondas e banho de ultrassom. Seis amostras independentes de SRM 1648a, com uma massa de 10 mg foram extraídas com 15 ml de água ultrapura seguindo a mesma metodologia estabelecida para a extração da fração hidrossolúvel das amostras de MP com micro-ondas e banho de ultrassom.

3.2.2 Extração de MP₁₀ para avaliação da mutagenicidade (Etapa 2)

A extração das frações orgânica e solúvel em água foi realizada em micro-ondas Milestone, modelo Ethos 1 (Sorisole-BG, Itália), sistema de média pressão com capacidade para 12 tubos de TFM®.

3.2.2.1 Extração da fração solúvel em água de MP₁₀

Para a extração de compostos solúveis em água, os filtros foram colocados nos tubos com 20 ml de água ultrapura (18,2 MΩ - Purelab Ultra SC MK2 Elga, WS, Inglaterra). O equipamento foi ajustado para uma potência de 1000 W e uma temperatura de 100°C durante 10 minutos com uma rampa de aquecimento de 10 minutos.

Os perfis de energia e temperatura foram monitorados em uma tela externa e a temperatura foi usada como parâmetro de controle. Após resfriamento, a suspensão foi filtrada em membrana Millipore 0,45 µm (Billerica, MA-EUA).

3.2.2.2 Extração da fração orgânica de MP₁₀

Para a extração de compostos orgânicos foi empregada uma mistura de hexano-acetona (1:1), a uma potência 1000 W e uma temperatura de 120°C durante 20 minutos, de acordo com a metodologia descrita pela USEPA para extração assistida por micro-ondas (USEPA Método 3546). O solvente permite a extração de compostos mais apolares, como os HPAs de massas moleculares maiores.

O extrato obtido foi filtrado e o volume reduzido em rotaevaporador (Büchi RE 120, Flawil-Wil, Suíça) a 40°C até aproximadamente 5 ml. Em seguida, o extrato orgânico foi evaporado até 1 ml com nitrogênio gasoso e o volume completado até 5 ml com diclorometano.

Para a determinação química de HPAs, 1 ml da amostra foi separada e o solvente trocado por acetonitrila. O volume restante foi evaporado com nitrogênio gasoso e ressuspendido com dimetilsulfóxido (DMSO) para o ensaio de mutagênese. Filtros limpos foram tratados da mesma maneira que as amostras, nas etapas de extração, determinação química e análise de mutagenicidade.

3.3 ANÁLISES BIOLÓGICAS

As análises biológicas foram realizadas da mesma maneira em ambas as etapas do trabalho.

3.3.1 Ensaio de *Salmonella*/microssoma - Teste de Ames

3.3.1.1 Linhagens de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Para os ensaios utilizaram-se as linhagens TA98 e TA100 de *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, que detectam mutações de deslocamento de quadro de leitura (“frameshift”) e substituições de pares de bases, respectivamente (ver Tabela 2).

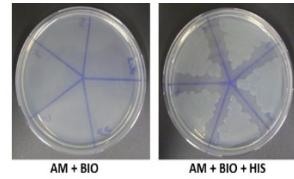
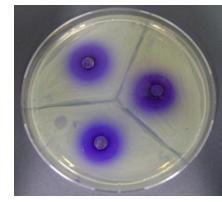
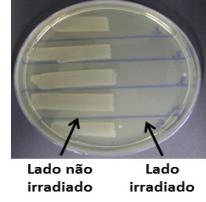
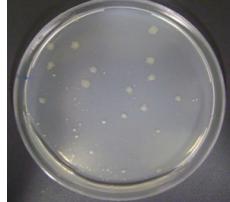
As linhagens TA98 e TA100 empregadas neste trabalho foram preparadas a partir de linhagens de estoque permanente do laboratório de mutagênese da CETESB, cedidas gentilmente pelo Dr. Bruce Ames (University of California, Berkeley, CA-USA), no início da década de 1980 e mantidas congeladas.

A verificação dos genótipos das linhagens foi realizada bimestralmente, ou antes se as linhagens não apresentassem a taxa de reversão espontânea ou os índices de mutação induzida esperados, de acordo com os valores históricos determinados no laboratório. Para tanto, uma ampola de linhagem de estoque permanente é descongelada e transferida para um frasco com caldo nutriente (Oxoid nº2) contendo 25 µg de ampicilina (Inlab) e incubada durante a noite a 37°C sob agitação a 160 rpm.

As colônias de bactérias são isoladas estriando a cultura em placa de ágar nutriente, com auxílio de uma alça de inoculação. Após este procedimento, as placas são incubadas por 24 horas a 37°C. De cada linhagem são selecionadas de 5 a 10 colônias isoladas e transferidas uma a uma a tubos contendo 6 ml de caldo nutriente e incubadas durante a noite a 37°C em agitador a 160 rpm. Volumes de 180 µl da cultura bacteriana e 20 µl de DMSO são adicionados em tubos tipo eppendorf previamente identificados com o nome da linhagem e lote da colônia, seguindo o protocolo do laboratório da CETESB, para a manutenção do estoque das linhagens que são mantidas armazenadas em freezer a $-81\pm5^{\circ}\text{C}$.

O procedimento para a verificação das características genéticas das linhagens TA98 e TA100 se resume na Tabela 7.

Tabela 7: Procedimento para a verificação das características genéticas das linhagens TA98 e TA100 de *S. Typhimurium*.

Mutação / característica	Procedimento	Imagen do resultado
<i>his</i> ⁻	Para confirmar a dependência da histidina as culturas são inoculadas em placas de ágar mínimo suplementado com biotina e em placas com ágar mínimo suplementado com biotina e histidina. As placas são incubadas e as linhagens que mantêm a dependência à histidina devem crescer apenas no meio suplementado com histidina.	
<i>rfa</i>	As culturas são testadas com relação à sensibilidade ao cristal violeta. As culturas são estriadas com zaragatoa em placas de ágar nutritivo. Depois de secar, coloca-se no centro de cada “semeadura” um disco de papel de filtro (5mm de diâmetro e 1 mm de espessura) embebido em solução de cristal violeta 0.1%. As placas são incubadas e as linhagens que apresentam a mutação mostram um halo de inibição de crescimento de no mínimo 14 mm.	
Δ uvrB	Estrias de cada colônia são feitas com zaragatoa em linhas horizontais em placas com ágar nutritivo. Na cabine de segurança biológica, a metade da placa é exposta à luz ultravioleta por 15 segundos. Após incubação as colônias cuja deleção está mantida não crescem no lado irradiado da placa.	
Presença do plasmídeo	Placas contendo ágar nutritivo são divididas em 5 partes e cada uma das partes é dividida com uma linha pontilhada sobre a qual se estria uma fina camada de ampicilina com uma alça de inoculação. As culturas são estriadas perpendicularmente à estria do antibiótico e incubadas. As linhagens que mantêm o plasmídeo de resistência à ampicilina não apresentam inibição do crescimento na linha pontilhada.	 Agar nutr. + AMPICILINA
Reversão Espontânea	100 µl de cultura de cada cepa são inoculados em tubos de ensaio com 2 ml de top ágar mantidos em banho seco (43–48°C) e homogeneizados em vórtex. O conteúdo é vertido em placa de ágar mínimo e distribuído uniformemente. Após solidificação as placas são incubadas e conta-se o número de colônias revertentes por placa. A média de revertentes por placa deve estar dentro dos limites esperados para cada linhagem.	

3.3.1.2 Teste de *Salmonella*/Microssoma - Método direto

O potencial mutagênico dos extratos hidrossolúveis do MP foi avaliado por meio do Teste de *Salmonella*/microssoma - Método direto, que é uma variação do método descrito por Maron e Ames (1983), onde é possível avaliar diferentes volumes (concentrações) de amostras aquosas. Esse método é geralmente utilizado para verificar a mutagenicidade de efluentes industriais, em que não se procede nenhum tipo de concentração/extracção da amostra, ela é apenas filtrada para garantir a esterilidade no ensaio. Nesta variação do teste, a própria amostra é utilizada como diluente do top ágar. Considerando-se que as amostras extraídas em água não poderiam ser concentradas para que o volume fosse adequado ao método, optou-se pela utilização do método direto.

As linhagens foram inoculadas em 20ml de caldo nutriente e mantidas durante a noite a 37°C sob agitação rotativa a 150–170 rpm. Após aproximadamente 16 horas de incubação, as bactérias foram refrigeradas a 4°C até o momento do ensaio.

Cinco concentrações diferentes de cada amostra (0,15; 0,3; 0,75; 1,5 e 3,0 mg de MP₁₀ por placa), em triplicata, foram distribuídos em tubos de ensaio e misturados com 100µl de bactéria (10^9 bactérias/ml) e 500 µl da mistura S9 (Homogenado de fígado de ratos Sprague Dawley, induzido por Aroclor 1254, liofilizado – MOLTOX Inc., Boone - North Carolina, USA) para a fração da amostra com ativação metabólica (+S9) e incubados por 30 minutos a 37°C. Em seguida, foi adicionado o top ágar correspondente a cada concentração e as amostras foram vertidas em placas com ágar mínimo. As linhagens sem a presença da amostra foram empregadas como controles negativos. Para os controles positivos foram utilizados 0,5 µg/placa de 4-nitroquinolina-1-óxido (4NQO-Alfa Aesar) nos tubos sem S9 e 0,5 µg/placa de 2-aminoantraceno (2AA) na presença de S9.

As doses foram escolhidas de acordo com resultados obtidos em ensaios preliminares. A dose máxima foi determinada em 3,0 mg equivalentes de MP₁₀. Neste tipo de ensaio, a maior dose da amostra deve estar contida no volume de 2 ml. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas.

3.3.1.3 Teste de *Salmonella*/Microssoma - método em microssuspensão

O extrato orgânico foi ressuspensionado com DMSO e testado para atividade mutagênica usando o teste de *Salmonella*/microssoma - método de microssuspensão (Kado et al., 1986), na qual concentram-se as culturas das linhagens de *Salmonella* e se reduz a quantidade de amostra analisada, resultando em uma maior sensibilidade do ensaio.

Após incubação durante aproximadamente 16 horas sob agitação a 37°C em caldo nutritivo, as linhagens foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e o pellet ressuspensionado em 4,0 ml de solução 1:13 de tampão fosfato 0,2M.

Um volume de 50 µl das culturas concentradas de cada linhagem foi misturando com 5,0 µL da amostra e 50 µl da mistura S9 para a fração da amostra com ativação metabólica. Para a fração sem ativação metabólica, foi adicionado 50µl de tampão fosfato aos tubos de ensaio. Os tubos foram incubados por 90 minutos a 37°C. Após esse período foi adicionado o top ágar e vertido em placas da ágar mínimo. Após solidificação as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas.

Todos os ensaios foram feitos em triplicata e as curvas dose-resposta foram analisadas utilizando as mesmas doses que nos ensaios com os extratos aquosos (0,15; 0,3; 0,75; 1,5 e 3,0 mg de MP₁₀/placa). DMSO (5 µl) foi utilizado como controle negativo, enquanto que 4-nitroquinolina-1-óxido (0,125 µg/placa) e 2-aminoantraceno (0,625 µg/placa) foram utilizados como controles positivos para a fração do ensaio sem e com ativação metabólica, respectivamente.

3.3.1.4 Viabilidade das linhagens bacterianas

A viabilidade das linhagens foi verificada no final de cada ensaio como requisito da densidade bacteriana:

Método direto: 1–2x10⁹ bactérias /ml

Método em microssuspensão: 0,5–1x10¹⁰ bactérias/ml

Um volume de 100 μ l das culturas de cada linhagem foram adicionadas a 100 ml de água de diluição homogeneizando vigorosamente e 100 μ l de esta nova solução foram dissolvidos em 100ml de agua de diluição. Para os ensaios usando o método em microssuspensão, um volume de 10ml da solução anterior foi adicionado em um frasco com 90ml de água de diluição.

Um volume de 100 μ l da solução final foram plaqueados em placas com ágar nutritivo em duplicata e incubadas a 37°C por 48 horas. A leitura das placas de viabilidade foi realizada conjuntamente com os resultados dos ensaios.

3.3.1.5 Interpretação e expressão dos resultados

A leitura dos resultados dos ensaios foi realizada com auxílio de um contador automático de colônias (AccuCount™1000, Biologics Inc., Gainesville-Virginia, USA). No momento da leitura verificou-se a presença de crescimento de fundo (“background”) nas placas testes e controles e registrou-se a presença de toxicidade ou contaminação.

O número de revertentes/mg foi determinado pelo cálculo da inclinação da reta da parte linear da curva dose-resposta no programa de computador “Salanal” (Salmonella Assay Analysis), especialmente desenvolvido para análises dos dados do teste de Ames e cedido gentilmente pelo Integrated Laboratory Systems, Research Triangle Park, Carolina do Norte, EUA e os resultados foram transformados a revertentes/ m^3 . A razão de mutagenicidade (RM) para cada dose foi obtida dividindo-se a média do número de revertentes nas placas teste sobre a média do número de revertentes por placa no controle negativo da amostra.

3.3.2 Teste de Micronúcleos

3.3.2.1 Cultura celular

A linhagem A549 de células de carcinoma de pulmão de um homem caucasiano de 58 anos foi caracterizada por Lieber et al. (1976). A linha celular tem uma taxa de

proliferação de aproximadamente 22 horas e contém um número modal de 66 cromossomos, que ocorre em 24 % das células. Células que contêm 64 (22%), 65 e 67 cromossomos também ocorrem com frequências relativamente altas (ATCC).

As células A549 foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle's (DMEM) com alto teor de glucose suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% da solução de antibiótico/antimicótico (10.000 unidades de penicilina, 10mg de estreptomicina e 25g de anfotericina B por ml). As células foram mantidas a 37 °C numa atmosfera úmida com 5% de CO₂. Depois de atingir aproximadamente 80% de confluência, as células em cultura foram tratadas com tripsina 10% (solução de tripsina-EDTA), centrifugadas durante 8 minutos a 1200 rpm e o sobrenadante foi cuidadosamente eliminado. O precipitado foi ressuspensionado em 1 ml de meio suplementado. A concentração da suspensão celular foi ajustada para a realização dos ensaios de genotoxicidade.

Os estoques celulares foram mantidos em freezer a -80°C em meio de congelação (95% soro e 5% dimetilsulfóxido - DMSO autoclavado). Periodicamente um dos eppendorf contendo as células foi descongelado para a análises de contaminação por micoplasma no laboratório de Citologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP.

3.3.2.2 Avaliação da citotoxicidade - MTT

O ensaio de MTT foi utilizado para determinar a viabilidade celular, seguindo o protocolo descrito em Hsiao et al. (2000), com algumas modificações.

O ensaio de MTT baseia-se na habilidade das células vivas de reduzirem o 3-(4,5-dimethyltziazol-2-il)-2,5-difenil-2H tetrazolato de bromo, um sal solúvel em água de coloração amarela a sais de formazan, de cor violeta.

As células A549 foram cultivadas em placas de 96 poços a uma concentração de 7×10^3 células/ml com meio DMEM suplementado. Vinte e quatro horas depois, as células foram tratadas com 0,625; 1,25; 2,5; 5 e 10m³ equivalentes das frações orgânicas e solúveis em água. Após 48 horas, o meio foi substituído por 200µl de 1,0mg/ml de MTT e incubadas por 4 horas a 37°C. A solução de MTT foi removida e 200µl de DMSO foram adicionados a

cada poço. As placas foram colocadas num agitador (50 rpm) durante 5 min. A reação foi medida a um leitor de microplacas de ELISA (Tecan Sunrise, Áustria) a 570nm.

3.3.2.3 Teste de micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN)

O ensaio de micronúcleo foi realizado segundo descrito por Salazar et al. (2009) com modificações. Uma densidade de 2×10^4 células/ml foram cultivadas em duas lamínulas previamente lavadas e esterilizadas e colocadas em placas de 60mm. Após 24 horas em cultura, as células foram expostas a doses diferentes dos extratos orgânicos e solúvel em água ($5m^3$, $2,5m^3$ e $1,25m^3$ equiv. de MP₁₀) e citocalasina B (concentração final de 3ng/ml - Sigma).

Como controles negativos, as células foram expostas a meio DMEM e uma mistura de DMEM com 0,1% de DMSO ou com água estéril, dependendo do tipo de extrato (Roubicek et al., 2007). Como controles positivos foi utilizado o benzo(a)pireno (100ng/ml, Alfa Aesar) para as amostras dos extratos orgânicos e 4-nitroquinolina-1-óxido (125µg/ml - Alfa Aesar) para as amostras solúveis em agua. Após 48 horas de exposição, as células foram lavadas com tampão de Weise (Sigma), e fixadas com uma solução gelada de metanol-ácido acético (9:1). Finalmente, as células foram coradas com 10% de Giemsa (Merck) para a observação em microscópio óptico

3.3.2.4 Interpretação e expressão dos resultados

A contagem dos micronúcleos foi feita um microscópio óptico (magnific. 400x), utilizando os critérios de contagem descritos por (Fenech, 2000). A quantificação da frequência de MN foi realizada considerando unicamente as células binucleadas com o citoplasma intato. Unicamente estruturas arredondadas, não refringentes, separadas no núcleo principal e de um diâmetro inferior a 1/3 do núcleo principal foram considerados como MN. Para cada dose, se avaliaram 2000 células binucleadas (1000 em cada lamínula).

O índice de divisão nuclear (IDN) foi também determinado. A proporção de células mononucleares, binucleadas, trinucleadas e multinucleadas em 500 células foram

calculadas, para verificar alguns efeitos citostáticos devido ao tratamento das células A549 (Fenech, 2007). O IDN foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$IDN = \frac{M_1 + 2M_2 + 3M_3 + 4M_4}{500}$$

Onde $M_1 - M_4$ representam o número de células com 1 a 4 ou mais núcleos.

3.4 ANÁLISES QUÍMICAS

3.4.1 Compostos solúveis em água - Metais

Após a filtração, 10ml da amostra foram separados e acidificados com 20 μ L de ácido nítrico sub-ebulição (Destillacid, Berghof-Alemanha) para a determinação dos metais nos extratos hidrossolúveis de MP. As análises foram realizadas no laboratório do setor de Química Inorgânica da CETESB.

A quantificação dos metais hidrossolúveis (Ni, Ti, V, Zn, Mn, Co, Cr, Cu, Fe) presentes nas amostras de MP nos ensaios preliminares (Determinação da metodologia de extração de amostras hidrossolúveis), foi realizada utilizando um espectrômetro de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente (ICP-OES Spectro Modula S, Alemanha) de acordo com o método 610 da USEPA.

A quantificação química das amostras de material de referência SMR 1648a foi realizada por espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS Thermo Scientific Série X 2, Reino Unido), seguindo o método 6020 da USEPA. Os resultados foram expressos em mg/l e transformados a peso seco (mg/Kg) para facilitar a comparação com as concentrações definidas no material de referência.

Para as amostras de MP₁₀, os elementos mais abundantes nas amostras, Cu e Zn, foram determinados utilizando ICP-OES e os elementos traça Sc, Ti, Mn, Co, Ni, Cd, Sb, Pb, V, Cr, Fe, As e Se, foram quantificados por ICP-MS.

Uma célula de colisão para remover os íons interferentes foi empregada na determinação de V, Cr, As, Se e Fe. Padrões internos (9Be, 115In, 209Bi) foram adicionados só para

análise de elementos traço. Os limites de quantificação estabelecidos para a metodologia utilizada são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8: Limites de quantificação para os metais analisados nos extratos hidrossolúveis.

Elemento	Símbolo	ICP-MS	ICP-OES
		Limite de quantificação ($\mu\text{g/L}$)	Limite de quantificação ($\mu\text{g/L}$)
Escândio	Sc	0,20	-
Titânio	Ti	0,20	10,00
Vanádio	V	0,20	10,00
Cromo	Cr	0,20	20,00
Manganês	Mn	0,10	10,00
Ferro	Fe	2,00	50,00
Cobalto	Co	0,01	20,00
Níquel	Ni	0,10	10,00
Cobre	Cu	0,20	20,00
Zinco	Zn	0,20	10,00
Arsênio	As	0,20	-
Selênio	Se	0,10	-
Cádmio	Cd	0,005	-
Antimônio	Sb	0,01	-
Chumbo	Pb	0,05	50,00

3.4.2 Compostos orgânicos-HPA

3.4.2.1 Determinação dos Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HPAs) nas amostras de MP₁₀

A identificação e quantificação dos HPAs nos extratos orgânicos foi realizada no setor da Química Orgânica da CETESB usando um sistema de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com detector de fluorescência (Agilent Technologies 1200 series, Waldberonn-Baden Württemberg, Alemanha) de acordo como o método 8310 descrito pela USEPA.

A análise cromatográfica foi realizada a uma vazão de 0,5ml/min a 25°C e um volume de injeção de 10µl. A fase móvel foi composta por um gradiente preparado a partir de água e acetonitrila (50:50, v/v). A fluorescência dos HPAs foi controlada com um ajuste dos comprimentos de onda para cada composto, de acordo com seu tempo de retenção. A curva de calibração foi verificada periodicamente utilizando um padrão de verificação e foi aceito até 20% de desvio, empregando-se 1,1 Binaftil como padrão interno para determinar a eficiência de extração.

Os 16 HPAs determinados como prioritários pela USEPA (16HPAs), e seus respetivos limites de quantificação são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9: Características dos HPAs determinados nas amostras de MP₁₀ e seus limites de quantificação na metodologia utilizada para a análise.

Composto	Abreviação	Massa molar (g)*	Número de anéis benzênicos	Classificação IARC **	Limite de quantificação ($\mu\text{g/L}$)
Naftaleno	Naph	128,17	2	2B	30,0
Acenaftíleno	Ace	152,19	3	3	20,0
Acenafteno	Acp	154,21	3	3	20,0
Fluoreno	Flu	166,22	3	3	20,0
Fenantreno	Phe	178,23	3	3	20,0
Antraceno	Ant	178,23	3	3	20,0
Fluoranteno	Flt	202,25	4	3	20,0
Pireno	Pyr	202,25	4	3	20,0
Benzo(a)antraceno	BaA	228,29	4	2B	20,0
Criseno	Cry	228,29	4	2B	20,0
Benzo(b)fluoranteno	BbF	252,31	5	2B	20,0
Benzo(K)fluoranteno	BkF	252,31	5	2B	10,0
Benzo(a)pireno	BaP	252,31	5	1	10,0
Dibenzo(a,h)antraceno	DahA	278,35	5	2A	30,0
Benzo(g,h,i)períleno	BghiP	276,33	6	3	80,0
Indeno(1,2,3-cd)pireno	IP	276,33	6	2B	80,0

*Tobiszewski e Namieśnik, 2012

** Classificação IARC (International Agency for Research on Cancer): Grupo 1: cancerígeno para humanos; Grupo 2A: provavelmente cancerígeno para humanos, Grupo 2B: possivelmente cancerígeno para humanos; Grupo 3: não podem ser classificados com respeito ao seu potencial cancerígeno porque não se dispõe de informação suficiente.

3.4.2.2 Concentrações equivalentes de BaP

Uma avaliação do potencial carcinogênico e mutagênico dos HPAs foi realizada por meio do cálculo das concentrações carcinogênicas equivalentes (BaP-TEQ) e concentrações mutagênicas equivalentes (BaP-MEQ) ao benzo(a)pireno (BaP). Ambos equivalentes foram calculados multiplicando a concentração dos HPAs individuais presentes em cada amostra pelo fator de equivalência tóxica (TEF) (Nisbet e LaGoy, 1992) e pelo fator de equivalência mutagênica (MEF) (Durant et al., 1999, 1996). Os valores de BaP-TEQ e BaP-MEQ do total dos HPAs não voláteis ($\Sigma 8\text{HPA}$; MW ≥ 228) foram calculados como segue:

$$\begin{aligned}
 (\text{BaP} - \text{MEQ})_{\Sigma 8\text{HPA}} &= [\text{BaP}] \times 0,082 + [\text{Cry}] \times 0,017 + [\text{BbA}] \times 0,25 + [\text{BkA}] \times 0,11 + [\text{BaP}] \times 1 + [\text{IP}] \times 0,31 \\
 &\quad + [\text{DahA}] \times 0,29 + [\text{BghiP}] \times 0,19
 \end{aligned}$$

(BaP – TEQ)_{Σ8HPA}

$$\begin{aligned} &= [\text{BaP}] \times 0,1 + [\text{Cry}] \times 0,01 + [\text{BbA}] \times 0,1 + [\text{BkA}] \times 0,1 + [\text{BaP}] \times 1 + [\text{IP}] \times 0,1 \\ &+ [\text{DahA}] \times 5 + [\text{BghiP}] \times 0,01 \end{aligned}$$

3.5 ESTABILIDADE DA FRAÇÃO HIDROSSOLÚVEL DO MP

Com o objetivo de determinar a estabilidade química e biológica da fração hidrossolúvel do material particulado, dentro dos ensaios preliminares (Etapa 1), foi realizada uma extração assistida em micro-ondas com água ultrapura de um pool de 11 filtros de MP₁₀ de diferentes locais, escolhidos aleatoriamente. O extrato foi aliquotado em tubos de 50mL que foram congelados a -20°C até análise.

Em períodos que variaram de 0 (mesmo dia) a 109 dias após a extração, as alíquotas foram descongeladas para testar seu potencial mutagênico empregando-se o ensaio de *Salmonella*/microssoma - método direto. Da mesma forma, 10mL da mesma alíquota descongelada foram separados e acidificados com 20µL de ácido nítrico sob-ebulição para a determinação do conteúdo de elementos hidrossolúveis por ICP-MS.

3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Nos ensaios preliminares, o teste de Wilcoxon para amostras pareadas foi utilizado para comparar a resposta mutagênica dos diferentes métodos de extração (assistida por micro-ondas e banho de ultrassom). As concentrações dos metais obtidas em ambos métodos de extração foram também comparadas usando o teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Para comparar a eficiência dos métodos de extração com as amostras de material de referência (SRM 1648a) e o efeito do tempo de armazenamento dos extratos hidrossolúveis, um modelo geral linear foi ajustado aos dados transformados logaritmicamente. O teste de F-Fisher foi utilizado para comparar os resultados químicos obtidos pelas diferentes metodologias de extração com as amostras de SRM 1648a e os resultados nos ensaios da estabilidade da amostra da fração hidrossolúvel. O método de

Bonferroni de comparações múltiplas foi empregado para a análise dos dados da estabilidade da amostra.

Os resultados do teste de Ames foram analisados estatisticamente aplicando o modelo Bernstein (Bernstein et al., 1982) com o programa “Salanal”. As amostras foram consideradas positivas quando apresentaram: ANOVA significativa ($p<0.05$); razão de mutagenicidade (RM) $\geq 1,5$ e efeito dose-resposta significativamente positivo ($p\leq 0.05$). Os resultados foram expressos em revertentes por miligrama de MP (revertentes/mg) e transformados a revertentes por m^3 .

O número de revertentes obtidos no teste de Ames foi comparado entre locais e períodos de coleta por meio do teste de comparações múltiplas de Dunnett. Este método também foi utilizado para determinar diferenças significativas na frequência de MN entre as células tratadas e os controles negativos.

Para as associações entre concentração de poluentes no ar (MP₁₀, HPAs e metais hidrossolúveis totais) e a resposta mutagênica (revertentes/ m^3) foram usados modelos de regressão linear simples, incluindo cada linhagem como variável dependente e os parâmetros de poluição do ar como variáveis independentes.

O teste não-paramétrico de Spearman foi empregado para correlacionar os componentes químicos determinados nas frações orgânicas e solúvel em água com a resposta biológica.

Para comparar os resultados das análises químicas entre locais de amostragem e estações do ano utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. A associação entre variáveis químicas também foi avaliada usando a análise de componentes principais (PCA).

A média das diferenças e correlações foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Os softwares Statgraphics Centurion XVI, SPSS (versão 21) e R (R Core Team 2016) foram utilizados nas análises.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETERMINAÇÃO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO DA FRAÇÃO SOLÚVEL EM ÁGUA DO MATERIAL PARTICULADO (Etapa 1)

Esta etapa do trabalho foi publicada em:

PALACIO, I.C. et. al. Evaluating the mutagenicity of the water-soluble fraction of air particulate matter: A comparison of two extraction strategies. **Chemosphere**, v. 158, p. 124-130, set. 2016. (Anexo 1)

4.1.1 Validação do método de extração da fração solúvel em água.

As concentrações de Co, Cr, Fe, Mn, Ni, Pb, Ti, V e Zn foram determinadas em oito amostras de material particulado (PTS e MP₁₀) extraídas em micro-ondas e banho de ultrassom. A Tabela 10 apresenta os resultados dos metais analisados. As concentrações dos elementos quantificados nas amostras branco estavam abaixo do limite de quantificação.

Tabela 10: Concentração* dos metais (ng/m³) determinados por ICP-OES nos extratos hidrossolúveis de TPS e MP₁₀ extraídos com a metodologia assistida por micro-ondas e banho de ultrassom.

Metais	Método de extração																
	Assistido por micro-ondas							Banho de ultrassom									
	Amostra	PTS-1	PTS-2	PTS-3	PTS-4	MP ₁₀ -1	MP ₁₀ -2	MP ₁₀ -3	MP ₁₀ -4	PTS-1	PTS-2	PTS-3	PTS-4	MP ₁₀ -1	MP ₁₀ -2	MP ₁₀ -3	MP ₁₀ -4
Níquel	<LQ	4,32	<LQ	<LQ	<LQ	2,19	<LQ	<LQ	<LQ	2,18	5,76	2,21	2,42	<LQ	4,20	<LQ	<LQ
Cobre	23,27	19,11	3,55	36,48	5,95	4,33	2,28	5,11	49,80	24,30	6,22	76,67	18,09	12,83	5,87	13,12	
Zinco	2,42	18,95	1,54	1,97	<LD	<LD	<LD	<LD	8,09	67,64	<LD	2,56	<LD	<LQ	<LD	<LD	
Ferro	<LQ	15,50	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	12,38	40,59	<LQ	10,40	<LQ	15,13	<LQ	<LQ	
Manganês	<LQ	3,28	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	4,31	123,6	<LQ	1,36	<LQ	1,65	<LQ	<LQ	
Vanádio	5,58	12,51	6,64	13,37	2,81	19,80	2,23	2,84	3,59	7,96	5,73	10,79	2,00	18,41	1,64	2,48	
Crômio	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
Chumbo	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LD	<LQ	<LQ	<LQ	
Cobalto	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	
Titânio	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	

*Concentração média de três leituras independentes

<LQ= Abaixo do limite de quantificação

<LD= Abaixo do limite de detecção

As concentrações de Cr, Co e Ti estavam abaixo do limite de quantificação em todas as amostras analisadas. O Pb não foi detectado em nenhuma das amostras, possivelmente porque este metal está associado principalmente com a fração fina do MP ($MP_{2,5}$) (Lemos et al., 2012; Wojas e Almquist, 2007).

Em todos os extratos analisados, somente as concentrações de Cu e V excederam os limites de quantificação de ICP-OES, independentemente do método de extração. Como se observa na Tabela 10, a concentração de V nas amostras extraídas utilizando a técnica assistida por micro-ondas variou entre 2,23 ng/m³ na amostra MP_{10-3} e 19,80 ng/m³ na amostra MP_{10-2} . Para as amostras extraídas com banho ultrassom, a concentração de V oscilou entre 1,64 e 18,41 ng/m³.

As concentrações de V apresentaram valores entre 7 a 37% mais elevados nas amostras extraídas com o método assistido por micro-ondas comparado com as amostras extraídas em banho de ultrassom. Por outro lado, as concentrações de Cu nas amostras extraídas com banho de ultrassom foram maiores que os extraídos com o uso de micro-ondas. Apesar destes resultados, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas nas concentrações de V e Cu entre as duas metodologias de extração ($p=0,645$).

Vários estudos confirmam a elevada solubilidade de V e Cu em amostras de MP. Ao medir as concentrações de metais da fração solúvel de MP_{10} coletadas na cidade de Edimburgo, Heal et al. (2005) encontraram que a fração solúvel em água de V era superior a 50% da concentração total de V e que o Cu solúvel era entre 35–45% do total encontrado para este metal nas amostras analisadas. Resultados semelhantes foram obtidos por Kyotani e Iwatsuki (2002) em Kofu, Gutiérrez-Castillo et al. (2006) na Cidade do México e Jiang et al. (2014) em Hong Kong. Estes autores também relataram uma baixa solubilidade do Ti e Cr. As diferenças na solubilidade dos elementos individuais podem ser devidas às diferentes espécies químicas do metal, o tamanho das partículas ou às diferentes fontes de emissão (Desboeufs et al., 2005).

Todas as amostras testadas, tanto de PTS como MP_{10} , foram capazes de induzir uma resposta mutagênica na linhagem TA98 de *S. Typhimurium* sem ativação metabólica (-S9), com potências que variaram de 6,9 a 33×10^3 rev/grama. Uma resposta similar foi obtida

para as amostras testadas com TA98 com ativação metabólica (+S9), com uma variação de 6,2 a 23×10^3 rev/grama, e em apenas uma amostra (PTS-3) não se detectou atividade mutagênica (Tabela 11). Resultados positivos com a linhagem TA100 na presença de ativação metabólica foram observados em três amostras extraídas usando micro-ondas e banho de ultrassom. Na ausência de ativação metabólica, três amostras extraídas com micro-ondas foram mutagênicas e nenhuma apresentou mutagenicidade detectável com banho de ultrassom (Tabela 11). Os resultados indicam que substâncias que causam mutações “frameshift” são as principais responsáveis pelos danos ao DNA observados nos extratos de MP nos ensaios preliminares.

Tabela 11: Resultados do ensaio de *Salmonella*/microssoma dos extratos solúveis de MP das amostras preliminares.

Amostra	Revertentes x $10^3/g$							
	Assistida por micro-ondas				Banho de ultrassom			
	TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9	TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
PTS 1	6,9	8,2	13	19	7,4	2,3	ND	8,4
PTS 2	20	19	35	52	7,9	8,6	ND	20
PTS 3	15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PTS 4	12	6,2	10	17	4,7	4,7	ND	16
MP₁₀-1	10	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MP₁₀-2	14	23	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MP₁₀-3	10	18	ND	ND	ND	ND	ND	ND
MP₁₀-4	9,6	22	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND= Mutagenicidade não detectada nas condições do ensaio.

Foram encontradas diferenças na mutagenicidade nos dois métodos de extração utilizados. Enquanto que com a linhagem TA98 de *Salmonella Typhimurium* se detectou atividade mutagênica em todas as amostras extraídas pelo método assistido por micro-ondas, só três amostras extraídas com banho de ultrassom foram positivas (Figura 6).

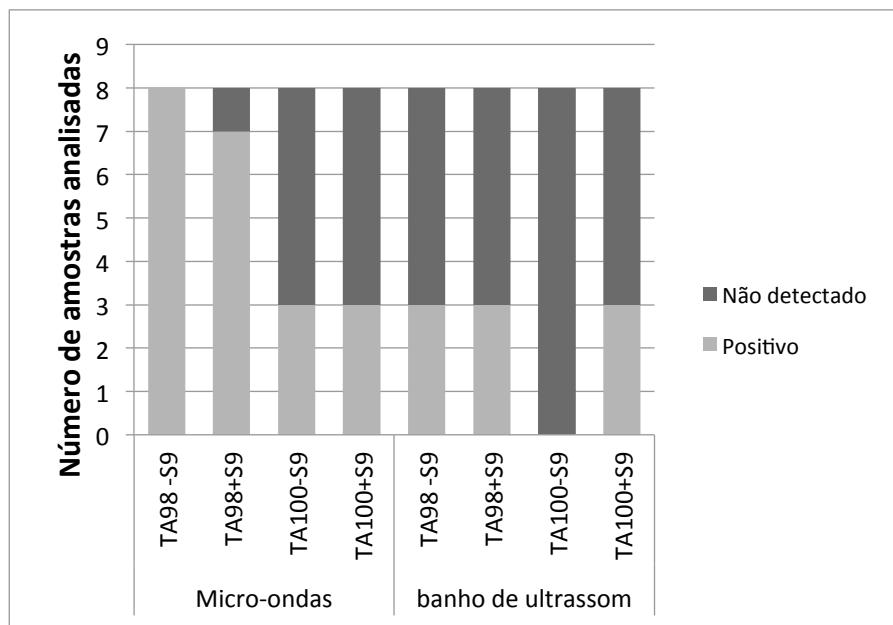


Figura 6: Número de amostras positivas e não detectáveis para mutagenicidade em cada método de extração - Ensaios preliminares (Etapa 1).

Os resultados do teste de Wilcoxon indicaram que a resposta mutagênica foi estatisticamente diferente entre os dois métodos de extração com a linhagem TA98 com e sem ativação metabólica, mas não se encontraram diferenças significativas ao comparar os resultados da linhagem TA100 (Tabela 12). As diferenças nos resultados das análises químicas, por outro lado, não foram conclusivas. No entanto, a resposta biológica obtida sugere que a extração assistida por micro-ondas para a fração hidrossolúvel do MP atmosférico pode ser uma metodologia mais eficiente que a extração com banho de ultrassom. Esta resposta poderia ser devido a pressurização exercida pelo micro-ondas, promovendo a maior solubilização de alguns dos elementos. Estes resultados confirmam a importância de estudar e melhorar as técnicas de extração de amostras para análises de mutagenicidade, para prevenir a interpretação de resultados “falsos negativos”.

Tabela 12: Resultados do teste de Wilcoxon da resposta mutagênica nas amostras preliminares.

Linhagem	Análise estatística – teste Wilcoxon (Z)	P
TA98-S9	-2,383	0,017
TA98+S9	-2,2366	0,018
TA100-S9	-1,604	0,109
TA100+S9	-1,604	0,109

Dado que a comparação nos métodos de extração mostrou diferenças na atividade mutagênica, mas não nas concentrações dos metais, uma análise baseada exclusivamente na composição química não seria suficiente para determinar o método de extração mais adequado na detecção de contaminantes mutagênicos e o uso de bioensaios é necessário na busca de metodologias apropriadas para a extração de substâncias com potencial mutagênico em amostras ambientais (Silva Jr. et al., 2009).

A maioria das pesquisas sobre a poluição do ar e suas fontes são baseadas em análises físico-químicas. Vários autores têm relatado a presença de metais no MP em diferentes regiões ao redor do mundo (Liu et al., 2015; Loyola et al., 2006; Manalis et al., 2005; Mukhtar e Limbeck, 2013; Samara e Voutsas, 2005; Zereini et al., 2005), mas, como discutido anteriormente, o conteúdo de metais totais em amostras ambientais contaminadas é um indicador pobre de sua biodisponibilidade, mobilidade ou toxicidade (Arain et al., 2008). O potencial genotóxico do MP avaliado exclusivamente por análise química apresenta limitações, já que este tipo de análise não pode prever efeitos biológicos, ações sinérgicas ou antagonistas em misturas complexas (White e Claxton, 2004).

De maneira geral, componentes metálicos do MP com elevada solubilidade podem ser mais facilmente bio-ativados e, portanto, poderiam representar um risco potencial maior para os seres humanos (Qureshi et al., 2006). Com o objetivo de determinar a fração biodisponível de elementos traço, amostras de MP são muitas vezes extraídas com um tampão de solução salina ou citrato de potássio. No entanto, estas soluções podem introduzir interferência em alguns métodos de detecção, e produzir resultados de brancos inaceitáveis (Karthikeyan et al., 2006). Portanto, a água foi escolhida como um solvente adequado para a determinação dos metais solúveis neste trabalho.

Com objetivo de investigar os mecanismos pelos quais o MP induz dano oxidativo ao DNA, amostras de PTS de Duisburg (Alemanha) foram extraídas com agua deionizada, em vortex por 5 minutos e sonicação (60W, 35 KHz) por 5 minutos a temperatura ambiente (Knaapen et al., 2002). Esta mesma metodologia foi usada para descrever o efeito tóxico de metais solúveis de MP em três cidades diferentes de Alemanha (Shi et al., 2003). Ambos autores mostraram como a fração solúvel contribui com o risco genotóxico do MP.

Embora uma correlação estatisticamente significativa entre as concentrações de metais solúveis e a resposta biológica avaliada não foi encontrada com os dados disponíveis (vários dos metais analisados apresentaram resultados abaixo do limite de quantificação), os compostos solúveis em água presentes nas amostras estudadas poderiam ser responsáveis pela atividade mutagênica observada.

A resposta inflamatória aguda em camundongos expostos a MP de diferentes fontes foi diretamente relacionada ao conteúdo de metais e sua solubilidade em água (Costa e Dreher, 1997). Frampton et al. (1999) demonstraram por estudos *in vitro* com amostras de MP₁₀ coletadas em Utah Valley a importância da concentração da fração solúvel de metais de transição na resposta citotóxica e o potencial pró-inflamatório. Por meio do teste do cometa, Gutiérrez-Castillo et al. (2006) confirmaram que as frações solúveis de MP₁₀ e MP_{2,5} coletadas na Cidade do México tiveram uma capacidade maior de induzir danos no DNA de células alveolares A549 que os extratos orgânicos das mesmas amostras.

Tem sido demonstrado que diferentes processos de extração de uma mesma amostra de MP atmosférico podem gerar diferentes respostas de mutagenicidade (Buschini et al., 2001). A ausência de atividade mutagênica nos extratos obtidos por banho de ultrassom, como se apresenta na Tabela 11, pode estar relacionada com a eficiência do processo de extração. O banho de ultrassom tem sido amplamente utilizado para a extração de mutágenos orgânicos nas amostras MP (Alves et al., 2014; Carreras et al., 2013). No entanto, de acordo com os nossos resultados, este método não parece ter a mesma eficiência na extração de compostos solúveis em água.

A eficiência do processo de extração das metodologias testadas foi avaliada usando o material de referência NIST 1648a. Seis amostras de 10 mg de material de referência

foram usadas para cada metodologia de extração. Embora seja recomendado o uso de 100 mg de material de referência para a validação do método, uma amostra menor (5-10 mg) tem sido relatada como satisfatória para a reproduzibilidade dos dados analíticos (Karthikeyan et al., 2006). Os resultados dos 13 elementos determinados nos extratos hidrossolúveis de NIST 1648a e sua porcentagem de recuperação são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Valores em peso seco (mg/Kg) para os elementos extraídos pelo método assistido por micro-ondas e banho de ultrassom do material de referência NIST 1648a e a recuperação (%). Média de seis experimentos independentes.

Elemento	NIST 1648a*	Assistido por micro-ondas					Banho de ultrasonido				
		Média	DP	Min	Max	Rec	Média	DP	Min	Max	Rec
V	127	54,01	3,87	47,93	59,58	42,53	43,26	3,10	38,67	47,48	34,06
Cr	402	7,78	0,57	7,12	8,62	1,93	7,60	1,44	5,93	9,89	1,89
Zn	4800	3124,80	307,66	2808,00	3624,00	65,10	2529,00	237,01	2137,50	2853,00	52,69
As	115,5	74,09	4,57	67,25	80,74	64,15	54,04	4,70	48,12	60,86	46,79
Se**	-	18,13	1,04	16,98	19,92	-	14,57	1,74	12,63	17,03	-
Ti	4021	6,19	0,50	5,47	6,78	0,15	15,33	8,76	6,25	30,75	0,38
Mn	790	266,64	16,90	252,30	286,50	33,75	235,15	13,36	208,20	244,50	29,77
Fe	3,92%	204,62	39,60	166,20	268,95	47,22	417,48	216,48	200,40	810,45	67,40
Co	17,93	4,49	0,18	4,27	4,75	25,07	4,04	0,21	3,66	4,26	22,51
Ni	81,1	25,53	0,85	24,41	26,58	31,48	24,28	1,57	21,50	25,83	29,93
Cu	619	162,78	24,46	144,23	205,05	26,30	118,54	10,14	102,87	133,74	19,15
Cd	73,7	28,59	5,07	24,92	37,29	38,80	22,38	2,86	17,69	26,61	30,37
Sb	45,4	11,14	0,60	10,11	11,58	24,54	7,23	0,84	6,42	8,39	15,94

** O valor de Se não está certificado no material de referência NIST 1648a, mas foi avaliado para ambos métodos de extração.

* Valores certificados de NIST 1648a em mg/kg, a menos que seja indicado como %

DP – Desvio padrão, Min – valor mínimo, Max – valor máximo, Rec – recuperação

Os dados foram logaritmicamente transformados com o propósito de reduzir a variação da escala e heterocedasticidade (Sokal e Rohlf, 2012). O teste de F-Fisher mostrou uma interação significativa entre os métodos de extração e a concentração dos elementos (Tabela 14), assim foi realizada uma análise de coeficientes estimados para as interações do modelo final ajustado (Tabela 15).

Tabela 14: Resultado do teste F-Fisher do ajuste do Modelo Linear Geral Univariado (MLGU) dos dados transformados.

Fonte		Soma dos quadrados	g.l	Quadrado médio	F	p
Elemento	Fator	2666,807	13	205,139	547,763	<0,001
	Erro	4,869	13	0,375		
Método*Elemento	Fator	4,869	13	0,375	12,313	<0,001
	Erro	3,893	128	0,030		

g.l: graus de liberdade

De maneira geral, o método de extração assistido por micro-ondas apresenta medias equivalentes ou maiores às observadas no banho de ultrassom (Tabela 15). Para Cr, Mn, Co e Ni não se observaram diferenças significativas entre as duas metodologias de extração com o número de amostras disponíveis, e somente as concentrações médias de Fe e Ti foram maiores na extração com banho de ultrassom. Quando compararmos os resultados obtidos nos extratos aquosos com os relatados no material de referência NIST 1648a, observamos que para a maioria dos elementos quantificados a porcentagem de recuperação foi maior nas amostras extraídas com a técnica assistida por micro-ondas (Tabela 13).

Tabela 15: Coeficiente estimado para a interação elemento-método e sua significância.

Elemento	P	Conclusão	Diferença (%)
V	0.029	MW>US	5.7
Cr	0,722	MW=US	NS
Zn	0,038	MW>US	2.7
As	0,002	MW>US	7.6
Se	0,029	MW>US	8.0
Ti	<0,001	MW<US	-3.3
Mn	0,237	MW=US	NS
Fe	<0,001	MW<US	-11,2
Co	0,285	MW=US	NS
Ni	0,624	MW=US	NS
Cu	0,002	MW>US	6.3
Cd	0,019	MW>US	7.5
Sb	<0,001	MW>US	19.9

NS: Não significativo

MW: Assistido por micro-ondas – US: Banho de ultrassom

A recuperação, entretanto, é subestimada, dado que o material de referência não proporciona informação sobre a solubilidade em água dos elementos analisados. Uma proporção significativa (24–47 %) de Sb, V, Mn, Fe, Ni, Cd e Cu foi determinada na fração hidrossolúvel nas amostras extraídas com o método assistido por micro-ondas. Uma baixa solubilidade (2 %) foi observada para Cr e Ti. Ao contrário, um alto nível de solubilidade foi verificado para As (64,15 %) e Zn (65,10 %). Nas amostras extraídas com banho de ultrassom, a solubilidade dos elementos variou de 0,38 % (Ti) a 67,40 % (Fe).

As porcentagens de recuperação obtidas em nossas amostras podem ser comparadas com as relatadas por Karthikeyan et al. (2006) para material de referência extraído com micro-ondas e estão acima das determinadas por Heal et al. (2005) para material de referência extraído por ultrasonicação.

Karthikeyan et al. (2006) compararam a extração de metais traço hidrossolúveis de amostras de poeira urbana e material de referência de material particulado urbano pelas duas técnicas e mostraram que apresentavam um comportamento semelhante. Canepari et al. (2005) avaliaram a extração assistida por micro-ondas e a extração com ultrassom para determinar as concentrações de Cd, Cr, Ni, Pb, Zn, Cu, Al, As, Co, Fe, Mg e Mn em sedimentos. A metodologia assistida por micro-ondas apresentou recuperações maiores para todos os elementos em comparação aos resultados da extração com ultrasonicação.

Sathrugnan e Balasubramanian (2005) constataram que a técnica assistida por micro-ondas era uma alternativa adequada e precisa comparada com a extração convencional de partículas atmosféricas por ultrassom.

O uso de extração com banho de ultrassom tem sido recomendado como um método de triagem, porque é uma alternativa rápida e de baixo custo de preparar amostras para análises químicas e biológicas (Krug, 2008). De acordo com Capelo et al. (2005) os resultados mais contraditórios relatados na literatura sobre o uso de ultrasonicação na preparação de amostras estão relacionados com o banho de ultrassom, uma vez que a força e o perfil de distribuição da energia do ultrassom podem variar de acordo com o fabricante, o que pode produzir resultados contraditórios entre diferentes laboratórios.

Chen et al. (2008) relataram que a extração assistida por micro-ondas não só proporciona resultados satisfatórios, mas permite a automatização completa ou parcial do processo analítico, reduzindo o tempo de análise. Portanto, estudos em diferentes locais podem ser comparados com mais precisão, facilitando a identificação de compostos que são potencialmente mutagênicos e a determinação dos fatores ambientais que aumentam ou diminuem a mutagenicidade. Isto é essencial para o desenvolvimento de estratégias efetivas para evitar os efeitos negativos sobre a saúde humana e o ambiente.

4.1.2 Estabilidade da fração hidrossolúvel do MP

O efeito do armazenamento e congelamento dos extratos na resposta mutagênica e na concentração de 15 elementos da fração hidrossolúvel de uma amostra de MP₁₀ também foi analisado. Devido ao fato de que muitas amostras não podem ser testadas imediatamente após a extração é importante verificar e conhecer a estabilidade do extrato.

As Tabelas 16 e 19 mostram os resultados das concentrações dos componentes solúveis que foram determinados e a atividade mutagênica depois de serem armazenados a -20°C por diferentes períodos de tempo.

Tabela 16: Concentração dos elementos hidrossolúveis ($\mu\text{g/L}$) de uma amostra de MP_{10} armazenada a -20°C por diferentes períodos de tempo.

Dias após extração	Metais hidrossolúveis								
	Fe	Co	Ni	Cu	Cd	Pb	V	Cr	Zn
0	160,70	1,94	12,87	121,80	0,28	1,10	297,10	38,29	12,51
46	102,70	1,87	11,67	118,50	0,26	0,88	298,70	37,42	19,18
64	102,60	1,89	11,79	119,10	0,23	0,86	276,70	34,93	14,19
88	145,70	2,46	13,47	123,70	0,36	1,99	271,30	35,92	17,29
109	112,60	1,85	11,40	116,70	0,26	0,84	258,50	33,29	12,11
Média	124,86	2,0	12,24	120,0	0,28	1,13	280,46	36,0	15,05
DP	26,72	0,26	0,88	2,77	0,05	0,49	17,24	1,98	3,08
Coeficiente de variação (%)	21,40	13,02	7,24	2,31	17,35	43,12	6,15	5,52	20,44

DP: Desvio padrão

Diferenças significativas foram encontradas entre a concentração média dos elementos analisados devido ao tempo de congelamento ($p<0,001$). (Tabela 17)

Tabela 17: Anova do ajuste do Modelo Linear Geral Univariado para Medidas Repetidas (MLGUMR).

Efeito	Lambda de Wilks	gl hipótese	gl erro	F	p
Dias de congelamento	0,045	4	6	31,387	<0,001

Os resultados obtidos no dia 88 após a extração para Fe, Co, Ni, Cu, Pb e Zn são, em geral, maiores que as concentrações determinadas nas outras três análises, devido possivelmente a um erro analítico ou problemas de contaminação. No entanto, o teste de Bonferroni (Tabela 18) evidenciou que, após 64 dias de congelamento, existem diferenças significativas em relação às concentrações obtidas no dia em que a extração foi realizada.

Tabela 18: Resultado do teste de Bonferroni para comparação de medias em função do tempo dos extratos hidrossolúveis.

Dias após extração	Diferença média (I-J)	Desvio padrão	p
Dia extração	46	0,622	0,415
	64	1,195	0,248
	88	-0,289	0,371
	109	1,403	0,246

De acordo com a reta indicativa da tendência de decréscimo das concentrações médias, em termos percentuais e independentemente do metal individual, verificou-se uma diminuição de 2,1% a cada 10 dias de congelamento (Figura 7).

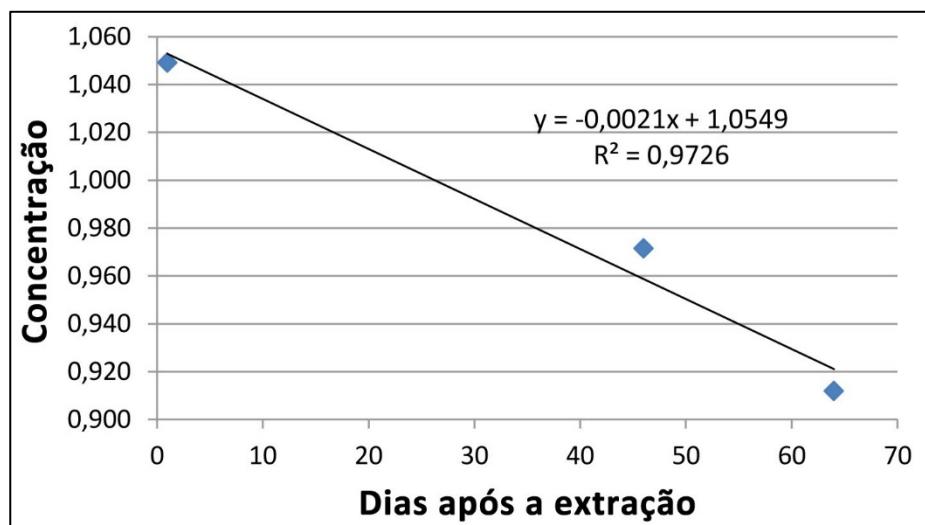


Figura 7: Tendência de decréscimo nas concentrações dos metais hidrossolúveis em função do tempo de congelamento após extração em micro-ondas.

Embora não se tenham disponíveis dados suficientes dos resultados biológicos para a realização de análises estatísticas, o teste de Ames sugere que um período de dois meses é adequado para a estabilidade da amostra (Tabela 19), apresentando uma resposta mutagênica em todos os períodos testados com a linhagem TA98±S9 e ausência de atividade biológica com a linhagem TA100± S9.

Tabela 19: Atividade mutagênica ($\text{rev/g} \times 10^3$) do extrato hidrossolúvel armazenado a -20°C por diferentes períodos de tempo.

Dias de armazenamento e congelamento do extrato	Atividade mutagênica			
	TA98-S9	TA98+S9	TA100-S9	TA100+S9
0	7,7	7,7	ND	ND
46	9,0	6,9	ND	ND
64	16,2	7,7	ND	ND
88	12,7	12,2	ND	ND
109	8,7	4,9	ND	ND

ND: Atividade mutagênica não detectada nas condições do ensaio

A estabilidade das espécies químicas nas amostras ambientais é um fator crítico durante o armazenamento devido a processos de degradação ou interação entre os elementos químicos, que podem prejudicar significativamente a qualidade dos resultados no monitoramento ambiental (Gómez Ariza et al., 2000). A preservação e estabilidade de elementos entre a amostragem e as análises é uma tarefa difícil e pode ser influenciada por fatores tais como pH da amostra, temperatura e luz do local de armazenagem.

O grande número de amostras de MP analisadas hoje em dia pelos órgãos de controle ambiental no mundo todo, faz com que o armazenamento de amostras seja um passo essencial no monitoramento ambiental, permitindo aos laboratórios aumentar a sua capacidade analítica.

4.2 ETAPA 2- AVALIAÇÃO DE AMOSTRAS DE MATERIAL PARTICULADO DE AR COLETADAS EM TRÊS LOCAIS DO ESTADO DE SÃO PAULO

4.2.1 AMOSTRAS DE MP₁₀

Nos últimos anos, tem aumentado o número de investigações que apontam para compreender a relação entre a composição química do MP e os seus efeitos toxicológicos. A maioria dos estudos de genotoxicidade do MP tem avaliado a fração orgânica, um número menor de investigações tem determinado o efeito genotóxico causado pela fração solúvel em água e os metais de transição e poucos estudos avaliaram simultaneamente o papel de diferentes espécies químicas nos danos ao DNA em células de mamíferos (Gutiérrez-Castillo et al., 2006) e no ensaio de Ames (Lemos et al., 2012).

As informações das amostras de MP₁₀ coletadas em L1, L2 e L3 estão apresentadas na Tabela 5. O volume de ar, massa e concentração de material particulado variaram dependendo do local e da época de amostragem, assim como dos diferentes locais de emissão. As concentrações de MP₁₀ no L1 variaram de 39,9 µg/m³ no outono a 44,9 µg/m³ no verão. No L2, a concentração maior (49 µg/m³) foi determinada no verão e a menor (33,5 µg/m³) no outono e em L3 determinaram-se os maiores valores das concentrações de MP₁₀ no verão (64,6 µg/m³) e no inverno (110,1 µg/m³). É importante ressaltar que as concentrações de MP₁₀ em L1 e L2 se encontravam por baixo do valor recomendado pela Organização Mundial da Saúde (150 µg/m³) (WHO, 2006) e nenhuma das amostras excedeu o limite estabelecido pela legislação do Estado de São Paulo para amostras de MP₁₀ (120µg/m³) em 24 horas (São Paulo (Estado), 2013).

4.2.2 ANÁLISES QUÍMICAS

4.2.2.1 Compostos orgânicos - HPAs

Na tabela 20 são apresentadas as concentrações dos 16 HPAs considerados prioritários pela USEPA determinados nas 12 amostras de MP₁₀. Vários autores têm relatado concentrações mais altas de HPAs nas épocas mais frias do ano, particularmente maiores no inverno que no verão e na primavera (Jyethi et al., 2014; Lemos et al., 2012; Rehwagen et al., 2005; Schilirò et al., 2010). A fotodegradação e transformação química devido às

altas temperaturas e radiação solar nos meses mais quentes do ano podem ser um fator determinante nas concentrações dos compostos orgânicos presentes nas amostras e provavelmente desempenham um papel mais importante na residência destes contaminantes na atmosfera que as concentrações de MP₁₀.

A concentração total dos HPAs no inverno em L1 e L2 (3,36 e 5,31 ng/m³) foi quase o dobro da determinada no verão (1,84 e 3,22 ng/m³, respectivamente) e quatro vezes maior que a determinada no verão em L3 (Figura 8).

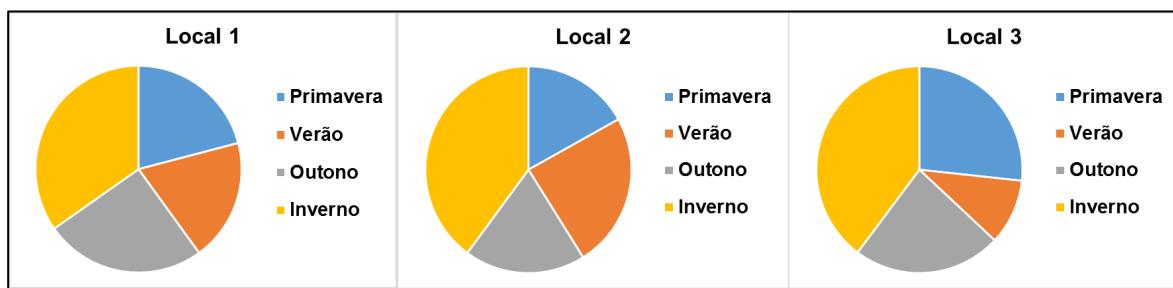


Figura 8: Concentrações dos HPAs nos extratos orgânicos coletados nos Locais 1,2 e 3 nas diferentes estações climáticas.

Tabela 20: Concentrações (ng/m³) dos 16 HPAs quantificados nos extratos orgânicos coletados em três locais diferentes do Estado de São Paulo, Brasil.

HPA	Nº Anéis	Grupo IARC	Local 1				Local 2				Local 3			
			Primavera	Verão	Outono	Inverno	Primavera	Verão	Outono	Inverno	Primavera	Verão	Outono	
Naph	2	2B	0,03	<LQ	0,03	0,05	0,03	<LQ	<LQ	0,03	0,08	<LQ	0,04	0,07
Ace	3	3	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Acp	3	3	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Flu	3	3	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,02	<LQ	<LQ	<LQ
Phe	3	3	0,10	0,08	0,08	0,15	0,06	0,11	0,07	0,13	0,20	0,04	0,13	0,19
Ant	3	3	<LQ	<LQ	0,02	0,03	<LQ	<LQ	<LQ	0,03	0,03	<LQ	<LQ	0,03
Flt	4	3	0,65	0,80	0,67	0,97	0,50	<LQ	0,37	1,39	0,70	0,39	0,49	0,76
Pyr	4	3	0,19	0,16	0,22	0,28	0,12	0,21	0,12	0,22	0,23	0,08	0,19	0,33
BaA	4	2B	0,14	0,10	0,15	0,19	0,11	0,16	0,11	0,22	0,12	0,05	0,13	0,19
Cry	4	2B	0,21	0,12	0,24	0,25	0,13	0,17	0,13	0,25	0,18	0,07	0,18	0,26
BbF	5	2B	0,15	0,15	0,30	0,37	0,29	0,43	0,36	0,70	0,40	0,12	0,37	0,62
BkF	5	2B	0,11	0,07	0,13	0,17	0,15	0,24	0,17	0,32	0,17	0,06	0,16	0,27
BaP	5	1	0,16	0,08	0,21	0,31	0,23	0,36	0,27	0,54	0,27	0,08	0,26	0,47
DahA	5	2A	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	0,03	0,04	0,04	0,06	<LQ	<LQ	<LQ	0,04
BghiP	6	3	0,20	0,17	0,22	0,34	0,38	0,77	0,44	0,85	0,44	0,18	0,40	0,70
IP	6	2B	0,09	0,12	0,16	0,25	0,21	0,72	0,44	0,57	0,22	0,11	0,31	0,61
Total			2,03	1,85	2,45	3,37	2,25	3,22	2,53	5,31	3,05	1,17	2,66	4,54

<LQ - Abaixo do limite de quantificação

As altas concentrações de HPAs no inverno são normalmente atribuídas a uma menor dispersão de poluentes devido às condições climáticas (Carreras et al., 2013). Durante os meses mais frios do ano, a baixa velocidade do vento, as condições de inversão térmica e as baixas temperaturas tornam a atmosfera mais estável, o que leva a uma menor dispersão de poluentes e ao maior acúmulo de HPAs (Sharma et al., 2007). Por outro lado, durante o verão, as chuvas e uma maior velocidade dos ventos diminuem as concentrações de HPAs na atmosfera. Enquanto que os resultados de L3 apresentam uma relação significativa ($R^2 = 0,95$) entre a concentração total de MP₁₀ e HPAs, e a relação entre estes dois componentes em L1 e L2 foi muito baixa ($R^2 < 0,3$). Não se encontraram diferenças estatisticamente significativas na concentração total dos HPAs entre as estações ($p = 0,082$), ou locais de amostragem ($p = 0,55$) (Tabela 21).

Tabela 21: Resultado do teste de Kruskal-Wallis para comparação das concentrações de HPAs nas diferentes estações climáticas e locais de amostragem.

HPA	Estação climática	Amplitude média	Local	Amplitude média
	Primavera	5,00	L1	5,00
	Verão	4,00	L2	7,75
	Outono	6,00	L3	6,75
	Inverno	11,00		
Qui-quadrado		6,692		1,192
g.l		3		2
p		0,82		0,55

g.l: graus de liberdade

Ao contrário das baixas concentrações relatadas por Bełcik et al. (2014), Du Four et al. (2005) e Tavares et al. (2004) para HPAs com mais de 4 anéis em amostras de MP atmosférico, HPAs de elevado peso molecular são encontrados principalmente associados ao MP. Este grupo de HPAs inclui todas as espécies prováveis ou possivelmente carcinogênicas para humanos de acordo com a IARC (Tabela 20), e representou entre 90-97% do total de HPAs determinados nos extratos orgânicos de MP₁₀ (Figura 9). A baixa abundância relativa (<10%) dos HPAs com baixo peso molecular (2-3 anéis) nas amostras analisadas pode ser o resultado da natureza volátil de estes compostos (Zhang et al., 2015). Em geral, um tempo prolongado de amostragem é necessário para detectar HPAs atmosféricos. Longos períodos de exposição das partículas nos filtros podem mudar sua composição química, volatilizando ou transformando fotoquimicamente os compostos

orgânicos, o que pode levar a subestimar as concentrações de HPAs nas amostras de MP (De Martinis et al., 2002).

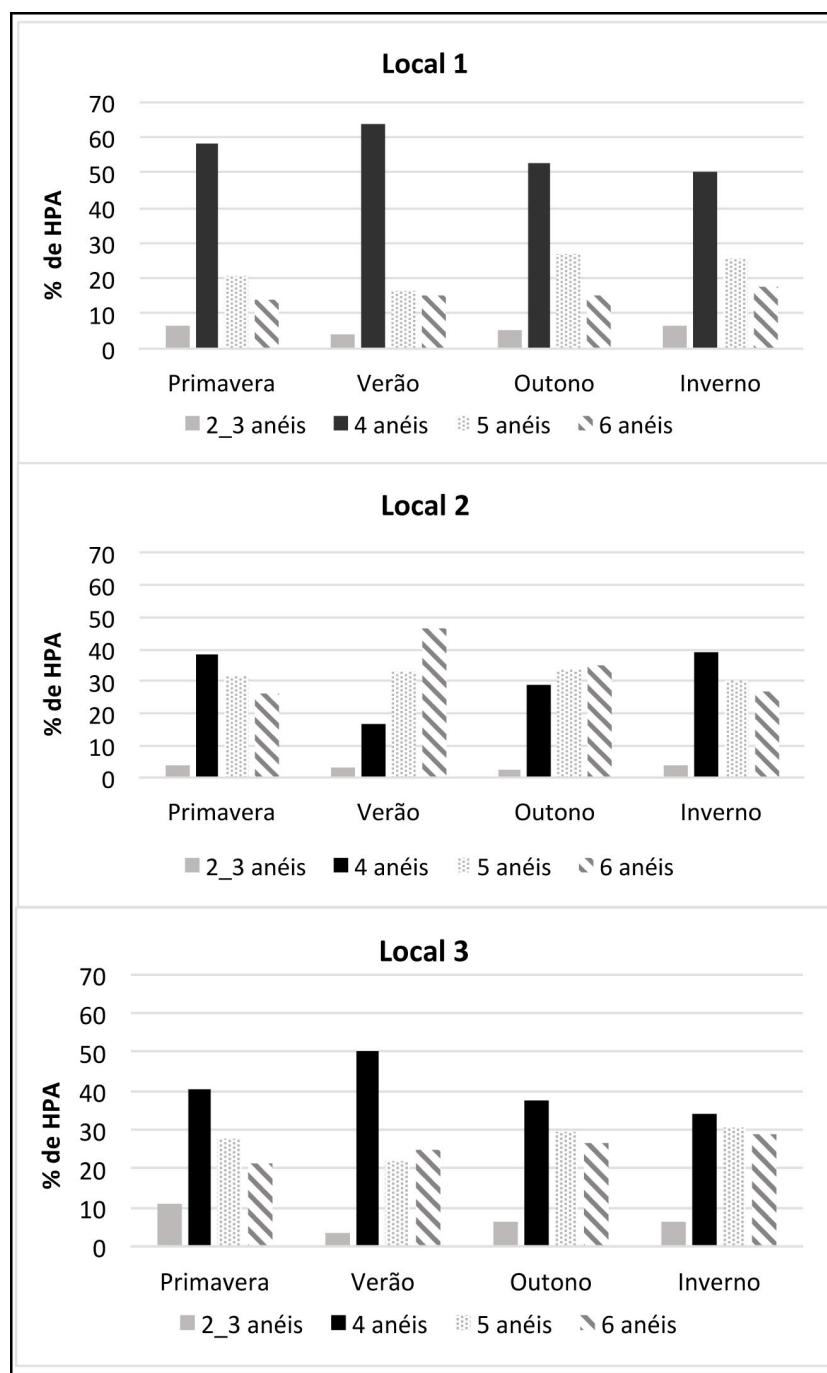


Figura 9: Abundância relativa dos HPAs nas amostras de MP_{10} nos três locais de coleta. A abundância é apresentada como a soma dos compostos individuais, de acordo com o número de anéis aromáticos.

Os HPAs associados com o MP variam significativamente dependendo das fontes de emissão (Rehwagen et al., 2005) e as razões das concentrações de vários HPAs têm sido usadas com o objetivo de deduzir a possível origem ambiental dos HPAs (Khan et al., 2015; Pereira et al., 2013) (Tabela 22).

Tabela 22: Razões das concentrações dos HPAs relatadas na literatura para as diferentes fontes de emissão.

Razões de HPA	Emissões de gasolina	Emissões de diesel	Tráfego veicular	Combustão de madeira
BaA/BaP	0,5 ^a	1,1 ^a		1,0 ^a
BaA/Cry	0,28 - 1,2 ^b	0,17 - 0,36 ^b	0,63 ^b 0,40 - 0,58 ^c	0,95 ^b 0,95 ^d
IP/BghiP	0,42 - 0,47 ^f	0,97 ^d 0,73-1,0 ^f	0,39 ^e 0,36 - 0,39 ^c	
BghiP/IP	3,5 - 3,8 ^g	1,1 - 1,2 ^g	0,94 ^d 0,9 ^h	0,8 ^h
BaP/BghiP	1,25 ⁱ	0,9 ^h 0,2-0,6 ^j 0,3 - 0,4 ^b	0,25 ^d 1,3 ^k 0,4 ^l	0,25 ^d

^aLi e Kamens, 1993; ^b Simcik et al., 1999; ^cVasconcellos et al., 2003; ^dBourotte et al., 2005; ^eValerio e Pala, 1991; ^fCaricchia et al., 1999; ^gRehwagen et al., 2005; ^hDe Martinis et al., 2002; ⁱMasclet et al., 1987; ^jBarale et al., 1991; ^kLee et al., 1995.

A Tabela 23 apresenta os valores calculados neste estudo para as razões de HPAs. Os valores que correspondem a BaA/(BaA+Cry) (0,39–0,48) e IP/BghiP (0,46–1,0) indicam uma contribuição significativa de emissões de diesel (Guo et al., 2003; Hanedar et al., 2014). As relações de BaA/BaP (0,4–1,1) e BaP/BghiP (0,47–0,81) nos três locais de amostragem são características de emissões de tráfego veicular, e são comparáveis com os reportados em outras zonas urbanas do mundo (De Martinis et al., 2002; Lee et al., 1995; Li e Kamens, 1993; Ravindra et al., 2008). Adicionalmente, a razão BaA/Cry concorda com o relatado para as emissões de combustão de madeira (Bourotte et al., 2005). Vários autores (Bourotte et al., 2007; Vasconcellos et al., 2003) relataram que fontes remotas também podem contribuir para a deterioração da qualidade do ar em outros locais no mundo. Desta forma, a queima de biomassa que ocorre no Estado de São Paulo principalmente durante a colheita de cana-de-açúcar (Vasconcellos et al., 2011) poderia

ser responsável pela contribuição de uma parte das concentrações de HPAs achados no estudo.

Tabela 23: Razões das concentrações de HPAs calculadas neste estudo para os três locais de amostragem.

Local	Amostra	BaA/(BaA+Cry)	IP/BghiP	B(a)A/B(a)P	BaP/BghiP	B(a)A/Cry
L1	Primavera	0,40	0,46	0,86	0,81	0,66
	Verão	0,45	0,69	1,17	0,50	0,82
	Outono	0,39	0,73	0,73	0,98	0,65
	Inverno	0,44	0,75	0,63	0,91	0,79
L2	Primavera	0,45	0,54	0,48	0,60	0,81
	Verão	0,48	0,94	0,44	0,47	0,94
	Outono	0,46	1,00	0,42	0,61	0,86
	Inverno	0,47	0,67	0,42	0,63	0,89
L3	Primavera	0,40	0,50	0,44	0,61	0,67
	Verão	0,42	0,61	0,63	0,44	0,71
	Outono	0,42	0,78	0,50	0,65	0,72
	Inverno	0,42	0,87	0,40	0,67	0,73

De acordo com os valores das razões calculadas (Tabela 23), estes compostos orgânicos são principalmente originados pelo tráfego veicular nos três locais de amostragem, com as emissões de diesel como a principal fonte de HPAs. Outros estudos também encontraram que o tráfego é o maior contribuinte de HPAs em áreas urbanas, especialmente as emissões de diesel em relação as emissões de gasolina (Callén et al., 2013; Hanedar et al., 2014; Jang et al., 2013; Samara et al., 2003). Este resultado pode ser devido aos veículos a diesel que possuem níveis maiores de emissões de partículas do que veículos movidos a gasolina (Ravindra et al., 2008).

Embora as razões entre os HPAs sejam usadas com frequência para identificar o comportamento e as fontes de emissão dos HPAs no MP atmosférico, sua aplicação deve ser cuidadosa, uma vez que foi determinado que diferentes tipos de fontes podem fornecer razões diagnósticas iguais (impressões digitais sobrepostas) e as concentrações de HPAs tendem a mudar como resultado de foto-reações atmosféricas (Pereira et al., 2013; Tobiszewski e Namieśnik, 2012). De acordo com Vasconcellos et al. (2010), o

impacto das fontes de combustão pode ser melhor avaliado através dos HPAs considerados marcadores moleculares.

Considerando as diferenças nas fontes de poluição, seria esperado encontrar diferenças nas análises químicas da fração orgânica, porém os resultados mostram que as emissões veiculares parecem ser a principal influência nos locais estudados. O fluoranteno (Flt) foi o HPA que apresentou as maiores concentrações em todos os períodos de amostragem em L1 e L3, enquanto que o BghiP foi o mais abundante no verão-L2 e também apresentou valores elevados nos outros extratos orgânicos. Estes dois compostos contribuíram com 24–53% do total de HPAs nas amostras analisadas e ambos são indicadores de emissões veiculares (Guo et al., 2003).

As altas concentrações de fluoranteno (Flt) determinadas nos três locais de amostragem podem ser o resultado de que este elemento está associado a várias fontes de emissão de HPAs. Masclet et al. (1987) observaram que as emissões de diesel eram ricas em Flt, Cry e Pyr. Khalili et al. (1995) identificaram que Flt, Ant, Phe e Pyr eram traçadores da combustão de madeira e que Flt, Ant, Phe, Pyr, BaA e Cry eram traçadores da combustão de carvão. Como foi dito anteriormente, a queima de cana-de-açúcar, assim como a queima de combustíveis fósseis nas indústrias e usinas termoelétricas das regiões circundantes, poderiam estar transportando os HPAs emitidos até nossos locais de coleta.

Kulkarni e Venkataraman (2000) e Bourotte et al. (2005) também identificaram Flt como traçador de várias fontes de emissão em combinação com outros HPAs. De acordo com estes estudos, Flt, Pyr e Phe são característicos da combustão de carvão e são derivados do processo de incineração; Flt e BaP são traçadores da combustão de lenha e Flt, Pyr, BbF e BkF de veículos pesados que funcionam com diesel. A correlação significativamente alta (Correlação de Spearman acima de 0,7 em um nível de confiança de 95%) observada entre Flt e Cry ($r = 0,75$), Pyr ($r = 0,75$), Phe ($r = 0,70$), e BaA ($r = 0,71$) (Tabela 24) sugere que estas espécies são provenientes da mesma fonte de emissão ou foram sometidos a processos ambientais semelhantes (Park et al., 2002; Tavares et al., 2004).

Tabela 24: Resultados da Correlação de Spearman dos HPAs determinados* nas amostras de MP₁₀.

	Phe	Flt	Pyr	BaA	Cry	BbF	BkF	BaP	DahA	BghiP
Flt	0,7031									
p	0									
Pyr	0,9586	0,7505								
p	0	0								
BaA	0,9030	0,7083	0,9565							
p	0	0	0							
Cry	0,9287	0,7585	0,9722	0,9807						
p	0	0	0	0						
BbF	0,8610	0,5826	0,8458	0,8857	0,8649					
p	0	0	0	0	0					
BkF	0,8644	0,5865	0,8595	0,9259	0,8973	0,9725				
p	0	0	0	0	0	0				
BaP	0,8546	0,5636	0,8489	0,9171	0,8901	0,9737	0,9938			
p	0	0	0	0	0	0	0			
DahA	0,0085	-0,0353	0,0245	0,1973	0,0970	0,3174	0,3757	0,3582		
p	0,9428	0,7659	0,8365	0,0965	0,4139	0,0075	0,0015	0,0025		
BghiP	0,7889	0,4580	0,7421	0,8157	0,7825	0,9524	0,9632	0,9555	0,4582	
p	0	0,0001	0	0	0	0	0	0	0,0001	
IP	0,7135	0,3702	0,6849	0,7701	0,7099	0,9233	0,9163	0,9117	0,5508	0,9529
p	0	0,0018	0	0	0	0	0	0	0	0

p: Valor de significância (*p valor*) da correlação ordinal de Spearman. Valores de *p* abaixo de 0,05 indicam correlações significativas com 95% de confiança

*Naph, Ace, Acp, Flu e Ant não foram incluídos na análise por apresentarem a maioria dos resultados abaixo do limite de quantificação.

O Benzo(g,h,i)períleno (BghiP) tem sido também determinado como o HPA mais abundante em outras cidades brasileiras com tráfego pesado (Dallarosa et al., 2008; Pereira et al., 2010). Este composto mostrou correlações positivas e significativas com Bkb ($r = 0,96$), IP ($r = 0,95$), BaA ($r = 0,82$) e BbF ($r = 0,95$), os quais têm sido identificados conjuntamente como traçadores de emissões veiculares (Barra et al., 2007; Kulkarni e Venkataraman, 2000; Rehwagen et al., 2005; Silva et al., 2015) (Tabela 24).

As concentrações dos HPAs com potencial carcinogênico, classificados pela IARC como Grupo 1, 2A e 2B (IARC, 2010) representaram entre 35–65% do total de HPAs determinados nas amostras de MP₁₀. As concentrações de BaA, Cry, BbF, BkF, BaP, DahA e IP estão dentro dos valores reportados para outras cidades como La Plata, Cordoba, Leipzig, Brno e Flanders, e estão abaixo dos determinados em cidades com altos índices de poluição atmosférica, como Hong Kong, Seul, Santiago de Chile e Cidade de México, como se observa na Tabela 25.

Tabela 25: Resultados comparativos das concentrações dos HPAs classificados pela IARC como possíveis carcinógenos para humanos.

Local	BaA	Cry	BbF	BkF	BaP	DahA	IP	Referência
Estado de São Paulo Brasil	0,05–0,22	0,07–0,26	0,12–0,7	0,06–0,32	0,08–0,54	0,03–0,22	0,09–0,72	Este estudo
Seoul Coreia do Sul	1,82	2,78	NA	NA	2,55	0,55	3,59	Park et al., 2002
Hong Kong	0,32–0,52	0,61–1,42	0,51–4,44	0,11–0,40	0,65–0,97	ND–7,99	0,52–0,71	Guo et al., 2003
Brno República Checa	0,43	0,53	0,54	0,27	0,52	0,02	0,57	Ciganek et al., 2004
La Plata Argentina	0,209	0,344	0,756	0,263	0,381	0,06	0,738	Rehwagen et al., 2005
Leipzig Alemanha	0,121	0,196	0,326	0,113	0,148	0,074	0,273	Rehwagen et al., 2005
Atenas Grécia	0,028–2,093	0,051–2,610	0,143–5,936	0,050–1,992	0,025–4,683	0,041–1,245	0,194–5,886	Mantis et al., 2005
Santiago Chile	2,77	2,88	2,97	1,77	5,28	0,27	2,48	Sienra et al., 2005
Flanders Bélgica	0,54	1,35	0,96	0,54	0,62	0,61	2,69	Du Four et al., 2005
São Paulo Brasil	0,59	0,43	1,64	0,91	1,32	NA	4,71	Bourotte et al., 2005
Cidade do México México	0,7–2,4	ND–0,1	2,0–2,8	0,3–1,5	1,0–1,6	ND–0,5	1,1–1,7	Gutiérrez-Castillo et al., 2006
Córdoba Argentina	0,63–0,41	NA	NA	NA	0,59–1,24	ND	0,19–0,37	Carreras et al., 2013
Wroclaw Polônia	0,855–3,127	0,343–1,911	0,955–2,832	0,267–1,702	0,765–7,980	0,112–0,284	0,530–1,726	Belcik et al., 2014

ND: Abaixo dos limites de determinação

NA: Não avaliado

Além das razões diagnósticas e os marcadores moleculares de HPAs, a análise de componentes principais (PCA) é frequentemente utilizada para identificar as principais fontes de emissão e para pesquisar o comportamento dos poluentes atmosféricos (Guo et al., 2003). Antes da análise de PCA, o conjunto de dados foi editado e os HPAs mais voláteis (Naph, Ace, Acp, Flu e Ant) não foram considerados porque a maioria de seus resultados se encontraram abaixo do limite de quantificação.

Os pesos de cada HPA nos primeiros dois componentes do PCA são apresentados na Tabela 26. Estes dois componentes explicam a maior parte da variância dos dados (92,9%). O componente 1 (PC1) exibiu 81% da variância total e os fatores com maiores pesos foram BaA, Cry, BbF, BkF, BaP e BghiP. Por outro lado, Phe, Flt, Pyr, Daha e IP apresentaram pesos mais elevados no Componente 2 (PC2), o qual representou o 18,5% da variância total.

Tabela 26: Peso de cada HPA nos dois primeiros componentes principais (CP) da PCA realizada com os HPAs determinados nas amostras de MP₁₀ no L1, L2 e L3.

HPAs	Componentes	
	CP1	CP2
Phe		0.319
Flt		0.370
Pyr		0.337
BaA	-0.322	
Cry	-0.307	
BbF	-0.329	
BkF	-0.331	
BaP	-0.330	
Daha		0.545
BghiP	-0.314	
IP		0.368
% Variância total	81	11.9
% Variância acumulada		92.9

Todos os compostos que aportaram ao CP1 têm sido associados, em níveis diferentes, com a emissão do escapamento de veículos. Phe, Pyr e IP, compostos que aportaram ao CP2, são característicos da queima de madeira e as emissões de combustão de carvão (Kulkarni e Venkataraman, 2000). Estes resultados confirmam que a qualidade do ar nos

três locais de amostragem está sendo afetada tanto por fontes móveis como fixas, mas em diferentes proporções, sendo as emissões de veículos a principal fonte de HPAs em todos os locais estudados.

4.2.2.2 Concentrações equivalentes de BaP

A avaliação de risco associada com a absorção de HPAs inalados é frequentemente estimada com base as concentrações de benzo(a)pireno no ar. O BaP é usado como composto indicador por ter sido apontado como responsável por 50% do potencial carcinogênico dos HPAs (Hanedar et al., 2014) e por sua estreita relação com outros HPAs (Halek et al., 2008).

O Citocromo P450 é o conjunto de enzimas responsáveis pelo metabolismo de BaP. Estas enzimas realizam oxidação enzimática que conduz à formação de benzo(a)pireno-7,8-diol-óxido, seguido de hidrólise e a formação de benzo(a)pireno-7,8-diol. O citocromo P450 atua de novo sobre estes diols e gera benzo(a)pireno-7,8-diol-9,10-epóxido. Este metabólito final do BaP e outros diol-epóxidos formados por processos similares são compostos considerados cancerígenos e mutagênicos, devido à alta potência de sua ligação covalente com o DNA e pela formação de adutos de DNA que levam a mutações (Pereira et al., 2013).

As concentrações de BaP nas amostras de MP₁₀ em L1 (0,08–0,31 ng/m³), L2 (0,23–0,57 ng/m³) e L3 (0,08–0,47 ng/m³) foram inferiores aos valores guia recomendados pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2006) e o valor padrão da legislação europeia (Diretiva 2004/107/CE - 1,0 ng/m³ de BaP para o conteúdo total na fração média de MP₁₀ ao longo de um ano) (Bortey-Sam et al., 2015). As concentrações de BaP obtidas neste estudo são comparáveis com as determinadas em outras regiões urbanas do Brasil, e foram muito mais baixas que as relatadas em países com altos níveis de poluição atmosférica como Índia (Masih, 2012; Mohanraj et al., 2011; Sarkar e Khillare, 2011; Sharma et al., 2007) e China (Okuda et al., 2006; Shi, 2010) (Tabela 27).

Tabela 27: Concentrações (ng/m³) dos 16 HPAs (EPA), BaP e equivalente carcinogênico (TEQ) e mutagênico (MEQ) relatados na literatura para diferentes cidades do Brasil e o mundo.

País	Cidade	16 HPA	B(a)P	TEQ	MEQ	Referência
Brasil	Curitiba	2,97–7,08	0,33–1,03	~0,45–1,12	NA	Froehner et al., 2010
	Porto Alegre	1,57–3,05	~0,10–0,30	0,321–0,645	NA	Aguadelo-Castañeda e Teixeira, 2014
	Canoas	1,32–2,02	~0,07–0,17	0,203–0,419	NA	
	Porto Velho	*	0,03–0,57	0,84–1,97	0,23–0,53	Alves et al., 2015
Gana	São Paulo	10,6–25,9	0,4–4,3	1,9–3,7	NA	Vasconcellos et al., 2010
	Piracicaba	3,4–15,2	0–1,8	0,4–2,1	NA	
Gana	Kumasi	3,0–25	0–4,8	0,28	NA	Bortey-Sam et al., 2015
Turquia	Istambul	25,1–100,7	0,6–1,3	1,26–2,648	NA	Hanedar et al., 2014
	Kocaeli	~14,1–56,9	~4,9–19,4	11,7–32	NA	Gaga et al., 2012
EUA	New York	*	0,016–0,748	0,109–1,932	0,062–2,394	Jung et al., 2010
Irã	Tehran	44,1–130	1,41–3,82	4,65	NA	Halek et al., 2008
Índia	Amritsar	37–274	0,61–2,7	10–60	NA	Kaur et al., 2013
Tailândia	Chiang Mai	0,25–44,26	0,04–2,40	0,13–3,70	NA	Wiriya et al., 2013
China	Beijing	22,65–575,46	1,81–37,76	4,5–34,52	NA	Liu et al., 2007

NA: Não avaliado/ * Informação não disponível na publicação

Os valores de TEF e MEF em combinação com as concentrações de HPAs podem ser usados para calcular o equivalente carcinogênico (TEQ, expresso em ng/m³) e equivalente mutagênicos (MEQ, expresso em ng/m³) em amostras ambientais. A atividade mutagênica, apesar de não estar diretamente associada com o câncer (Zeiger, 2001), pode também ter implicações importantes no desenvolvimento de outras doenças humanas como doenças pulmonares (aumento da irritação do sistema respiratório, bronquite, enfisema) e doenças cardiorrespiratórias (Jung et al., 2010; Valavanidis et al., 2008). Nas Tabelas 28 e 29 estão apresentadas as concentrações equivalentes ao BaP (BaP-TEQ e BaP-MEQ) e a contribuição individual de cada HPA.

Tabela 28: Resultados do BaP-TEQ dos extratos orgânicos de MP₁₀.

HPA	TEF	L1				L2				L3			
		Primavera	Verão	Outono	Inverno	Primavera	Verão	Outono	Inverno	Primavera	Verão	Outono	Inverno
BaP	1	0,014	0,010	0,015	0,019	0,011	0,016	0,009	0,023	0,012	0,005	0,013	0,019
BaA	0,1	0,002	0,001	0,002	0,002	0,001	0,002	0,002	0,003	0,002	0,001	0,002	0,003
Cry	0,01	0,015	0,015	0,030	0,037	0,029	0,043	0,089	0,070	0,040	0,012	0,037	0,062
BbF	0,1	0,011	0,007	0,013	0,018	0,016	0,024	0,019	0,032	0,017	0,006	0,016	0,027
BkF	0,1	0,160	0,083	0,212	0,308	0,228	0,359	0,269	0,536	0,267	0,079	0,265	0,466
DahA	5	0,000	0,000	0,000	0,000	0,177	0,209	0,013	0,324	0,000	0,000	0,000	0,207
BghiP	0,01	0,002	0,002	0,002	0,003	0,004	0,008	0,084	0,008	0,004	0,002	0,004	0,007
IP	0,1	0,009	0,012	0,016	0,025	0,021	0,072	0,138	0,057	0,022	0,011	0,031	0,061
(BaP-TEQ) _{Σ8HPA}		0,213	0,129	0,292	0,413	0,487	0,733	0,623	1,053	0,364	0,114	0,367	0,852

Tabela 29: Resultados do BaP-MEQ dos extratos orgânicos de MP₁₀.

HPA	MEF	L1				L2				L3			
		Primavera	Verão	Outono	Inverno	Primavera	Verão	Outono	Inverno	Primavera	Verão	Outono	Inverno
BaP	1	0,011	0,008	0,013	0,016	0,009	0,013	0,009	0,018	0,009	0,004	0,010	0,016
BaA	0,082	0,004	0,002	0,004	0,004	0,002	0,003	0,002	0,004	0,003	0,001	0,003	0,004
Cry	0,017	0,037	0,037	0,076	0,093	0,074	0,108	0,089	0,175	0,101	0,030	0,092	0,155
BbF	0,25	0,013	0,008	0,015	0,019	0,017	0,026	0,019	0,035	0,019	0,006	0,018	0,030
BkF	0,11	0,160	0,083	0,212	0,308	0,228	0,359	0,269	0,536	0,267	0,079	0,265	0,466
DahA	0,29	0,000	0,000	0,000	0,000	0,010	0,012	0,013	0,019	0,000	0,000	0,000	0,012
BghiP	0,19	0,037	0,032	0,041	0,064	0,072	0,147	0,084	0,161	0,084	0,034	0,075	0,133
IP	0,31	0,028	0,036	0,049	0,079	0,064	0,224	0,138	0,177	0,068	0,033	0,097	0,190
(BaP-MEQ) _{Σ8HPA}		0,290	0,206	0,409	0,583	0,476	0,893	0,623	1,127	0,550	0,187	0,560	1,005

Os valores de BaP-TEQ e BaP-MEQ estão relacionados com a concentração total de HPAs das amostras de MP₁₀, apresentando valores maiores nas amostras de inverno (Figura 10). Porém, os níveis de risco associados ao (BaP-TEQ)_{Σ8HPA} e (BaP-MEQ)_{Σ8HPA} dependem não somente das concentrações individuais da Σ8HPAs, mas também da composição da mistura de HPAs, que é influenciada pelas diferentes fontes de emissão (Jung et al., 2010). Enquanto que as concentrações da Σ8HPA determinadas em Inverno-L3 foram 1,5 a 3 vezes maiores que as determinadas nos outros períodos, os valores de BaP-TEQ e BaP-MEQ foram até 7 e 5 vezes superiores, respectivamente.

Os valores de (BaP-TEQ)_{Σ8HPA} observados neste estudo foram consideravelmente menores aos relatados para outras cidades impactadas fortemente por emissões industriais (Gaga et al., 2012; Kaur et al., 2013; Liu et al., 2007). No entanto, os valores obtidos para BaP-TEF em relação à Σ8HPAs, nos três locais de amostragem, foram comparados com os observados por Froehner et al. (2010) em Curitiba-Brasil e maiores aos valores achados em áreas impactadas por tráfego veicular no estado de Rio Grande do Sul (Agudelo-Castañeda e Teixeira, 2014) e em Kumasi, Gana (Bortey-Sam et al., 2015).

O HPA que mais contribuiu com o risco potencial carcinogênico (43–75%) e mutagênico (40–55%) foi o BkF. Embora D(ah)A representava apenas uma pequena proporção na concentração total da Σ16HPAs nas amostras coletadas em L2 e inverno-L3, sua contribuição relativa (24–36%) ao risco potencial cancerígeno foi significativamente maior do que a maioria dos outros HPAs, por causa de seu alto valor TEF (5,0). Além disso, Okona-Mensah et al. (2005) indicam que D(ah)A tem uma potência carcinogênica 10 ou mais vezes maior que BaP. Estudos em animais têm demonstrado que D(ah)A pode produzir tumores por diferentes vias de administração em roedores e porquinhos da Índia, com efeitos carcinogênicos tanto locais como sistêmicos nestes animais (Okona-Mensah et al., 2005).

Os compostos Cry e IP também contribuíram significativamente com o potencial carcinogênico e mutagênico das amostras estudadas (Tabelas 28 e 29). Neste estudo, a contribuição relativa de Benzo(a)pireno ao BaP-TEQ (1,45–3,0%) e BaP-MEQ (1,5–7,5%) é muito menor em comparação com outros estudos realizados em áreas urbanas do mundo. Mirante et al. (2013) identificaram BaP como o maior contribuinte ao risco

carcinogênico com valores médios superiores a 61% em amostras de MP coletadas em Madrid, Espanha. Resultados semelhantes foram apresentados para a Cidade do México (45–60%) (Amador-Muñoz et al., 2010), Bangkok-Tailândia (65%) (Norramit et al., 2005) e Prato-Itália (51,6%) (Cincinelli et al., 2007). Apesar das diferenças nas concentrações de BaP, esses autores também relataram que D(ah)A, IP e BkF desempenham um papel importante na carcinogenicidade total dos HPAs.

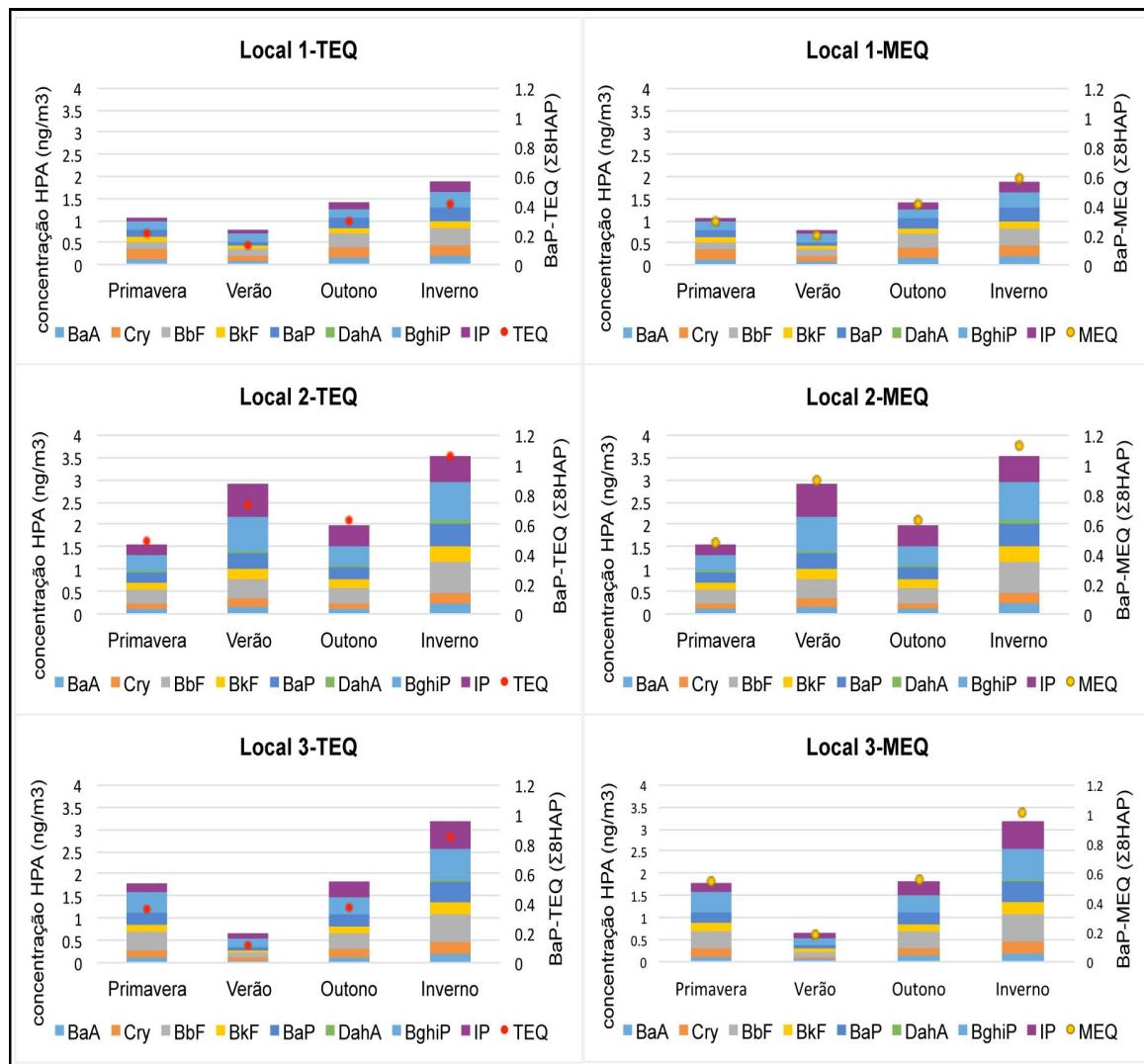


Figura 10: Resultados de BaP-TEQ e BaP-MEQ e concentração de HAP.

De acordo com Callén et al. (2013), episódios envolvendo um alto risco para a saúde humana com relação ao desenvolvimento de câncer ao longo da vida, foram favorecidos por condições meteorológicas típicas da época de inverno e uma alta contribuição de fontes estacionárias e emissões veiculares em áreas urbanas. Os valores do BaP-

equivalente, indicam que o risco para a saúde a exposição a D(ah)A, BkF, IP e Cry, os quais são marcadores de tráfego veicular, (Kulkarni e Venkataraman, 2000; Rehwagen et al., 2005), é maior entre todas as espécies identificadas nos locais de amostragem.

Embora o BaP-TEQ e BaP-MEQ sejam uma ferramenta importante na avaliação de risco, a carcinogenicidade e mutagenicidade do MP nem sempre está relacionada com o fator equivalente de BaP. O risco potencial da exposição aos HPAs com base em TEQ e MEQ pode ser subestimado pelas interações sinérgicas mais que pelas relações aditivas entre alguns HPAs. Além disso, a degradação dos HPAs por reações fotoquímicas e químicas na atmosfera e nos filtros durante a amostragem também podem subestimar o risco potencial, devido à redução nas medições dos níveis de HPAs (Jung et al., 2010).

Para superar a dificuldade de identificar os compostos tóxicos em misturas complexas, as agências governamentais têm-se centrado em substâncias prioritárias com conhecida ação genotóxica. Como consequência do desconhecimento sobre o comportamento destas substâncias em misturas complexas, muitas vezes, é assumido que a toxicidade de uma mistura é simplesmente a soma dos valores esperados para cada um dos componentes, isto é, sem interações sinérgicas ou antagônicas. No entanto, vários autores têm mostrado que muitas substâncias não mutagênicas (por exemplo, antraceno e naftaleno) podem modular (aumentar ou diminuir) os efeitos de compostos mutagênicos, como BaP (White, 2002).

4.2.2.3 Compostos solúveis em água - Metais

As concentrações de 15 metais hidrossolúveis foram também determinadas como parte da caracterização química das amostras de MP₁₀. Os resultados da média obtida de três medidas independentes são apresentados na Tabela 30.

Tabela 30: Concentração (ng/m³) média dos metais hidrossolúveis determinados nas amostras de MP₁₀.

Metal	Local 1				Local 2				Local 3			
	Primavera	Verão	Outono	Inverno	Primavera	Verão	Outono	Inverno	Primavera	Verão	Outono	Inverno
Sc	0,24	0,22	0,20	0,23	0,13	0,18	0,24	1,07	0,21	0,34	0,43	0,35
Ti	0,46	0,57	0,66	0,63	0,54	1,03	1,54	11,61	0,65	0,48	1,25	0,95
Mn	8,83	11,80	15,15	17,83	73,93	130,31	52,41	86,06	17,76	11,21	23,17	26,91
Co	0,34	0,26	0,59	0,81	1,41	4,68	3,59	24,77	0,21	0,13	0,29	0,29
Ni	3,45	2,81	4,75	6,97	2,69	8,42	5,37	63,32	0,71	0,62	1,41	1,01
Cd	0,57	0,46	1,01	1,22	0,58	1,25	0,48	12,73	0,11	0,07	0,47	0,16
Sb	2,50	2,69	3,06	4,47	3,30	6,00	3,08	71,88	0,94	0,62	1,67	1,49
Pb	2,38	5,08	8,33	5,17	6,64	12,03	1,56	84,91	0,34	0,22	0,43	0,76
V	1,07	1,30	1,22	0,92	2,22	3,02	1,69	2,05	0,96	0,60	1,06	1,04
Cr	1,46	1,29	1,49	1,31	0,95	1,33	0,65	0,92	1,19	1,14	1,15	1,31
Fe	37,67	149,87	234,78	112,77	35,89	82,11	18,71	40,48	1,58	9,65	65,37	128,28
Cu	34,58	30,73	48,69	48,99	50,58	68,51	57,21	66,03	14,72	22,61	73,49	23,26
Zn	161,85	106,52	151,23	215,65	425,13	648,17	259,23	307,58	35,69	20,18	37,44	30,69
As	1,30	1,12	1,82	2,04	1,65	2,22	1,33	2,13	0,91	1,23	1,10	0,99
Se	4,67	2,57	3,66	5,69	1,55	1,98	1,21	1,93	3,26	2,89	3,95	3,70
TOTAL	261,37	317,29	476,65	424,69	607,20	971,25	408,30	777,48	79,24	71,99	212,66	221,19

Enquanto a emissão de alguns metais é devida a processo naturais (erupções vulcânicas, tormentas de poeira e incêndios florestais), algumas atividades antropogênicas como a queima de combustíveis fósseis e madeira, processos industriais a altas temperaturas e a incineração de resíduos podem liberar metais a atmosfera (Allen et al., 2001). A concentração total de metais hidrossolúveis mostrou diferenças significativas entre os três locais de amostragem ($p = 0,012$). As concentrações dos metais variaram de 261,37 (primavera) a 476,65 ng/m³ (outono) em L1 e de 408,30 (outono) a 971,25 ng/m³ (verão) em L2. As menores concentrações totais de metais foram determinadas em L3 (Figura 11), onde o valor mínimo foi 71,99 ng/m³ no verão e o máximo 221,19 ng/m³ no inverno. O teste de Kruskal-Wallis demonstrou que não existem diferenças significativas entre as estações de coleta ($p = 0,678$) (Tabela 31).

Tabela 31: Resultado do teste de Kruskal-Wallis para comparação das concentrações dos metais hidrossolúveis nas diferentes estações climáticas e locais de amostragem.

Metais hidrossolúveis	Estação climática	Amplitude média	Local	Amplitude média
	Primavera	5,00	L1	7,00
	Verão	8,33	L2	10,00
	Outono	5,67	L3	2,50
	Inverno	7,00		
Qui-quadrado		1,518		8,769
gl		3		2
p		0,678		0,012

g.l: graus de liberdade

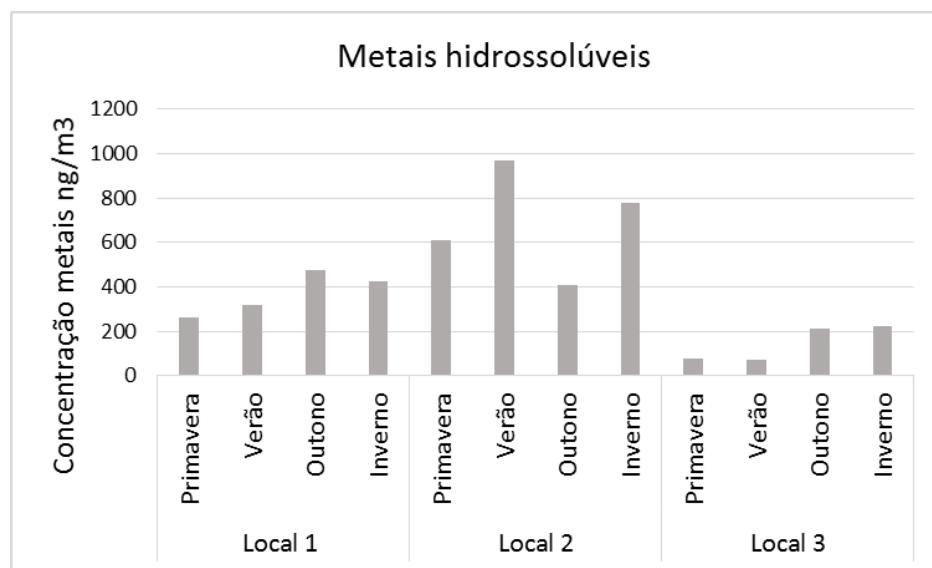


Figura 11: Concentrações dos metais hidrossolúveis por local e estação de amostragem.

A concentração dos compostos hidrossolúveis apresenta uma alta relação com as concentrações de MP₁₀ no L1 ($R^2 = 0,77$) e L2 ($R^2 = 0,96$) e moderada em L3 ($R^2 = 0,65$). Os elementos mais abundantes em termos absolutos foram Zn, Cu, e Fe, os quais representaram entre 89–91% do total da concentração da fração solúvel em L1, 53–84% em L2 e 65–83% em L3. A concentração destes elementos foi significativamente maior em L1 e L2 que em L3.

Observou-se também uma variabilidade nas concentrações de outros elementos entre os locais. Metais como Sb (71,88 ng/m³), Ni (63,22 ng/m³), Pb (84,91 ng/m³) e Co (24,77 ng/m³) apresentaram valores significativamente maiores na amostra Inverno-L2 em relação aos resultados obtidos nas outras amostras. Enquanto que Mn teve uma contribuição importante nas amostras de L2 (11–13%) e L3 (11–22%), nos extratos de L1 não excedeu 4%. Seis elementos (Sc, Ti, Cd, V, Cr, e As) mostraram uma abundância relativa inferior a 2% em todos os locais de amostragem.

As concentrações dos elementos quantificados neste estudo referem-se à fração solúvel dos compostos. Estes valores representam as espécies solúveis em água de cada elemento e, por conseguinte, são mais baixos do que a concentração total, sendo esta última a mais comumente relatada. Segundo Barrett et al. (2008), a limitada informação disponível sobre as concentrações dos metais no MP atmosférico é a principal barreira para a avaliação de risco à exposição humana. Enquanto que as informações sobre as concentrações totais dos metais no MP são importantes, é necessário um maior conhecimento sobre a fração solúvel dos metais, devido às evidências que sugerem que esta fração é mais biodisponível e tem capacidade de induzir toxicidade pulmonar (Wiseman e Zereini, 2014).

Os metais de fontes antropogênicas são facilmente solúveis em água, porque estes elementos se condensam sobre a superfície das partículas já formadas e tendem a ser mais instáveis do que os que são formados a partir da matriz da partícula (Heal et al., 2005). Em geral, V, Co, Ni, Sb, Cr, Fe e Mn estão associados com a combustão de hidrocarbonetos fósseis (Lin et al., 2005). As indústrias são responsáveis pela liberação na atmosfera de V, Pb, Fe, Cr, Co, Ni, Cd, As, Sb e Zn (Sýkorová et al., 2016) e o tráfego

veicular envolve a emissão de uma grande quantidade de elementos traço que incluem Fe, Pb, Cu, Zn e Cd (Moreno et al., 2006).

O Zn, Fe e Cu são metais que ocorrem tipicamente em concentrações altas no ambiente. Birmili et al. (2006) determinaram que estes três elementos junto com Al foram os metais de transição mais abundantes em amostras de MP ($d<0,5\text{ }\mu\text{m}$) coletadas na cidade de Birmingham, Reino Unido. Heal et al. (2005) acharam que mais de 90% da massa total dos metais hidrossolúveis do MP de Edimburgo foi aportada por Fe, Cu, Zn e Pb.

Altos níveis de Zn foram também relatados em amostras de MP coletadas em outras áreas do mundo. Lemos et al. (2012) determinaram que o Zn foi o elemento mais abundante em amostras de $\text{MP}_{2,5}$ entre todos os metais avaliados em Rio Grande do Sul, Brasil. Este elemento foi também predominante em amostras de MP_{10} coletadas em diferentes áreas urbanas e industriais de Espanha e em cidades como Paris, Cidade do México, Beijing e Tóquio (Azimi et al., 2005; Du et al., 2013; Gutiérrez-Castillo et al., 2006; Moreno et al., 2006; Sato et al., 2008). Além disso, tem sido descrito que o Zn facilmente disponível representa cerca do 100% do conteúdo total deste metal na fração grossa e fina do aerossol (Voutsas e Samara, 2002). Käffer et al. (2012) consideraram que as principais fontes potenciais de Zn são o fluxo veicular devido a abrasão de pneus, além das fontes industriais.

Contrariamente à baixa solubilidade (<10%) (Santos et al., 2009) e mobilidade ambiental (Dabek-Zlotorzynska et al., 2011; Fernández Espinosa et al., 2002) relatada por alguns autores, o Cu foi o metal que predominou nas amostras de MP_{10} . Heal et al. 2005 revelaram que mais de 50% do Cu do MP estava na fração solúvel. Wiseman e Zereini (2014) observaram uma alta mobilidade e uma solubilidade > 80% do Cu associado a amostras de MP_{10} coletadas em Frankfurt entre 2009-2010. Uma alta porcentagem de solubilidade do Cu foi também relatada por Sato et al. (2008) em MP_{10} de Tóquio. De acordo com Weckwerth (2001), uma importante fonte antropogênica de Cu é o desgaste dos freios dos veículos.

O Fe está associado principalmente com a fração grossa do MP porque é um constituinte natural do material geológico (Limbeck et al., 2012). Cerca do 80% do conteúdo total de Fe está presente na fração insolúvel (Laing et al., 2014), no entanto, foi um dos elementos mais abundantes em todas as amostras de MP₁₀.

As concentrações solúveis de alguns metais no MP atmosférico coletado como parte deste estudo são comparáveis com os relatados em outras zonas urbanas (Tabela 32). Gutiérrez-Castillo et al. (2006) relataram concentrações solúveis médias similares de Zn e Mugica-Álvarez et al. (2012) de Cu e Fe para amostras de MP₁₀ coletadas na Cidade do México com valores entre 109–511 ng/m³, 31,9–41,4 ng/m³ e 89–103,4 ng/m³, respectivamente. Enquanto que as concentrações de Mn em MP₁₀ relatadas para Linz, Áustria (1,6–32,4 ng/m³) (Limbeck et al., 2012) são comparáveis com as determinadas em L1 e L3, as altas concentrações deste metal em L2 foram equivalentes às quantificadas em Nanjing, China (81,94 ng/m³) (Wang et al., 2002). As concentrações de Pb observadas neste estudo estão dentro dos limites determinados por Santos et al. (2009) na cidade de Buenos Aires, Argentina (1,3–7,8 ng/m³) e as concentrações de V são similares às encontradas por Fernández Espinosa et al. (2002) em Sevilla, Espanha (Tabela 32). Além disso, as concentrações de Ni e As identificadas nas amostras de MP₁₀ são comparáveis com as determinadas em Singapura (0,5–5,3 e 1,1–1,17 ng/m³, respectivamente) por Karthikeyan et al. (2006). Chama a atenção as concentrações de elementos como Co, Ni, Cd, Sb e Pb na amostra de inverno- L2, as quais são muito mais elevadas que as determinadas nas outras deste estudo e em outras áreas urbanas do mundo.

Tabela 32: Concentrações hidrossolúveis (ng/m³) de metais relatados na literatura em áreas urbanas.

Local	Descrição área	Tamanho partícula	Concentrações de metais hidrossolúveis									Referência
			Zn	Cu	Fe	Mn	Pb	V	Ni	As		
Rio Grande do Sul	Urbana e industrial	MP _{2,5}	14,7–35,1	0,86–1,19	<LD–0,86	NA	<LD–0,40	0,79–0,86	0,79–0,86	<LD	Lemos et al., 2012	
Cidade do México	Urbana e industrial	MP ₁₀	109–511	13,9–36,1	10–80	0,8–1,3	NA	6,0–114	1,8–13,5	NA	Gutierrez-Castillo et al., 2006	
Cidade do México	Urbana e industrial	MP ₁₀	NA	36,5±4,6	96,2±7,2	4,9±0,7	NA	NA	NA	NA	Mugica-Alvarez et al., 2012	
Linz Áustria	Industrial	MP ₁₀	NA	1,8–14,7	8,6–260,6	1,6–32,4	NA	NA	<LQ–2,6	NA	Limbeck et al., 2012	
Singapura	Universidade Nac. de Singapura	MP ₁₀	17,9±6,4	3,97±0,5	30,3±5,3	1,8±0,3	3,9±2,1	17,9±12,2	2,9±2,4	1,4±0,3	Karthikeyan et al., 2006	
Sevilla Espanha		MP _{<6,1}	NA	2,53	9,6	2,42	1,7	2,06	0,57	NA	Fernandez-Espinosa et al., 2002	
Buenos Aires Argentina	Urbana e industrial	MP ₁₀	3,8–17,5	0,7–4,5	0,46–1,7	1,35–3,40	1,3–7,8	NA	NA	NA	Santos et al., 2009	
Birmingham-Reino Unido		MP _{<7,2}	3,6±3,6	1,3±0,78	28±16	0,85±0,5	0,75±0,6	NA	0,083±0,1	NA	Birmili et al., 2006	
Nanjing China	Urbana e industrial	MP ₁₀	607	38,83	45,18	81,94	9,84	5,31	8,91	17,25	Wang et al., 2002	

NA: Não avaliado

<LD: Abaixo do limite de detecção

<LQ: Limite de quantificação

Os metais presentes no MP têm sido também utilizados como traçadores para identificar fontes individuais de emissão. Foi determinado que a busca por marcadores confiáveis de fontes específicas pode ser crucial para o desenvolvimento de estratégias de baixo custo de monitorização da poluição do ar (Birmili et al., 2006).

A análise de Spearman indicou que existem correlações significativas entre as concentrações da maioria dos metais. Os altos valores dos coeficientes de correlação apresentados por vários dos elementos hidrossolúveis sugerem uma fonte de emissão comum (Tabela 33). Correlações significativas foram observadas entre V, Cu e As ($r>0,9$) e entre Ni, Co, Sb, Pb, Cd e Zn ($r>80$). As concentrações de Fe mostraram correlações significativas, mais fracas ($<0,60$), com os outros elementos. Enquanto que a maior correlação foi obtida entre Se e Cr ($r = 90$). Não houve correlação significativa com Mn, Co, Pb e Zn.

Tabela 33: Resultados da Correlação de Spearman dos metais hidrossolúveis nas amostras de MP₁₀.

	Sc	Ti	Mn	Co	Ni	Cd	Sb	Pb	V	Cr	Fe	Cu	Zn	As
Ti	0,8402													
p	0													
Mn	0,4595	0,7634												
p	0,0001	0												
Co	0,3655	0,6885	0,8486											
p	0,0021	0	0											
Ni	0,4644	0,6515	0,618	0,8788										
p	0,0001	0	0	0										
Cd	0,4342	0,6069	0,609	0,8481	0,9634									
p	0,0003	0	0	0	0									
Sb	0,5501	0,7367	0,7472	0,8981	0,9632	0,9542								
p	0	0	0	0	0	0								
Pb	0,262	0,4589	0,5838	0,8036	0,8965	0,9127	0,8952							
p	0,0272	0,0001	0	0	0	0	0							
V	0,5586	0,7189	0,8198	0,7272	0,6947	0,6731	0,8072	0,6705						
p	0	0	0	0	0	0	0	0						
Cr	0,6314	0,5176	0,3506	0,2422	0,417	0,4203	0,4873	0,3537	0,7037					
p	0	0	0,0031	0,0413	0,0004	0,0004	0	0,0029	0					
Fe	0,3212	0,339	0,2278	0,2656	0,4927	0,5634	0,5225	0,5609	0,4767	0,6373				
p	0,0068	0,0043	0,0549	0,0252	0	0	0	0	0,0001	0				
Cu	0,6445	0,7609	0,7171	0,7256	0,7614	0,7933	0,8335	0,618	0,8458	0,6345	0,5346			
p	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
Zn	0,216	0,4533	0,7014	0,8813	0,8788	0,8517	0,8757	0,8628	0,7797	0,381	0,3611	0,7346		
p	0,0688	0,0001	0	0	0	0	0	0	0	0,0013	0,0023	0		
As	0,697	0,7197	0,6641	0,6571	0,7519	0,7241	0,8031	0,645	0,8721	0,8247	0,522	0,8687	0,7323	
p	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Se	0,6564	0,4106	0,0986	0,0059	0,2358	0,2592	0,2862	0,0958	0,4134	0,9035	0,53	0,4958	0,1063	0,6517
p	0	0,0005	0,4061	0,9602	0,047	0,029	0,0159	0,4198	0,0005	0	0	0	0,3704	0

p: Valor de significância (*p* valor) da correlação ordinal de Spearman. Valores de *p* abaixo de 0,05 indicam correlações significativas com 95% de confiança

Foram identificados três componentes principais, os quais representam 92,9% do total da variância dos dados obtidos (Tabela 34). O primeiro componente (CP1), que explicou 57% do total da variância, esteve fortemente correlacionado com Sc, Ti, Co, Ni, Cd, Sb e Pb. O segundo componente (CP2) foi mais dependente de V, Cr, Fe, Cu e As e representou 24% do total da variância. O terceiro componente (CP3) está composto principalmente por Mn, Zn, e Se e explicou 11,9% do total da variância.

Tabela 34: Peso de cada um dos metais nos três primeiros componentes principais (CP) da PCA realizada com os metais hidrossolúveis determinados nas amostras de MP₁₀ no L1, L2 e L3.

Metais	Componentes		
	CP1	CP2	CP3
Sc	-0,302		
Ti	-0,310		
Mn			-0,450
Co	-0,314		
Ni	-0,314		
Cd	-0,310		
Sb	-0,307		
Pb	-0,313		
V		0,25	
Cr		0,419	
Fe		0,329	
Cu		0,277	
Zn			-0,461
As		0,317	
Se			0,462
% Variância Total	57	24	11.9
% Variância acumulada			92.9

Em geral, os elementos traço têm diversas fontes potenciais, fazendo com que a pesquisa sobre a origem seja difícil (Azimi et al., 2005). Neste estudo não foi possível identificar uma única fonte específica para cada composto. Em áreas urbanas, praticamente todos os metais identificados estão normalmente associados com o tráfego veicular e as atividades industriais. Por exemplo, Cd, Cu, Sb, Zn, e Pb estão presentes na gasolina, componentes dos óleos lubrificantes, anti-corrosivos, poeira da estrada e processo de incineração (Azimi et al., 2005; Huang et al., 2014). Segundo Srimuruganandam e Nagendra (2011), a ressuspensão da poeira pela passagem de veículos leves pode ser responsável por mais de 50% dos valores de Cr, Fe, Mg, Mn e V e 20% das concentrações de Cu, Ni, Pb, Sb e Zn determinadas em amostras de MP. A

presença de Fe pode ser atribuída a diferentes fontes como ressuspensão de poeira, desgaste mecânico e combustão (Santos et al., 2009) e V e Ni são reconhecidos traçadores de queima de combustível e indústria petroquímica (Mbengue et al., 2015).

Em geral, o perfil químico da fração orgânica e solúvel em água de MP₁₀ determinada neste estudo apresenta uma composição similar à relatada em outras áreas urbanas, embora em diferentes proporções devido às condições locais específicas. Os dados existentes demonstram que os níveis dos elementos químicos no MP atmosférico são altamente variáveis. Um grande número de fatores, incluindo atividades antropogênicas e condições meteorológicas prevalentes na área de estudo têm uma forte influência na composição química do MP atmosférico, resultando em uma composição característica dos elementos dependendo do tempo e o local de coleta (Wiseman e Zereini, 2014).

4.2.3 ANÁLISES BIOLÓGICAS

4.2.3.1 Teste de micronúcleos com bloqueio da citocinese (CBMN)

O potencial genóxico dos extratos orgânicos e solúveis em água de MP₁₀ coletados em três locais do estado de São Paulo foram avaliados nas células alveolares epiteliais A549 usando o teste de micronúcleos (MN) com bloqueio da citocinese (Figura 12).

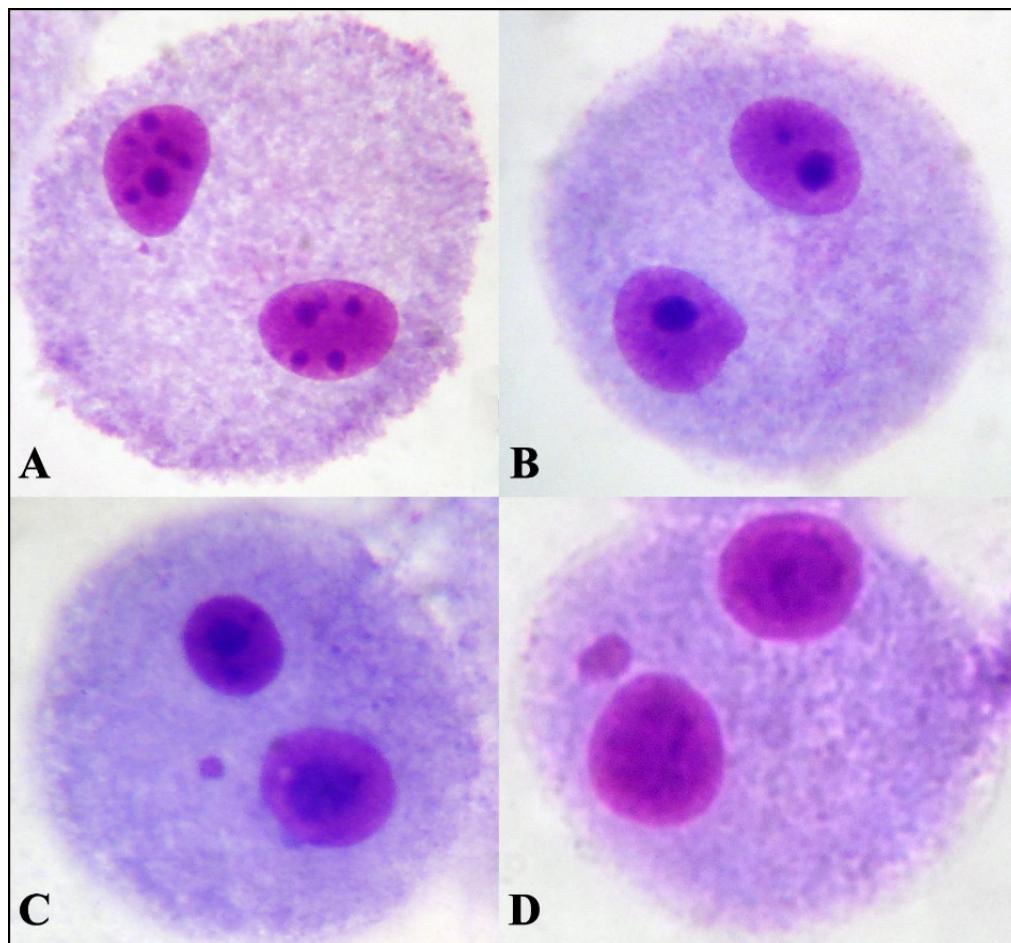


Figura 12: Células A549 binucleadas sem micronúcleo (A, B) e células binucleadas com micronúcleo (C, D).

Os resultados da frequência de MN nas diferentes concentrações de MP₁₀ testadas e seu respetivo índice de divisão nuclear são apresentados nas Tabelas 35 e 36.

A frequência dos controles positivos apresentou diferenças significativas quando comparada com os controles negativos em todas as amostras. A viabilidade celular não foi afetada em nenhum dos extratos nas concentrações usadas no ensaio de MN (viabilidade <77%) (Figura 13) e o índice de divisão nuclear (IDN) foi similar ao grupo controle, variando de 1,5 a 2 (Tabelas 34 e 35).

Tabela 35: Frequência de micronúcleos (MN)/1000* células e índice de divisão nuclear (IDN) da fração orgânica de MP₁₀.

	Concentração	Local 1		Local 2		Local 3	
		MN	IDN	MN	IDN	MN	IDN
Primavera	CN	21	1,8	14,5	1,7	15,5	1,6
	1,25 m ³	27	1,7	19,5	1,8	10	1,8
	2,5 m ³	21	1,7	17,5	1,8	13	1,7
	5,0 m ³	24	1,5	24,5	1,7	12	1,7
Verão	CN	8	1,8	17	1,8	9	1,8
	1,25 m ³	15	1,7	17	1,9	11,5	1,7
	2,5 m ³	14	1,5	26	1,8	11	1,8
	5,0 m ³	21,5	1,7	30	1,8	20	1,7
Outono	CN	13,5	1,6	14,5	1,7	11,5	1,7
	1,25 m ³	9	1,8	12,5	1,8	12,5	1,8
	2,5 m ³	13	1,8	14,5	1,8	17	1,8
	5,0 m ³	22,5	1,7	18,5	1,8	22,5	1,6
Inverno	CN	21	1,8	14,5	1,7	28,5	1,8
	1,25 m ³	24,5	1,9	22,5	1,9	22,5	2
	2,5 m ³	19	1,6	22	1,8	31,5	1,7
	5,0 m ³	32	1,5	33,5	1,8	35,5	1,7

*Frequência média da leitura de 2 lamínulas – 2000 células/concentração

CN: Controle negativo

Tabela 36: Frequência de micronúcleos (MN)/1000* células A549 e índice de divisão nuclear (IDN) da fração solúvel em água de MP₁₀.

	Concentração	Local 1		Local 2		Local 3	
		MN	IDN	MN	IDN	MN	IDN
Primavera	CN	14,5	1,9	14,5	1,8	11,5	1,8
	1,25 m ³	18	1,9	13	1,9	7,5	1,9
	2,5 m ³	24	1,9	18	1,8	13,5	1,8
	5,0 m ³	32,5	1,9	24	1,9	19	1,7
Verão	CN	8	1,8	14,5	2	11,5	2
	1,25 m ³	16,5	1,8	23	2	14,5	1,8
	2,5 m ³	21	1,8	23,5	2	13	1,9
	5,0 m ³	28	1,8	29,5	2	22,5	1,9
Outono	CN	11,5	1,9	11	1,8	11,5	1,7
	1,25 m ³	14	1,9	23	1,7	11,5	1,8
	2,5 m ³	14	1,8	14,5	1,8	20	1,8
	5,0 m ³	11	1,8	20	1,8	22	1,8
Inverno	CN	16,5	1,9	14,5	1,9	20,5	1,7
	1,25 m ³	21	1,9	19,5	1,9	21	1,6
	2,5 m ³	22,5	1,9	23,5	1,9	24,5	1,7
	5,0 m ³	30	1,9	22	1,8	18,5	1,6

*Frequência média da leitura de 2 lamínulas – 2000 células/concentração

CN: Controle negativo

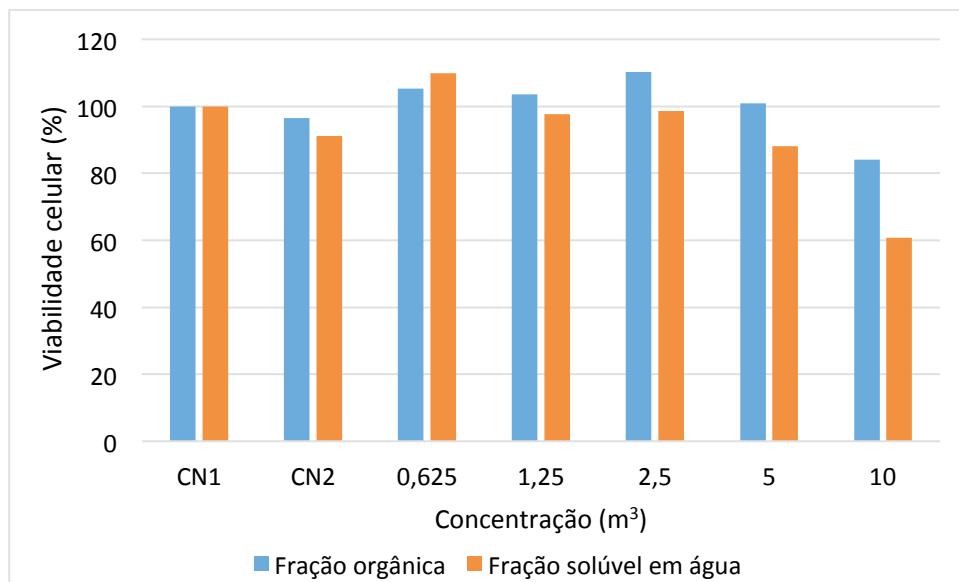


Figura 13: Resultados (porcentagem média) dos ensaios de viabilidade celular pelo método do MTT dos extratos orgânicos e solúveis em água de MP₁₀. CN1: Controle negativo DMEM. CN2: Controle negativos DMEM+0,1% DMSO ou DMEM + água ultrapura.

Os resultados de viabilidade demonstraram que o veículo utilizado para a exposição das células A549 ao MP, tanto da fração orgânica (DMSO) como inorgânica (água ultrapura) não produziu nenhum efeito tóxico sobre as células. Os resultados do controle negativo, meio + veículo (CN2), foram muito semelhantes aos obtidos com as células expostas apenas ao meio suplementado (Figura 13). A dose de 0,625 m^3 foi descartada para o teste de MN, porque os resultados foram semelhantes aos obtidos com os controles negativos e a concentração de 1,25 m^3 . Do mesmo modo, foi determinado que as células não seriam expostas a 10 m^3 no ensaio de MN porque a viabilidade celular foi baixa para algumas amostras (<50%) e poderia representar uma dose tóxica.

A exposição das células A549 a concentrações não citotóxicas dos extratos orgânicos e solúveis em água de MP₁₀ induziu um incremento significativo na frequência de MN em 12 das 24 amostras analisadas (5 orgânicas e 7 hidrossolúveis). Embora algumas amostras não mostraram diferenças estatisticamente significativas comparadas com o controle negativo, a maioria das amostras apresentou um aumento na frequência de MN, especialmente na concentração de 5 m^3 (Figuras 14 e 15).

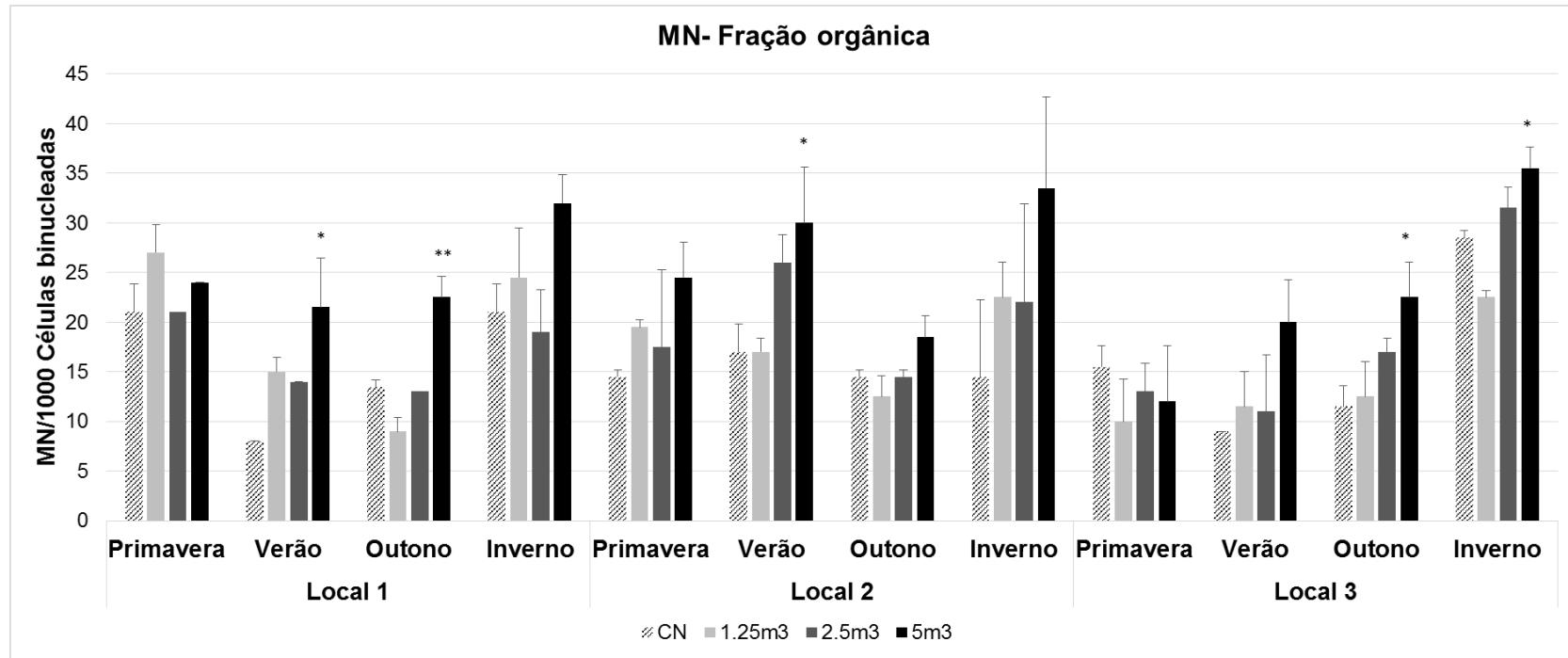


Figura 14: Resultado da frequência de MN em células A549 tratadas com diferentes concentrações de extrato orgânico de MP_{10} em diferentes períodos de coleta e sua significância estatística comparado com o controle negativo (CN: DMEM+0.1% DMSO). ** $p<0,01$; * $p<0,05$.

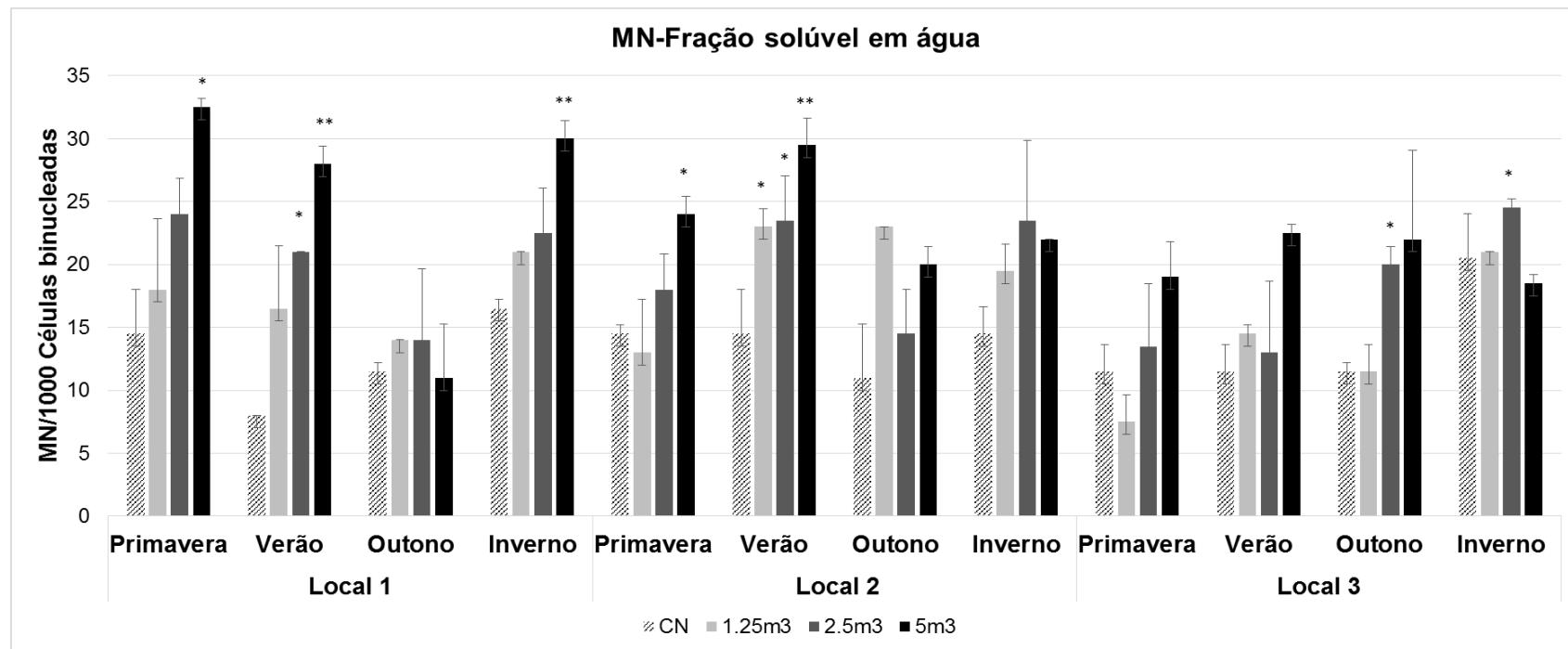


Figura 15: Resultado da frequência de MN em células A549 tratadas com diferentes concentrações de extrato orgânico de MP₁₀ em diferentes períodos de coleta e sua significância estatística comparado com o controle negativo (CN: DMEM+0.1% DMSO). **p<0.01; *p<0.05.

A frequência de MN não apresentou diferenças entre os locais de amostragem nos extratos orgânicos ($p = 0,491$), nem nos extratos hidrossolúveis ($p = 0,135$), bem como no tipo de extrato (L1: $p = 0,915$; L2: $p = 0,677$; L3: $p = 0,464$). Diferente ao relatado por Lepers et al. (2014), onde as amostras coletadas no outono-inverno tinham um potencial genotóxico maior, tanto na indução de micronúcleos em células epiteliais brônquicas humanas BEAS-2B como no ensaio de *Salmonella*/microssoma, neste estudo não foram encontradas diferenças significativas na indução de MN entre as diferentes estações climáticas.

Os efeitos biológicos induzidos pelo MP sobre as células dependem de muitas variáveis como as fontes de emissão (Rosas Pérez et al., 2007), o tamanho da fração (Osornio-Vargas et al., 2003) e a composição química (Baulig et al., 2003; Billet et al., 2008). Várias espécies químicas orgânicas e inorgânicas diferentes podem ser adsorvidas na superfície do MP, e os HPA e metais de transição são particularmente importantes devido a sua toxicidade (Dumax-Vorzet et al., 2015).

A associação entre a frequência de MN e os componentes químicos foi obtida pela correlação ordinal de Spearman (Figura 16). O intervalo dos coeficientes de correlação vai desde -1 a +1, e mede a força da associação entre as variáveis. As concentrações de todos os compostos químicos apresentaram uma correlação positiva significativa com a frequência de MN com um nível de confiança de 95%.

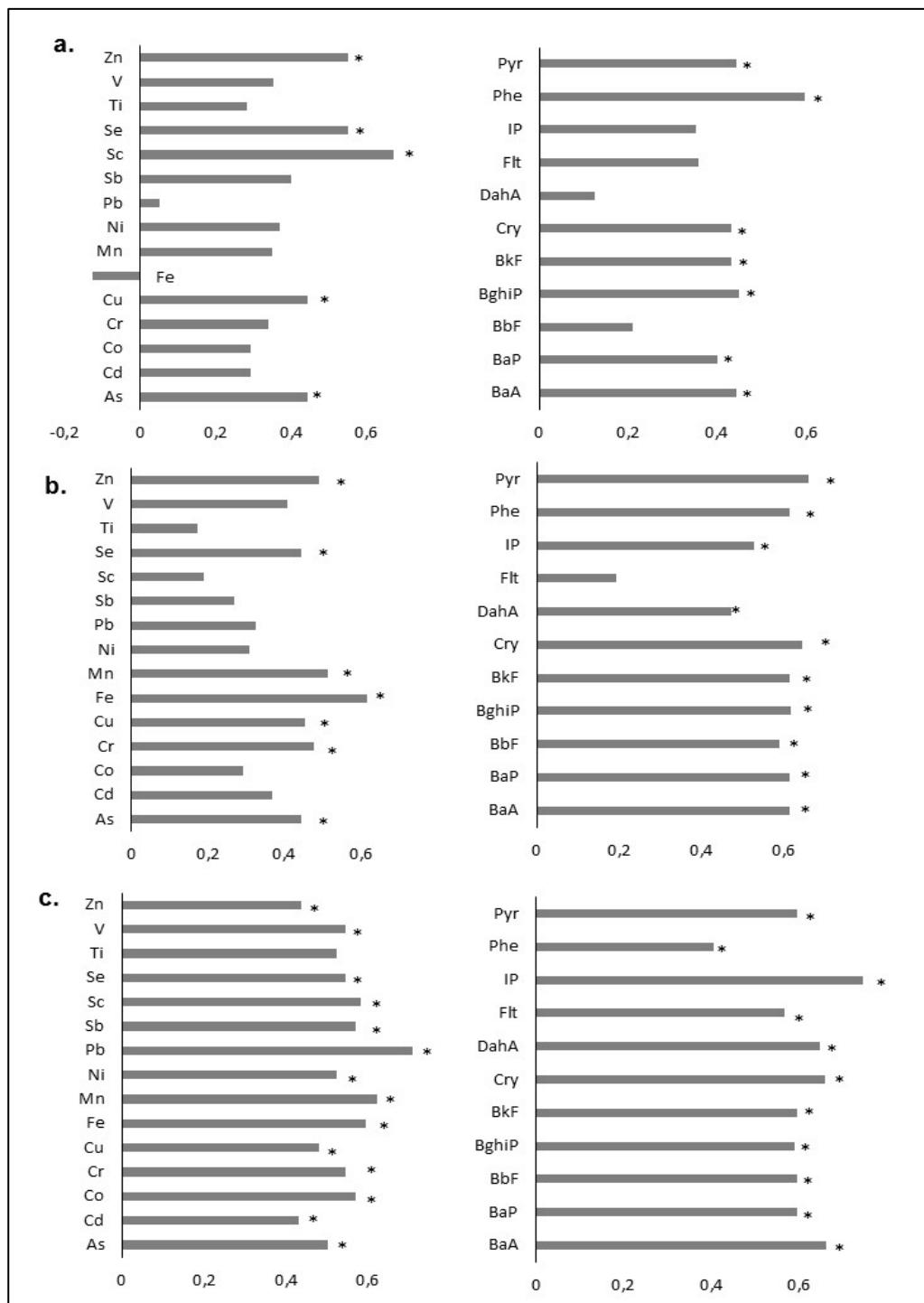


Figura 16: Correlação entre a frequência de MN em células A549 e os compostos orgânicos e hidrossolúveis em: a. Local 1, b. Local 2 e c. Local 3 (*: $p < 0,05$).

Vários estudos têm considerado o dano ao DNA como um “end-point” dos efeitos da poluição do ar (IARC, 2013). Os nossos resultados mostraram que a magnitude dos danos ao DNA induzidos em células A549 depende da concentração dos compostos em cada uma das frações, mas não pode ser relacionado com uma espécie química em particular.

Roubicek et al. (2007) também relataram que amostras de MP₁₀ coletadas na Cidade do México foram capazes de induzir MN em células A549, e que ambas frações, tanto a solúvel em água como a orgânica foram importantes na produção do dano ao DNA. Lepers et al. (2014) mostraram um aumento significativo na frequência de MN em células epiteliais bronquiais humanas BEAS-2B expostas às frações orgânica e inorgânica de MP_{2,5} (15 µg/cm²) coletadas em áreas industriais, urbanas e rurais na França.

A genotoxicidade de misturas orgânicas complexas de MP atmosférico urbano tem sido demonstrada por diferentes ensaios *in vitro* e *in vivo* (André et al., 2010; Bełcik et al., 2014; Chepelev et al., 2015; Pereira et al., 2013; Silva et al., 2015). Os metabólitos reativos dos HPAs são capazes de interagir com as macromoléculas celulares e induzir danos no DNA (Senthilkumar et al., 2014). HPAs associados com o MP têm a capacidade de ativar o receptor arila de hidrocarbonetos (AhR) nas células, resultando num aumento da expressão dos genes regulados por Ahr, incluindo o citocromo P450. Os HPAs são metabolicamente ativados por este sistema de enzimas metabolizadoras de xenobióticos a metabólitos eletrofílicos reativos (REMs). Estes metabólitos provocam diversos efeitos tóxicos nas células, incluindo a produção ou aumento intracelular das espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais reagem com as bio-macromoléculas, tais como lipídios, proteínas e DNA com consequentes efeitos adversos para as células (Feng et al., 2016).

Neste estudo, os HPAs com alto peso molecular foram os mais abundantes em todas as amostras e estes compostos são biologicamente mais potentes (Du Four et al., 2005) que os HPAs de baixo peso molecular. No entanto, estes últimos podem modular a resposta biológica, incrementando ou diminuindo o potencial genotóxico e cancerígeno (White, 2002). Além disso, não se pode desconsiderar a contribuição ao efeito genotóxico observado de outras espécies orgânicas, como os oxi- e nitro-HPAs, as quais não foram identificadas neste estudo.

Vários estudos toxicológicos têm implicado os metais hidrossolúveis como o possível componente prejudicial do MP (Costa e Dreher, 1997; Mugica-Álvarez et al., 2012; Wiseman e Zereini, 2014). Estes pesquisadores encontraram que a fração solúvel em água tem a capacidade de estimular efeitos tóxicos em seres humanos. O potencial genotóxico e carcinogênico dos metais é principalmente dependente do seu estado de oxidação, o

que que afeta a captação, transporte intracelular, distribuição e biodisponibilidade. O padrão geral do modo de ação genotóxico dos metais compreende a indução de estresse oxidativo e danos aos componentes celulares, incluindo o DNA; interferência no sistema de reparação do DNA e interrupção do crescimento e proliferação através de vias de sinalização e a desregulação dos genes supressores de tumores (Annangi et al., 2016). A capacidade dos metais de transição tais como Fe, Co e V para gerar ERO têm sido bem documentada. Em particular, as espécies solúveis em água associadas ao MP atmosférico têm sido identificadas como prioritárias por causa da sua maior biodisponibilidade, e com isso, provavelmente maior potencial tóxico (Wiseman, 2015).

O Fe representa entre 5–58% da concentração total da fração hidrossolúvel das amostras de MP₁₀. O papel das concentrações de ferro no MP é importante por que este elemento está associado com a geração de ERO. Shi et al. (2003) e Karthikeyan et al. (2006) mostraram um alto número de radicais hidroxila em amostras de MP com altas concentrações de Fe hidrossolúvel. O radical hidroxila (OH) representa uma grande preocupação por ser uma espécie reativa altamente eletrolítica conhecida por sua capacidade de atacar o DNA (Jiang et al., 2014). O cobre e o zinco também apresentam altos valores em todas as amostras dos extratos solúveis em água. A atividade genotóxica e oxidativa de Cu e Zn e sua capacidade de induzir alterações genômicas foi demonstrada em outros estudos (Becker et al., 2005; Bonetta et al., 2009; Shuster-Meiseles et al., 2016). A abundância destes elementos no MP do estado de São Paulo é preocupante, uma vez que tem sido relatado que concentrações solúveis de Zn e Cu determinadas em partículas urbanas têm uma maior probabilidade de causar lesões pulmonares e inflamação comparado com outros metais tais como Ni, Pb, e V nas mesmas concentrações (Prieditis e Adamson, 2002).

Em uma pesquisa realizada com extratos orgânicos de MP_{2,5} coletados em dois locais com tráfego moderado e emissões industriais na cidade de Porto Alegre, Brasil, Brito et al. (2013) não observaram um incremento significativo da frequência de MN em células V79. A ausência de resposta genotóxica sugere uma maior sensibilidade das células A549 devido, possivelmente, à sua habilidade para responder a compostos genotóxicos com ação direta e indireta. A linhagem celular A549 tem propriedades das células alveolares tipo II, o que inclui a habilidade de engolir partículas e fibras por endocitose (Stearns et

al., 2001). Segundo Hsiao et al. (2000), diferentes processos de extração e/ou diferentes sistemas de ensaios poderiam produzir resultados diferentes da avaliação da toxicidade da poluição do ar, reforçando a dificuldade da comparação dos estudos que têm estratégias diferentes de avaliação.

A presença de correlações significativas, entretanto fracas ($r<0,60$), entre a frequência de MN e os compostos orgânicos e solúveis em água do MP, demostram as limitações para predizer o potencial genotóxico do MP baseado na concentração de um único composto ou um limitado número de componentes, quando na realidade o material é uma mistura complexa de componentes (Gutiérrez-Castillo et al., 2006), sem mencionar as interações entre eles, com efeitos aditivos, sinérgicos ou antagônicos (Ceretti et al., 2015). A falta de correlação entre a resposta biológica e uma classe específica de compostos químicos nas amostras de MP confirma a necessidade do uso de ensaios biológicos para a avaliação da genotoxicidade de misturas complexas como o MP.

4.2.3.2 Ensaio de *Salmonella*/microssoma - Teste de Ames

As potências mutagênicas (revertentes/ m^3) dos extratos orgânicos e inorgânicos das 12 amostras de MP_{10} são apresentadas nas Tabelas 37 e 38. Excluindo a amostra L2-Primavera da fração solúvel em água, todas as amostras estudadas mostraram uma resposta mutagênica na presença e ausência de ativação metabólica ($\pm S9$), indicando a presença de mutágenos diretos e indiretos nas frações orgânica e solúvel em água.

Tabela 37: Mutagenicidade da fração orgânica de MP₁₀ expressa em revertentes por m³.

Estação	Linhagem	Local 1		Local 2		Local 3	
		rev/m ³	RM	rev/m ³	RM	rev/m ³	RM
Primavera	TA98	83,2	32,1	71,4	32,4	131,9	28,1
	TA98 +S9	18,2	14,8	29,9	20,8	43,7	20,4
	TA100	62,2	3,8	56,3	5,8	69,1	5,7
	TA100 +S9	45,5	3,7	52,3	4,7	54,7	4,6
Verão	TA98	42,6	34,6	152,8	42,5	41,4	21,3
	TA98 +S9	3,8	9,0	14,0	6,6	4,7	7,9
	TA100	27,4	5,4	104,9	7,1	27,8	1,8
	TA100 +S9	23,8	3,2	61,1	4,0	17,8	2,0
Outono	TA98	29,5	27,0	77,0	34,8	25,3	20,0
	TA98 +S9	4,8	5,8	8,1	7,7	10,1	7,7
	TA100	2,7	5,0	70,3	6,3	33,9	4,7
	TA100 +S9	1,6	3,7	33,1	3,9	19,5	3,6
Inverno	TA98	78,3	24,0	135,5	15,9	70,2	24,0
	TA98 +S9	9,3	9,9	16,6	20,5	14,1	10,3
	TA100	68,6	6,2	127,0	8,3	78,8	5,8
	TA100 +S9	15,8	3,9	61,0	6,8	62,5	4,6

RM – razão de mutagenicidade

Tabela 38: Mutagenicidade da fração solúvel em água de MP₁₀ expressa em revertentes por m³.

Estação	Linhagem	Local 1		Local 2		Local 3	
		rev/m3	RM	rev/m3	RM	rev/m3	RM
Primavera	TA98	ND	1,3	0,4	2	0,6	1,7
	TA98 +S9	ND	1,2	ND	1,4	0,4	1,5
	TA100	ND	1,4	2,3	1,9	1,4	1,6
	TA100 +S9	ND	1,3	ND	1,4	2,1	1,6
Verão	TA98	1,1	3,4	1,8	2,4	0,7	1,9
	TA98 +S9	ND	1,6	0,8	1,9	0,4	1,5
	TA100	3,4	2,3	5,0	2,7	2,3	1,5
	TA100 +S9	1,7	1,7	3,4	2,1	2,7	1,6
Outono	TA98	0,5	2,3	0,9	2,8	1,1	3,8
	TA98 +S9	0,3	1,7	ND	1,2	0,8	1,8
	TA100	1,8	2,1	2,1	2,6	3,3	3
	TA100 +S9	2,6	2,0	4,1	1,6	2,6	1,8
Inverno	TA98	0,5	2,7	1,0	2,5	2,1	2,4
	TA98 +S9	0,4	1,8	0,3	1,5	ND	1,3
	TA100	3,1	2,3	3,4	2,5	6,1	2,5
	TA100 +S9	1,7	2,1	2,8	2,1	7,8	2,5

RM – razão de mutagenicidade

ND: atividade mutagênica não detectada nas condições do ensaio.

Embora tenha sido relatado que a mutagenicidade do MP aumenta nos períodos mais frios e decresce no verão (Claxton et al., 2004), não foram encontradas diferenças

estatisticamente significativas na resposta mutagênica entre as estações climáticas nas condições do estudo ($p>0,05$). Estes resultados concordam com o observado por Coronas et al. (2008), que também não encontraram uma clara variação na resposta mutagênica com a linhagem TA98 em amostras de PTS e MP₁₀ coletadas em diferentes estações do ano numa área industrial petroquímica no sul do Brasil. A regressão linear usada para pesquisar a associação entre as concentrações totais de HPAs, metais e MP₁₀ com a resposta biológica, mostrou que não existe uma relação significativa entre as concentrações destes poluentes e o número de revertentes/m³ (Tabela 39).

Tabela 39: Resultado da regressão linear entre as concentrações de MP₁₀, HPAs e metais hidrossolúveis com a resposta mutagênica.

Fração	Fatores	Linhagem	Significância (p)
Orgânica	Concentração MP ₁₀ – Revertentes/m ³	TA98	0,81
		TA98+S9	0,51
		TA100	0,98
		TA100+S9	0,44
		TA98	0,66
	Concentração HPAs (ng/m ³) – Revertentes/m ³	TA98+S9	0,54
		TA100	0,06
		TA100+S9	0,06
		TA98	0,99
	Concentração MP ₁₀ – Revertentes/m ³	TA98+S9	0,33
Solúvel em água		TA100	0,16
		TA100+S9	0,09
		TA98	0,58
	Concentração metais (ng/m ³) – Revertentes/m ³	TA98+S9	0,68
		TA100	0,39
		TA100+S9	0,89

A atividade mutagênica das duas frações estudadas apresenta variações entre as diferentes linhagens bacterianas, como resultado das diferenças na composição química e a sensibilidade relativa das linhagens às diferentes classes de compostos. Enquanto se observou um aumento significativo da resposta de TA98 comparado com TA100 na fração orgânica, um maior número de rev/m³ foi obtido com a linhagem de TA100 para a fração solúvel em agua (Tabela 38). As diferentes respostas das linhagens de *Salmonella* podem colaborar com informação sobre as classes de mutágenos presentes no MP atmosférico, uma vez que ambas linhagens são conhecidas por responder a uma grande variedade de

mutágenos ambientais. Observou-se que a TA98, linhagem com a mutação do quadro de leitura “frameshift” no sitio CpG, é mais sensível aos HPAs (Lepers et al., 2014), aminas aromáticas, heterocíclicas e nitroarenos que a TA100, linhagem com uma mutação de substituição de pares de bases no códon da leucina (Chen e White, 2004).

Apesar de não existirem diferenças estatisticamente significativas (Tabela 40) na resposta mutagênica entre os locais de coleta para a fração orgânica, L2 apresenta um maior número de revertentes/m³ com TA98 e TA100 na presença e ausência de ativação metabólica e L3 na presença de S9. Como foi estabelecido anteriormente, o tráfego de veículos (gasolina e diesel) foi a principal fonte de HPAs nos três locais de coleta. O tráfego também tem sido considerado a fonte mais importante de HPAs entre todas as categorias em muitas áreas metropolitanas neste século (Bortey-Sam et al., 2015). Porém, L2 está localizada numa área industrial influenciada por um complexo petroquímico, o qual é composto por um grupo de companhias que utilizam gás natural e petróleo bruto e seus derivados como matéria prima. Indústrias petroquímicas têm sido apontados como uma das mais importantes fontes antropogênicas de HPAs (Domínguez-Morueco et al., 2015) e fluoranteno (Flt), um dos HPAs mais abundantes em nossas amostras, juntamente com benzo(g,h,i)perileno (BghiP), que também tem sido encontrado em concentrações elevadas em áreas sob influência das emissões petroquímicas como Tarrago em Espanha (Domínguez-Morueco et al., 2015) e Conceição em Chile (Pozo et al., 2012).

Tabela 40: Resultado do teste de Dunnett para comparação das concentrações da resposta mutagênica nos diferentes locais de amostragem.

Fração	Linhagem	Significância (<i>p</i>)
Orgânica	TA98	0,06
	TA98+S9	0,06
	TA100	0,17
	TA100+S9	0,64
Solúvel em água	TA98	0,21
	TA98+S9	0,36
	TA100	0,25
	TA100+S9	0,79

Umbuzeiro et al. (2008b) estudaram a mutagenicidade de extratos orgânicos de PTS, após fracionamento seletivo para a detecção química de HPAs, coletadas em L1 utilizando o teste de Ames com as linhagens TA98 e YG1041, que são especialmente sensíveis para a detecção de nitrocompostos. Contrário aos resultados obtidos neste estudo, estes autores não evidenciaram nenhuma resposta mutagênica com a linhagem TA98. Estas diferenças podem estar relacionadas aos diferentes processos na preparação das amostras. Alguns estudos têm relatado a atividade mutagênica da fração orgânica do MP através do teste de Ames na cidade de São Paulo e outras cidades brasileiras (Alves et al., 2016; Brito et al., 2013; Coronas et al., 2009; Pereira et al., 2010; Sato et al., 1995; Savóia et al., 2009), no entanto comparações entre os resultados obtidos neste estudo e os relatados por outros autores podem não ser significativos devido às diferenças entre os métodos de amostragem, procedimentos analíticos e do tipo de partícula analisada, a maneira em que se apresentam os resultados do ensaio de *Salmonella* e a linhagem utilizada.

Segundo Marvin e Hewitt (2007), aproximadamente entre 55 e 95% da variabilidade inter-laboratorial nos resultados nos ensaios de mutagenicidade de amostras de MP são devidos às diferenças nos métodos analíticos, mais que por diferenças reais no potencial mutagênico das amostras. Além disso, fatores como as características específicas da região onde é realizada a pesquisa (condições meteorológicas e situação geográfica), a taxa de mutação espontânea que é particular de cada linhagem e a sensibilidade de cada linhagem aos poluentes pesquisados devem ser tomados em conta na interpretação dos resultados (Bełcik et al., 2014).

Os HPAs quantificados nas amostras de MP₁₀ são considerados poluentes prioritários pela USEPA e oito deles estão classificados como carcinógenos potenciais segundo a IARC. Dos 16 HPAs, fluoranteno, benzo(a)antrazeno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e indeno(1,2,3-cd)pireno têm demonstrado atividade mutagênica no teste de Ames, enquanto que o benzo(g,h,i)perileno apresentou resultados inconclusivos. As correlações entre os HPAs e a resposta mutagênica para cada local de coleta são apresentados na Figura 17. HPAs de baixo peso molecular (Naph, Ace, Acp, Flu e Ant) não foram incluídos nas análises por apresentarem valores abaixo dos limites de quantificação.

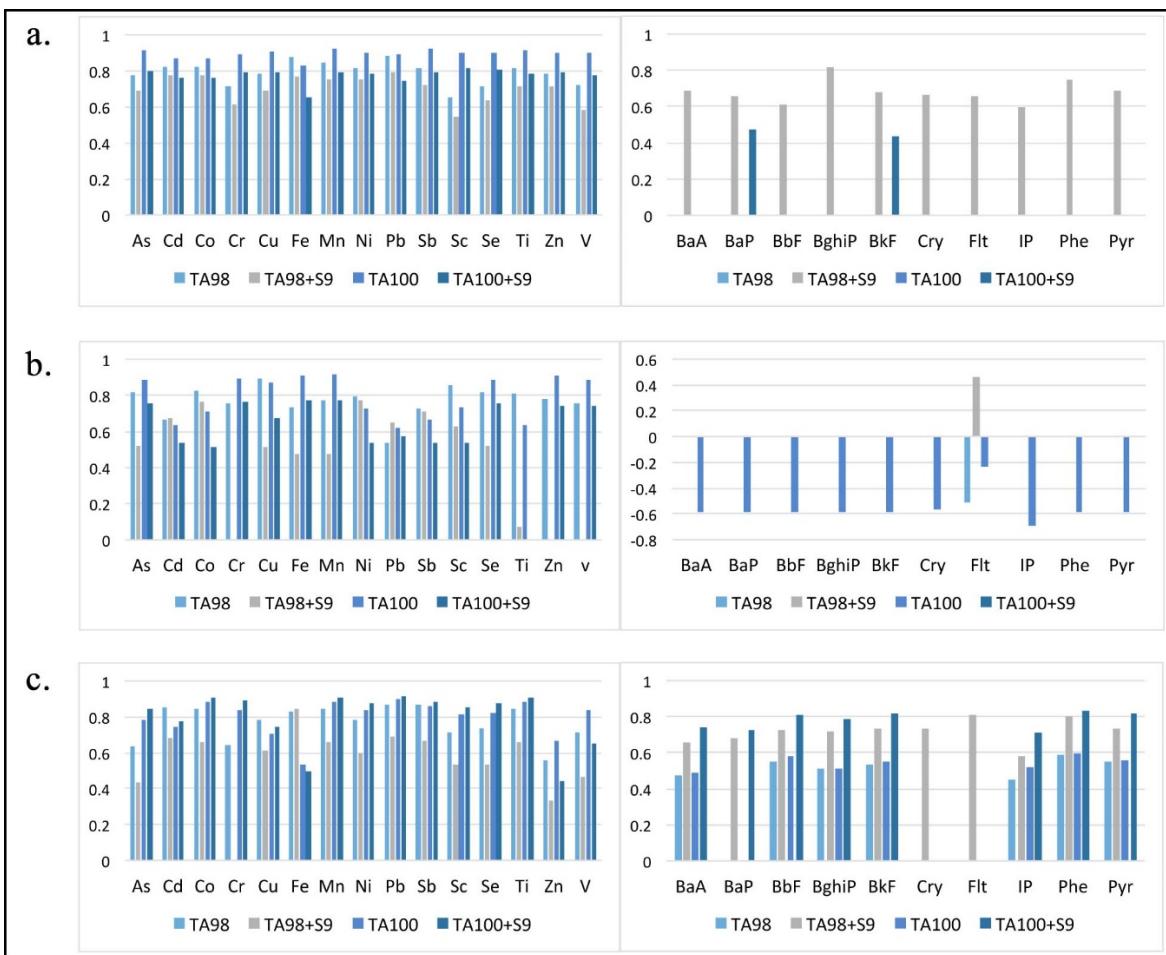


Figura 17: Correlação entre revertentes/ m^3 e os compostos orgânicos e hidrossolúveis em: a. Local 1, b. Local 2 e c. Local 3. As figuras só apresentam as correlações significativas (*: $p < 0,05$).

Em geral, as correlações entre os compostos orgânicos são mais fortes com as linhagens na presença de S9. Este resultado é esperado, já que os HPAs necessitam ser biotransformados para exercer sua atividade mutagênica. As amostras coletadas no Local 1 apresentaram correlações significativamente positivas entre os compostos orgânicos e a linhagem TA98+S9, com coeficientes que variaram entre 0,59 (IP) e 0,82 (BghiP), e entre as concentrações de BaP e BkF com TA100+S9. Na ausência de S9 não houve correlações significativas com os compostos estudados. Nas amostras do Local 2, somente as concentrações de Flu, o HPA mais abundante, apresentaram uma relação significativa e positiva com a resposta biológica observada. Nas amostras coletadas no Local 3 as correlações significativas apresentaram coeficientes mais elevados nas linhagens TA98 e TA100 na presença de ativação metabólica.

Uma redução na mutagenicidade foi observada quando os extratos orgânicos foram expostos a mistura de S9, o que sugere que, embora os HPAs tenham contribuído de uma maneira importante para a mutagenicidade dos compostos orgânicos associados ao MP, eles não foram a classe de mutágenos predominante. Isto significa que a maior atividade mutagênica é devida à presença de outras substâncias que não foram identificadas nas análises químicas realizadas. A maior resposta mutagênica obtida com TA98 sem ativação metabólica demonstra a presença de agentes que atuam diretamente, induzindo mutações do tipo “frameshift”. A presença de agentes mutagênicos diretos em extratos orgânicos de MP tem sido associada principalmente com nitro- e oxi-compostos, que são formados a partir de reações de nitração/oxidação de HPAs parentais com outros compostos na atmosfera ou liberados diretamente na atmosfera pela combustão incompleta de materiais carbonáceos (Franco et al., 2010). Além disso, compostos nitroaromáticos são conhecidos por serem altamente mutagênicos em bactérias, e poderiam ser mais biodisponíveis que os HPAs não substituídos, devido a sua maior polaridade (Maeda et al., 2007). Alves et al. (2016) sugerem que o aumento na formação de nitro-HPAs em amostras MP pode estar relacionado com tempos mais longos de contato entre os compostos aromáticos e a atmosfera com altas concentrações de NOx e ozônio.

Os extratos hidrossolúveis apresentaram resposta mutagênica em onze das doze amostras analisadas. Observou-se um potencial mutagênico maior da fração hidrossolúvel de MP com a linhagem TA100, com uma leve variação no número de revertentes/m³ na presença e ausência da mistura de S9 (Tabela 38) e sem diferenças dependendo da origem ou estação de coleta.

Embora não tenham sido observadas diferenças significativas no potencial mutagênico entre os locais de coleta, a amostra de Inverno-L3 apresentou o maior potencial mutagênico com a linhagem TA100 com e sem S9. As amostras coletadas no Local 1, uma área impactada principalmente pelo tráfego veicular, apresentaram as menores potências mutagênicas frente a todas as condições do ensaio. O Local 3 é localizado em um polo cerâmico do estado de São Paulo, onde estão concentradas um grande número de indústrias cerâmicas. Minguillón et al. (2009) relataram que uma grande quantidade de metais estão presentes nas emissões da produção de cerâmica, os quais provêm da matéria prima utilizada. De acordo com Querol et al. (2007), a grande variedade de

compostos utilizados no processo de elaboração e pigmentação da cerâmica podem causar variações significativas nas emissões deste tipo de indústrias através do ano, o que poderia explicar em parte as grandes diferenças nas concentrações totais de metais hidrossolúveis observadas no Local 3 e a resposta biológica associada.

Poucos estudos têm avaliado a capacidade mutagênica dos extratos hidrossolúveis do MP com o teste de Ames. Lemos et al. (2012) quantificaram a concentração de metais solúveis (Al, V, Cr, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Cd e Pb) e determinaram a capacidade mutagênica de amostras coletadas na cidade de Porto Alegre. Ao contrário de nossos resultados, nenhum dos extratos foi mutagênico e as concentrações médias de metais com conhecida capacidade mutagênica como vanádio, cobre e zinco foram muito mais baixas que as determinadas neste estudo.

A análise de correlação de Spearman mostrou que a resposta mutagênica tanto para a linhagem TA98 como TA100 está fortemente relacionada com as concentrações individuais dos metais hidrossolúveis (Figura 17). Em geral, as maiores correlações foram obtidas entre as concentrações dos metais hidrossolúveis e a resposta mutagênica com TA100 sem ativação metabólica, seguido por TA98 sem ativação metabólica. Os metais são mutágenos diretos, espera-se, portanto, que as relações com a resposta biológica sejam mais fortes na ausência de S9.

A reatividade com o DNA tem sido relatada para elementos determinados nas amostras de MP₁₀ e que apresentaram relação com os resultados do teste de Ames. Alguns autores têm demonstrado a atividade genotóxica e oxidativa de Cu e Zn e sua capacidade para induzir alterações genômicas. A genotoxicidade de compostos de Cu tem sido principalmente avaliada *in vitro*. Resultados positivos têm sido relatados em linhagens de células B linfoblastoides humanas (Alimba et al., 2016) e células HL-60 (células de leucemia promielocítica humana) (Ma et al., 1998). Além disso, Guecheva et al. (2001) relataram genotoxicidade *in vivo* na planária de agua doce, usando o teste do cometa. No mesmo estudo, o Cu inibiu o reparo de DNA.

Compostos de ferro têm sido determinados como mutagênicos em cultura de células de mamífero (Prá et al., 2008). O ferro pode danificar biomoléculas, principalmente, através da reação de Haber-Weiss/Fenton, levando à produção de radicais hidroxila e outras

espécies reativas de oxigénio (ERO) (Prá et al., 2008). De acordo com os perfis publicados pela Agência Americana de Registro de Substâncias Tóxicas e Doenças (Agency for Toxic Substances and Disease Registry – ATSDR), V, Cu e Pb mostraram genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* e Ni e Zn apresentaram evidências de clastogenicidade (ASTDR, 2015).

Embora o potencial mutagênico tenha sido muito menor na fração solúvel em água comparado com a fração orgânica, os resultados indicam que qualquer alteração em nível genético deve ser considerada para permitir a detecção precoce de poluentes ambientais e minimizar os danos para a população exposta. Perturbações do material genético são deletérios para o organismo e podem levar a sérias e irreversíveis consequências na saúde (Kaur et al., 2012). Tem sido comprovado que exposições crônicas a baixas concentrações de MP pode causar danos no DNA que podem levar à morte celular ou desencadear o processo primário de muitas doenças, especialmente câncer. De fato, uma correlação elevada (77–90%) foi encontrada entre uma resposta mutagênica positiva no ensaio de *Salmonella*/microssoma e carcinogênese em roedores (Lemos et al., 2012). Esta situação é particularmente preocupante na América Latina, onde as taxas de mutagenicidade são significativamente maiores comparadas com resultados obtidos na Europa e Estados Unidos (Claxton et al., 2004).

5. CONCLUSÕES

Neste estudo, a mutagenicidade de amostras de material particulado de ar coletado em três locais diferentes do estado de São Paulo foi avaliada. Foram determinados quimicamente os 16 HPAs considerados prioritários pela USEPA e 15 metais nas frações orgânica e solúvel em água, respectivamente, do material particulado (MP_{10}) coletado. As amostras foram agrupadas por estação do ano e os ensaios de mutagenicidade avaliaram mutações de ponto, por meio do teste de *Salmonella*/microssoma e mutações cromossômicas, verificando-se a indução de micronúcleos em células A549 de adenocarcinoma humano, metabolicamente competentes.

Embora os metais solúveis em água sejam uma parte fundamental dos poluentes atmosféricos e sua determinação na fração total de material particulado seja um parâmetro importante na avaliação dos efeitos sobre a saúde humana e o ambiente, até o momento não há na literatura muitos estudos que avaliem seus efeitos genotóxicos. Além disso, há pouca referência à avaliação de técnicas de extração desta fração do material particulado de ar.

Os resultados sobre a composição química e mutagenicidade de diferentes amostras de material particulado atmosférico e do material de referência SRM 1648a, analisadas na etapa 1 deste trabalho, mostraram que a extração assistida por micro-ondas, em comparação com o método convencional de extração em banho de ultrassom, é mais eficiente para a fração solúvel em água, tanto para PTS como MP_{10} . Este processo também é mais eficiente em termos de tempo e garante reproduzibilidade, já que as condições do equipamento são controladas, o que também facilita a comparação dos resultados entre diferentes pesquisas.

Até o presente, este estudo é o primeiro reporte sobre a estabilidade química e biológica dos extratos solúveis em água de material particulado de ar mantidos a -20°C. De acordo com os resultados obtidos, mesmo considerando que apenas uma amostra de MP_{10} tenha sido avaliada, verificou-se que não é recomendável realizar análises de mutagenicidade em amostras estocadas nesta condição por um período superior a 60 dias após extração.

A composição química dos extratos orgânicos de MP₁₀ mostrou-se influenciada pelas condições meteorológicas (estações climáticas), apresentando concentrações maiores de HPAs nos meses mais frios do ano nas três estações de coleta. Não foram observadas, porém, diferenças entre os locais estudados. Os resultados evidenciam que o tráfego veicular teve um impacto maior na emissão destes poluentes que as fontes antrópicas características de cada local em particular, o que concorda com o relatado em outras áreas urbanas no mundo e com as concentrações de Flt e BghiP, os HPAs mais abundantes nas amostras de MP₁₀, que são usados como indicadores de emissões veiculares.

Os HPAs com elevado peso molecular, que incluem todas as espécies prováveis ou possivelmente carcinogênicas para humanos, foram os mais abundantes em todas as amostras estudadas. O HPA que mais contribuiu com o risco potencial carcinogênico (BaP-TEQ) e mutagênico (BaP-MEQ) foi o benzo(K)fluoranteno (BkF). Embora os valores equivalentes ao BaP tenham sido menores aos determinados em cidades altamente poluídas, os resultados deste estudo foram mais altos que os encontrados em outras áreas urbanas com alto tráfego veicular.

Ao contrário dos resultados obtidos na fração orgânica, os metais hidrossolúveis não apresentaram diferenças significativas entre os períodos de coleta, mas sim entre os locais, mostrando concentrações maiores no Local 2, uma área influenciada pela indústria petroquímica (refinarias de combustível pesado).

Os elementos mais abundantes determinados na fração hidrossolúvel foram Zn, Cu e Fe, os quais ocorrem tipicamente em concentrações altas no ambiente. Zinco e cobre estão fortemente associados com o fluxo veicular e o ferro é um constituinte natural do material geológico.

Os altos valores dos coeficientes de correlação entre a maioria dos metais sugerem uma fonte de emissão comum, entretanto não foi possível identificar uma fonte específica de emissão. Tampouco foi possível discriminar os locais estudados pela composição química do MP, pois as espécies químicas se mostraram altamente variáveis no espaço e no tempo.

A avaliação da genotoxicidade induzida por misturas complexas como o MP e os fatores responsáveis pelo efeito biológico continua sendo um dos grandes desafios na mutagênese ambiental. Nossos resultados demonstraram que tanto a fração orgânica como solúvel em água são fatores críticos ao dano ao DNA.

Em geral, os dados de correlação entre o potencial genotóxico e a composição química das amostras MP₁₀ demonstram que as diferenças na composição química do MP tiveram um papel importante na indução ao dano do DNA. Contudo é importante ressaltar que a resposta biológica não pode ser explicada pela presença de um só grupo de espécies químicas e a contribuição individual dos diferentes constituintes químicos no dano genético é difícil de avaliar pela complexidade do material particulado e as interações dos compostos nos sistemas biológicos.

O uso de MN como um marcador de dano genético no monitoramento do ar permite a detecção precoce dos possíveis efeitos nocivos à saúde dos poluentes ambientais. As células A549 demonstraram ser um instrumento valioso na avaliação da indução de micronúcleos pela poluição atmosférica, apresentando sensibilidade tanto aos mutágenos diretos como aos que atuam de forma indireta. Também se mostrou ótima ferramenta para a avaliação da fração hidrossolúvel do material particulado.

Na avaliação da mutagenicidade pelo teste de *Salmonella*/microssoma, a linhagem TA98 na ausência de ativação metabólica mostrou potências mutagênicas mais elevadas nos extratos orgânicos de MP₁₀. De acordo com este resultado, pode-se afirmar que, embora os HPAs avaliados tenham contribuído significativamente com a atividade mutagênica observada, compostos não determinados nas análises químicas, como nitro- e oxi-compostos, podem ter papel mais importante no efeito biológico observado na fração orgânica de MP. Um aumento da sensibilidade da linhagem TA100 foi evidenciado na fração solúvel em água, devido às diferenças na composição química das amostras.

Em geral, apenas o efeito genotóxico da fração orgânica do MP é avaliado. No entanto, os resultados deste estudo demonstram que a fração solúvel em água pode ter um efeito relevante sobre as populações expostas e sua avaliação deve ser considerada em estudos de qualidade do ar.

A ausência de correlação entre a concentração total de MP₁₀, HPAAs e metais hidrossolúveis com a resposta genotóxica demonstra que a concentração do MP é um indicador muito fraco da toxicidade deste poluente em áreas urbanas e ratifica a importância do uso de bioensaios na avaliação da genotoxicidade de misturas complexas como o MP.

O uso de marcadores de danos genéticos no monitoramento da qualidade do ar permite a detecção precoce de poluentes ambientais e pode ser usado por órgãos ambientais de controle da poluição atmosférica como uma ferramenta relativamente simples para a verificação das contaminação e também da efetividade de políticas públicas implementadas a longo prazo, uma vez que estes testes servem como indicadores de uma maior ou menor presença de compostos no ambiente atmosférico capazes de causar efeitos adversos para a saúde.

Estratégias regulatórias, que incluem a caracterização química e toxicológica do MP seriam provavelmente mais eficientes para evitar efeitos adversos à saúde do que os atuais critérios que consideram apenas a concentração total de MP₁₀.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUDELO-CASTAÑEDA, D. M.; TEIXEIRA, E. C. Seasonal changes, identification and source apportionment of PAH in PM1.0. **Atmospheric Environment**, v. 96, p. 186–200, 2014.
- ALIMBA, C. G. et al. Genotoxicity and cytotoxicity of chromium, copper, manganese and lead, and their mixture in WIL2-NS human B lymphoblastoid cells is enhanced by folate depletion. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 798-799, p. 35–47, mar. 2016.
- ALLEN, A. G. et al. Size distributions of trace metals in atmospheric aerosols in the United Kingdom. **Atmospheric Environment**, v. 35, n. 27, p. 4581–4591, set. 2001.
- ALVES, D. K. M. et al. Mutagenicity profile of atmospheric particulate matter in a small urban center subjected to airborne emission from vehicle traffic and sugar cane burning. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 57, n. 1, p. 41–50, jan. 2016.
- ALVES, N. O. et al. Biomass burning in the Amazon region: Aerosol source apportionment and associated health risk assessment. **Atmospheric Environment**, v. 120, p. 277–285, 2015.
- ALVES, N. O. et al. Genetic damage of organic matter in the Brazilian Amazon: A comparative study between intense and moderate biomass burning. **Environmental Research**, v. 130, p. 51–58, abr. 2014.
- ALVES, N. O. et al. Genotoxicity and composition of particulate matter from biomass burning in the eastern Brazilian Amazon region. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 5, p. 1427–1433, jul. 2011.
- AMADOR-MUÑOZ, O. et al. Solvent extracted organic matter and polycyclic aromatic hydrocarbons distributed in size-segregated airborne particles in a zone of México City: Seasonal behavior and human exposure. **Atmospheric Environment**, v. 44, n. 1, p. 122–130, jan. 2010.
- ANDERSON, J. O.; THUNDIYIL, J. G.; STOLBACH, A. Clearing the air: a review of the effects of particulate matter air pollution on human health. **Journal of medical toxicology : official journal of the American College of Medical Toxicology**, v. 8, n. 2, p. 166–175, jun. 2012.

ANDRADE, S. J. et al. Mutagenic activity of airborne particulate matter (PM10) in a sugarcane farming area (Araraquara city, southeast Brazil). **Environmental Research**, v. 111, n. 4, p. 545–550, maio 2011.

ANDRÉ, V. et al. Mutagenicity and genotoxicity of PM2.5 issued from an urban-industrialized area of Dunkerque (France). **Journal of Applied Toxicology**, v. 31, n. 2, p. 131-138, 4 ago. 2010.

ANNANGI, B. et al. Biomonitoring of humans exposed to arsenic, chromium, nickel, vanadium, and complex mixtures of metals by using the micronucleus test in lymphocytes. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, mar. 2016.

ARAIN, M. B. et al. Speciation of heavy metals in sediment by conventional, ultrasound and microwave assisted single extraction methods: A comparison with modified sequential extraction procedure. **Journal of Hazardous Materials**, v. 154, n. 1-3, p. 998–1006, jun. 2008.

ASTDR. **Toxicological Profiles**. Disponível em:
<www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/index.asp>. Acesso em: 8 nov. 2015.

AZIMI, S. et al. Sources, distribution and variability of hydrocarbons and metals in atmospheric deposition in an urban area (Paris, France). **Science of The Total Environment**, v. 337, n. 1-3, p. 223–239, jan. 2005.

BAJA, E. S. et al. Traffic-related air pollution and QT interval: Modification by diabetes, obesity, and oxidative stress gene polymorphisms in the normative aging study. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, n. 6, p. 840–846, 2010.

BAL, W.; KASPRZAK, K. S. Induction of oxidative DNA damage by carcinogenic metals. **Toxicology Letters**, v. 127, n. 1-3, p. 55–62, 28 fev. 2002.

BARALE, R. et al. Correlations between 15 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) and the mutagenicity of the total PAH fraction in ambient air particles in La Spezia (Italy). **Mutation Research**, v. 249, n. 1, p. 227–241, jul. 1991.

BARRA, R.; CASTILLO, C.; TORRES, J. P. M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the South American environment. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 191, p. 1–22, 2007.

BARRETT, K. et al. **Air pollution by benzene , carbon monoxide , PAHs , and heavy metals**ETC/ACC Technical Paper 2008/12. Bilthoven, The Netherlands, 2008.

- BAULIG, A. et al. Biological effects of atmospheric particles on human bronchial epithelial cells. Comparison with diesel exhaust particles. **Toxicology in Vitro**, v. 17, n. 5-6, p. 567–573, out. 2003.
- BECKER, S. et al. Seasonal variations in air pollution particle-induced inflammatory mediator release and oxidative stress. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 8, p. 1032–1038, ago. 2005.
- BEŁCIK, M. et al. Mutagenicity of organic pollutants adsorbed on suspended particulate matter in the center of Wrocław (Poland). **Atmospheric Environment**, v. 95, p. 620–628, out. 2014.
- BERNSTEIN, L. et al. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. **Mutation Research**, v. 97, n. 4, p. 267–281, ago. 1982.
- BEYERSMANN, D.; HARTWIG, A. Carcinogenic metal compounds: Recent insight into molecular and cellular mechanisms. **Archives of Toxicology**, v. 82, n. 8, p. 493–512, 2008.
- BILLET, S. et al. Genotoxic potential of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons-coated onto airborne Particulate Matter (PM2.5) in human lung epithelial A549 cells. **Cancer Letters**, v. 270, n. 1, p. 144–155, 2008.
- BIRMILI, W. et al. Trace Metal Concentrations and Water Solubility in Size-Fractionated Atmospheric Particles and Influence of Road Traffic. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 4, p. 1144–1153, fev. 2006.
- BONETTA, S. et al. Application of semipermeable membrane device (SPMD) to assess air genotoxicity in an occupational environment. **Chemosphere**, v. 75, n. 11, p. 1446–1452, jun. 2009.
- BORTEY-SAM, N. et al. Levels, potential sources and human health risk of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in particulate matter (PM(10)) in Kumasi, Ghana. **Environmental Science and Pollution Research International**, v. 22, n. 13, p. 9658–9667, jul. 2015.
- BOUROTTÉ, C. et al. A wintertime study of PAHs in fine and coarse aerosols in São Paulo city, Brazil. **Atmospheric Environment**, v. 39, n. 21, p. 3799–3811, jul. 2005.
- BOUROTTÉ, C. et al. Association between ionic composition of fine and coarse aerosol soluble fraction and peak expiratory flow of asthmatic patients in São Paulo city (Brazil). **Atmospheric Environment**, v. 41, n. 10, p. 2036–2048, mar. 2007.

BRENNER, F. W. et al. *Salmonella* nomenclature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 7, p. 2465–7, jul. 2000.

BRITO, K. C. T. DE et al. Comparative genotoxicity of airborne particulate matter (PM2.5) using *Salmonella*, plants and mammalian cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 94, p. 14–20, 2013.

BRITS, E.; SCHOETERS, G.; VERSCHAEVE, L. Genotoxicity of PM10 and extracted organics collected in an industrial, urban and rural area in Flanders, Belgium. **Environmental Research**, v. 96, n. 2, p. 109–118, 2004.

BUSCHINI, A. et al. Urban airborne particulate: Genotoxicity evaluation of different size fractions by mutagenesis tests on microorganisms and comet assay. **Chemosphere**, v. 44, n. 8, p. 1723–1736, 2001.

CALLÉN, M. S. et al. Nature and sources of particle associated polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the atmospheric environment of an urban area. **Environmental Pollution**, v. 183, p. 166–174, dez. 2013.

CANEПARI, S. et al. Ultrasound and microwave-assisted extraction of metals from sediment: A comparison with the BCR procedure. **Talanta**, v. 66, n. 5, p. 1122–1130, 2005.

CAPELO, J. L.; MADURO, C.; VILHENA, C. Discussion of parameters associated with the ultrasonic solid-liquid extraction for elemental analysis (total content) by electrothermal atomic absorption spectrometry. An overview. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 12, n. 3, p. 225–232, 2005.

CARICCHIA, A. M.; CHIavarini, S.; PEZZA, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban atmospheric particulate matter in the city of Naples (Italy). **Atmospheric Environment**, v. 33, n. 23, p. 3731–3738, out. 1999.

CARRERAS, H. A. et al. Composition and mutagenicity of PAHs associated with urban airborne particles in Córdoba, Argentina. **Environmental Pollution**, v. 178, p. 403–410, 2013.

CASTRO, D. et al. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate samples by microwave-assisted extraction and liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 4, p. 501–10, fev. 2009.

CERETTI, E. et al. Monitoring of volatile and non-volatile urban air genotoxins using bacteria, human cells and plants. **Chemosphere**, v. 120, p. 221–9, fev. 2015.

- CHEN, G.; WHITE, P. A. The mutagenic hazards of aquatic sediments: A review. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 567, n. 2-3 SPEC. ISS., p. 151–225, 2004.
- CHEN, L. et al. Application of on-line microwave sample-preparation techniques. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n. 2, p. 151–159, 2008.
- CHEN, Y. et al. Evidence on the impact of sustained exposure to air pollution on life expectancy from China's Huai River policy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 32, p. 12936–12941, 2013.
- CHENG, Y. W. et al. Genotoxicity of motorcycle exhaust particles in vivo and in vitro. **Toxicological Sciences**, v. 81, n. 1, p. 103–111, 2004.
- CHEPELEV, N. L. et al. Neurotoxicity may be an overlooked consequence of benzo[a]pyrene exposure that is relevant to human health risk assessment. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 764, p. 64–89, 2015.
- CIGANEK, M. et al. A combined chemical and bioassay analysis of traffic-emitted polycyclic aromatic hydrocarbons. **Science of The Total Environment**, v. 334-335, p. 141–148, dez. 2004.
- CINCINELLI, A. et al. Gas-particle concentration and distribution of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmosphere of Prato (Italy). **Chemosphere**, v. 68, n. 3, p. 472–8, jun. 2007.
- CLAXTON, L. D. et al. Guide for the *Salmonella typhimurium*/mammalian microsome tests for bacterial mutagenicity. **Mutation Research**, v. 189, n. 2, p. 83–91, out. 1987.
- CLAXTON, L. D. The history, genotoxicity, and carcinogenicity of carbon-based fuels and their emissions. Part 3: Diesel and gasoline. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 763, p. 30–85, jan. 2015a.
- CLAXTON, L. D. The history, genotoxicity and carcinogenicity of carbon-based fuels and their emissions. Part 4: Alternative fuels. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 763, p. 86–102, jan. 2015b.
- CLAXTON, L. D.; MATTHEWS, P. P.; WARREN, S. H. The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: *Salmonella* mutagenicity. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 567, n. 2-3 SPEC. ISS., p. 347–399, 2004.

CLAXTON, L. D.; WOODALL, G. M. A review of the mutagenicity and rodent carcinogenicity of ambient air. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 636, n. 1-3, p. 36–94, 2007.

CORONAS, M. V. et al. Genetic biomonitoring of an urban population exposed to mutagenic airborne pollutants. **Environment International**, v. 35, n. 7, p. 1023–1029, out. 2009.

CORONAS, M. V. et al. Mutagenic activity of airborne particulate matter in a petrochemical industrial area. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 650, n. 2, p. 196–201, 29 fev. 2008.

CORRÊA, A. X. R. et al. Genotoxicity assessment of particulate matter emitted from heavy-duty diesel-powered vehicles using the *in vivo* *Vicia faba* L. micronucleus test. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 127, p. 199–204, maio 2016.

COSTA, D. L.; DREHER, K. L. Bioavailable transition metals in particulate matter mediate cardiopulmonary injury in healthy and compromised animal models. **Environmental Health Perspectives**, v. 105 Suppl, n. September, p. 1053–1060, 1997.

DABEK-ZLOTORZYNSKA, E. et al. Canadian National Air Pollution Surveillance (NAPS) PM2.5 speciation program: Methodology and PM2.5 chemical composition for the years 2003–2008. **Atmospheric Environment**, v. 45, n. 3, p. 673–686, jan. 2011.

DALLAROSA, J. et al. Study of the chemical elements and polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particles of PM10 and PM2.5 in the urban and rural areas of South Brazil. **Atmospheric Research**, v. 89, n. 1-2, p. 76–92, jul. 2008.

DANIELSEN, P. H.; LOFT, S.; MØLLER, P. DNA damage and cytotoxicity in type II lung epithelial (A549) cell cultures after exposure to diesel exhaust and urban street particles. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 5, p. 6, 2008.

DE MARTINIS, B. S. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons in a bioassay-fractionated extract of PM 10 collected in São Paulo, Brazil. **Atmospheric Environment**, v. 36, p. 307–314, 2002.

DEMETRIOU, C. A.; VINEIS, P. Carcinogenicity of ambient air pollution: Use of biomarkers, lessons learnt and future directions. **Journal of Thoracic Disease**, v. 7, n. 1, p. 67–95, 2015.

- DESBOEUF, K. V. et al. Dissolution and solubility of trace metals from natural and anthropogenic aerosol particulate matter. ***Chemosphere***, v. 58, n. 2, p. 195–203, 2005.
- DOMÍNGUEZ-MORUECO, N. et al. Monitoring PAHs in the petrochemical area of Tarragona County, Spain: comparing passive air samplers with lichen transplants. ***Environmental Science and Pollution Research***, 22 out. 2015.
- DREHER, K. L. Particulate matter physicochemistry and toxicology: In search of causality - A critical perspective. ***Inhalation Toxicology***, v. 12, n. Suppl 3, p. 45–57, 2000.
- DU FOUR, V. A. et al. Genotoxic and mutagenic activity of environmental air samples from different rural, urban and industrial sites in Flanders, Belgium. ***Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis***, v. 588, n. 2, p. 106–117, 2005.
- DU, Y. et al. Health Risk Assessment of Heavy Metals in Road Dusts in Urban Parks of Beijing, China. ***Procedia Environmental Sciences***, v. 18, p. 299–309, 2013.
- DUBEY, J.; MAHARAJ KUMARI, K.; LAKHANI, A. Chemical characteristics and mutagenic activity of PM2.5 at a site in the Indo-Gangetic plain, India. ***Ecotoxicology and Environmental Safety***, v. 114, p. 75–83, abr. 2015.
- DUCATTI, A.; VARGAS, V. M. F. Mutagenic activity of airborne particulate matter as an indicative measure of atmospheric pollution. ***Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis***, v. 540, n. 1, p. 67–77, 9 set. 2003.
- DUMAX-VORZET, A. F. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of urban particulate matter in mammalian cells. ***Mutagenesis***, v. 30, n. 5, p. 621–633, set. 2015.
- DURANT, J. L. et al. Human cell mutagenicity of oxygenated, nitrated and unsubstituted polycyclic aromatic hydrocarbons associated with urban aerosols. ***Mutation Research***, v. 371, n. 3-4, p. 123–57, 20 dez. 1996.
- DURANT, J. L. et al. Mutagenicity of C24H14 PAH in human cells expressing CYP1A1. ***Mutation Research***, v. 446, n. 1, p. 1–14, 29 out. 1999.
- FENECH, M. Chromosomal biomarkers of genomic instability relevant to cancer. ***Drug Discovery Today***, v. 7, n. 22, p. 1128–1137, 2002.
- FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. ***Nature Protocols***, v. 2, n. 5, p. 1084–1104, maio 2007.

FENECH, M. et al. Intra- and inter-laboratory variation in the scoring of micronuclei and nucleoplasmic bridges in binucleated human lymphocytes: Results of an international slide-scoring exercise by the HUMN project. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 534, n. 1-2, p. 45–64, 2003.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 81–95, 2000.

FENG, S. et al. The health effects of ambient PM2.5 and potential mechanisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 128, p. 67–74, jun. 2016.

FERNÁNDEZ ESPINOSA, A. J. et al. A chemical speciation of trace metals for fine urban particles. **Atmospheric Environment**, v. 36, n. 5, p. 773–780, 2002.

FRAMPTON, M. W. et al. Effects of aqueous extracts of PM(10) filters from the Utah valley on human airway epithelial cells. **The American Journal of Physiology**, v. 277, n. 5 Pt 1, p. L960–L967, 1999.

FRANCO, A. et al. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons derivatives and mutagenicity study in extracts of PM10 collected in São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 23, n. 1-2, p. 1–10, 2010.

FROEHNER, S. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in airborne particulate matter in Curitiba, Brazil and benzo(a)pyrene toxic equivalency factors (TEFs). **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 45, n. 11, p. 1347–1352, 12 ago. 2010.

GAGA, E. O. et al. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in an industrialized city, Kocaeli, Turkey: study of seasonal variations, influence of meteorological parameters and health risk estimation. **Journal of environmental monitoring : JEM**, v. 14, n. 8, p. 2219–2229, ago. 2012.

GÓMEZ ARIZA, J. et al. Stability of chemical species in environmental matrices. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 19, n. 2-3, p. 200–209, mar. 2000.

GUALTIERI, M. et al. Differences in cytotoxicity versus pro-inflammatory potency of different PM fractions in human epithelial lung cells. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 1, p. 29–39, fev. 2010.

GUARIEIRO, L. L. N.; GUARIEIRO, A. L. N. Vehicle Emissions: What Will Change with Use of Biofuel? In: **Biofuels - Economy, Environment and Sustainability**. [s.l.] InTech, 2013. p. 1–30.

- GUECHEVA, T.; HENRIQUES, J. A. ; ERDTMANN, B. Genotoxic effects of copper sulphate in freshwater planarian in vivo, studied with the single-cell gel test (comet assay). **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 497, n. 1-2, p. 19–27, out. 2001.
- GUO, H. et al. Particle-associated polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air of Hong Kong. **Atmospheric Environment**, v. 37, n. 38, p. 5307–5317, dez. 2003.
- GUTIÉRREZ-CASTILLO, M. E. et al. Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 47, n. 3, p. 199–211, abr. 2006.
- HALEK, F.; NABI, G.; KAVOUSI, A. Polycyclic aromatic hydrocarbons study and toxic equivalency factor (TEFs) in Tehran, IRAN. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 143, n. 1-3, p. 303–311, 7 ago. 2008.
- HANEDAR, A. et al. Toxicity evaluation and source apportionment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) at three stations in Istanbul, Turkey. **Science of The Total Environment**, v. 488-489, n. 1, p. 437–446, ago. 2014.
- HEAL, M. R. et al. Total and water-soluble trace metal content of urban background PM10, PM2.5 and black smoke in Edinburgh, UK. **Atmospheric Environment**, v. 39, n. 8, p. 1417–1430, mar. 2005.
- HEDDLE, J. A et al. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 18, n. 4, p. 277–291, 1991.
- HONG, H. et al. Seasonal variation of PM10-bound PAHs in the atmosphere of Xiamen, China. **Atmospheric Research**, v. 85, n. 3-4, p. 429–441, set. 2007.
- HSIAO, W. L. et al. Cytotoxicity of PM(2.5) and PM(2.5--10) ambient air pollutants assessed by the MTT and the Comet assays. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 471, n. 1-2, p. 45–55, 20 nov. 2000.
- HUANG, W. et al. Heavy metals in particulate and colloidal matter from atmospheric deposition of urban Guangzhou, South China. **Marine Pollution Bulletin**, v. 85, n. 2, p. 720–726, ago. 2014.

IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Ingested nitrate and nitrite, and cyanobacterial peptide toxins. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer**, v. 94, p. v-vii, 1–412, 2010.

IARC WORKING GROUP ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC RISKS TO HUMANS. Outdoor Air Pollution. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer**, v. 109, p. 454, 2015.

IARC. **Air pollution and cancer**. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2013.

JANG, E.; ALAM, M. S.; HARRISON, R. M. Source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air using positive matrix factorization and spatial distribution analysis. **Atmospheric Environment**, v. 79, p. 271–285, nov. 2013.

JIANG, H. et al. Metabolism of Benzo[a]pyrene in Human Bronchoalveolar H358 Cells Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometry. **Chemical Research in Toxicology**, v. 20, n. 9, p. 1331–1341, set. 2007.

JIANG, S. Y. N. et al. Water solubility of metals in coarse PM and PM2.5 in typical urban environment in Hong Kong. **Atmospheric Pollution Research**, v. 5, n. 2, p. 236–244, abr. 2014.

JOHANSSON, C.; NORMAN, M.; GIDHAGEN, L. Spatial & temporal variations of PM10 and particle number concentrations in urban air. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 127, n. 1-3, p. 477–487, 28 fev. 2007.

JUNG, K. H. et al. Assessment of Benzo(a)pyrene-equivalent Carcinogenicity and mutagenicity of residential indoor versus outdoor polycyclic aromatic hydrocarbons exposing young children in New York city. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 5, p. 1889–1900, 2010.

JUNG, M. H. et al. Genotoxic effects and oxidative stress induced by organic extracts of particulate matter (PM10) collected from a subway tunnel in Seoul, Korea. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 749, n. 1-2, p. 39–47, dez. 2012.

JYETHI, D. S.; KHILLARE, P. S.; SARKAR, S. Particulate phase polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient atmosphere of a protected and ecologically sensitive area in a tropical megacity. **Urban Forestry & Urban Greening**, v. 13, n. 4, p. 854–860, 2014.

KADO, N. Y. et al. Mutagenicity of fine (less than 2.5 microns) airborne particles: diurnal variation in community air determined by a *Salmonella* micro preincubation (microsuspension) procedure. **Environmental mutagenesis**, v. 8, n. 1, p. 53–66, 1986.

KÄFFER, M. I. et al. Use of bioindicators to evaluate air quality and genotoxic compounds in an urban environment in Southern Brazil. **Environmental Pollution**, v. 163, p. 24–31, 2012.

KAKKAR, P.; JAFFERY, F. N. Biological markers for metal toxicity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 19, n. 2, p. 335–349, fev. 2005.

KARLSSON, H. L.; NYGREN, J.; MÖLLER, L. Genotoxicity of airborne particulate matter: The role of cell-particle interaction and of substances with adduct-forming and oxidizing capacity. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 565, n. 1, p. 1–10, 2004.

KARTHIKEYAN, S.; JOSHI, U. M.; BALASUBRAMANIAN, R. Microwave assisted sample preparation for determining water-soluble fraction of trace elements in urban airborne particulate matter: Evaluation of bioavailability. **Analytica Chimica Acta**, v. 576, n. 1, p. 23–30, 2006.

KASPRZAK, K. S. Oxidative DNA and protein damage in metal-induced toxicity and carcinogenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 32, n. 10, p. 958–967, 15 maio 2002.

KAUR, K.; MATHUR, N.; BHATNAGAR, P. Comparative Study of Usage of Microbial Strains for Monitoring Waste Water Treatment Plants. **Universal Journal of Environmental Research and Technology**, v. 2, n. 2, p. 26–37, 2012.

KAUR, S. et al. Preliminary analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in air particles (PM10) in Amritsar, India: sources, apportionment, and possible risk implications to humans. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 65, n. 3, p. 382–395, out. 2013.

KEITH, L. H. The Source of U.S. EPA's Sixteen PAH Priority Pollutants. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v. 35, n. 2-4, p. 147–160, 15 mar. 2015.

KELLY, F. J.; FUSSELL, J. C. Size, source and chemical composition as determinants of toxicity attributable to ambient particulate matter. **Atmospheric Environment**, v. 60, p. 504–526, dez. 2012.

KESSLER, N. et al. A bacterial bioreporter panel to assay the cytotoxicity of atmospheric particulate matter. **Atmospheric Environment**, v. 63, p. 94–101, 2012.

- KHAIRY, M. A.; LOHMANN, R. Source apportionment and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons in the atmospheric environment of Alexandria, Egypt. **Chemosphere**, v. 91, n. 7, p. 895–903, maio 2013.
- KHALILI, N. R.; SCHEFF, P. A.; HOLSEN, T. M. PAH source fingerprints for coke ovens, diesel and, gasoline engines, highway tunnels, and wood combustion emissions. **Atmospheric Environment**, v. 29, n. 4, p. 533–542, 1995.
- KHAN, M. F. et al. Seasonal effect and source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbons in PM2.5. **Atmospheric Environment**, v. 106, p. 178–190, abr. 2015.
- KIM, K. H.; MA, C. J.; OKUDA, T. An analysis of long-term changes in airborne toxic metals in South Korea's two largest cities from 1991 to 2004. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 16, n. 5, p. 565–572, 2009.
- KIM, K.-H.; KABIR, E.; KABIR, S. A review on the human health impact of airborne particulate matter. **Environment International**, v. 74, p. 136–143, 2015.
- KNAAPEN, A. M. et al. Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 234-235, p. 317–326, 2002.
- KOK, T. M. C. M. et al. Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: A review of recent studies. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 613, n. 2-3, p. 103–122, nov. 2006.
- KRUG, F. J. **Métodos de Preparo de Amostras**. 1. ed. Piracicaba: CENA-USP, 2008.
- KULKARNI, P.; VENKATARAMAN, C. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in Mumbai, India. **Atmospheric Environment**, v. 34, n. 17, p. 2785–2790, jan. 2000.
- KYOTANI, T.; IWATSUKI, M. Characterization of soluble and insoluble components in PM2.5 and PM10 fractions of airborne particulate matter in Kofu city, Japan. **Atmospheric Environment**, v. 36, n. 4, p. 639–649, 2002.
- LEE, W.-J. et al. PAH characteristics in the ambient air of traffic-source. **Science of The Total Environment**, v. 159, n. 2-3, p. 185–200, jan. 1995.
- LEMOS, A. T. et al. Mutagenicity of particulate matter fractions in areas under the impact of urban and industrial activities. **Chemosphere**, v. 89, n. 9, p. 1126–1134, 2012.

- LEPERS, C. et al. Mutagenicity and clastogenicity of native airborne particulate matter samples collected under industrial, urban or rural influence. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 5, p. 866–874, ago. 2014.
- LEWTAS, J. Air pollution combustion emissions: characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 636, n. 1-3, p. 95–133, nov. 2007.
- LI, C. K.; KAMENS, R. M. The use of polycyclic aromatic hydrocarbons as source signatures in receptor modeling. **Atmospheric Environment. Part A. General Topics**, v. 27, n. 4, p. 523–532, mar. 1993.
- LIEBER, M. et al. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells. **International Journal of Cancer**, v. 17, n. 1, p. 62–70, 15 jan. 1976.
- LIMBECK, A. et al. Determination of water soluble trace metals in airborne particulate matter using a dynamic extraction procedure with on-line inductively coupled plasma optical emission spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 750, p. 111–119, out. 2012.
- LIN, C.-C. et al. Characteristics of Metals in Nano/Ultrafine/Fine/Coarse Particles Collected Beside a Heavily Trafficked Road. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 21, p. 8113–8122, nov. 2005.
- LIU, L.-B. et al. Determination of particle-associated polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air of Beijing by GC/MS. **Analytical sciences : the international journal of the Japan Society for Analytical Chemistry**, v. 23, n. 6, p. 667–671, jun. 2007.
- LIU, X. et al. Mass concentration and health risk assessment of heavy metals in size-segregated airborne particulate matter in Changsha. **Science of The Total Environment**, v. 517, p. 215–221, jun. 2015.
- LOYOLA, J. et al. Concentration and emission sources of airborne metals in particulate matter in the industrial district of Medio Paraíba, State of Rio de Janeiro, Brazil. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 51, n. 4, p. 485–493, 2006.
- MA, Y. et al. Cupric nitrilotriacetate induces oxidative DNA damage and apoptosis in human leukemia HL-60 cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 25, n. 4-5, p. 568–575, set. 1998.

MACEDO-MÁRQUEZ, A. La producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) en las mitocondrias de *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas**, v. 15, n. 2, p. 97–103, 2012.

MAEDA, T. et al. Relationship between mutagenicity and reactivity or biodegradability for nitroaromatic compounds. **Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC**, v. 26, n. 2, p. 237–241, fev. 2007.

MANALIS, N. et al. Toxic metal content of particulate matter (PM10), within the Greater Area of Athens. **Chemosphere**, v. 60, n. 4, p. 557–566, 2005.

MANTIS, J.; CHALOULAKOU, A.; SAMARA, C. PM10-bound polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the Greater Area of Athens, Greece. **Chemosphere**, v. 59, n. 5, p. 593–604, abr. 2005.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutation Research**, v. 113, n. 3-4, p. 173–215, 1983.

MARVIN, C. H.; HEWITT, L. M. Analytical methods in bioassay-directed investigations of mutagenicity of air particulate material. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 636, n. 1-3, p. 4–35, 2007.

MASCLET, P.; BRESSON, M.; MOUVIER, G. Polycyclic aromatic hydrocarbons emitted by power stations, and influence of combustion conditions. **Fuel**, v. 66, n. 4, p. 556–562, abr. 1987.

MASIH, J. Seasonal Variation and Sources of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Indoor and Outdoor Air in a Semi Arid Tract of Northern India. **Aerosol and Air Quality Research**, p. 515–525, 2012.

MBENGUE, S.; ALLEMAN, L. Y.; FLAMENT, P. Bioaccessibility of trace elements in fine and ultrafine atmospheric particles in an industrial environment. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 37, n. 5, p. 875–889, 9 out. 2015.

MINGUILLÓN, M. C. et al. Effect of ceramic industrial particulate emission control on key components of ambient PM10. **Journal of Environmental Management**, v. 90, n. 8, p. 2558–2567, jun. 2009.

MIRANTE, F. et al. Organic composition of size segregated atmospheric particulate matter, during summer and winter sampling campaigns at representative sites in Madrid, Spain. **Atmospheric Research**, v. 132-133, p. 345–361, out. 2013.

MOHANRAJ, R.; SOLARAJ, G.; DHANAKUMAR, S. PM 2.5 and PAH concentrations in urban atmosphere of Tiruchirappalli, India. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 87, n. 3, p. 330–335, set. 2011.

MORENO, T. et al. Variations in atmospheric PM trace metal content in Spanish towns: Illustrating the chemical complexity of the inorganic urban aerosol cocktail. **Atmospheric Environment**, v. 40, n. 35, p. 6791–6803, nov. 2006.

MORTELmans, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1-2, p. 29–60, 20 nov. 2000.

MUGICA-ÁLVAREZ, V. et al. Concentrations and properties of airborne particles in the Mexico City subway system. **Atmospheric Environment**, v. 49, p. 284–293, mar. 2012.

MUKHTAR, A.; LIMBECK, A. Recent developments in assessment of bio-accessible trace metal fractions in airborne particulate matter: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 774, p. 11–25, abr. 2013.

NISBET, I. C.; LAGOY, P. K. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Regulatory toxicology and pharmacology : RTP**, v. 16, n. 3, p. 290–300, dez. 1992.

NORRAMIT, P. et al. Characterization and Carcinogenic Risk Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Respirable Fraction of Airborne Particles in the Bangkok Metropolitan Area. **Journal of Health Science**, v. 51, n. 4, p. 437–446, 2005.

O'CALLAGHAN-GORDO, C. et al. Outdoor air pollution exposures and micronuclei frequencies in lymphocytes from pregnant women and newborns in Crete, Greece (Rhea cohort). **Environmental Research**, v. 143, p. 170–176, nov. 2015.

OH, S. M. et al. Organic extracts of urban air pollution particulate matter (PM2.5)-induced genotoxicity and oxidative stress in human lung bronchial epithelial cells (BEAS-2B cells). **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 723, n. 2, p. 142–151, 2011.

OHNISHI, S.; KAWANISHI, S. Double Base Lesions of DNA by a Metabolite of Carcinogenic Benzo[a]pyrene. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, n. 2, p. 778–782, 18 jan. 2002.

OHURA, T. et al. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Indoor and Outdoor Environments and Factors Affecting Their Concentrations. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 1, p. 77–83, 1 jan. 2004.

OKONA-MENSAH, K. B. et al. An approach to investigating the importance of high potency polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the induction of lung cancer by air pollution. **Food and Chemical Toxicology**, v. 43, n. 7, p. 1103–1116, jul. 2005.

OKUDA, T. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the aerosol in Beijing, China, measured by aminopropylsilane chemically-bonded stationary-phase column chromatography and HPLC/fluorescence detection. **Chemosphere**, v. 65, n. 3, p. 427–435, out. 2006.

OSORNIO-VARGAS, Á. R. et al. Proinflammatory and Cytotoxic Effects of Mexico City Air Pollution Particulate Matter in Vitro Are Dependent on Particle Size and Composition. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 10, p. 1289–1293, 25 abr. 2003.

PARK, J.-H. et al. Evidence for the aldo-keto reductase pathway of polycyclic aromatic trans-dihydrodiol activation in human lung A549 cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 19, p. 6846–6851, 2008.

PARK, S. S.; KIM, Y. J.; KANG, C. H. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in Seoul, Korea. **Atmospheric Environment**, v. 36, n. 17, p. 2917–2924, jun. 2002.

PASTOR, B. **Biomonitorización citogenética de cuatro poblaciones agrícolas europeas, expuestas a plaguicidas, mediante el ensayo de micronúcleos**. Facultat de Ciències - Universitat Autònoma de Barcelona. 2002.

PEREIRA, T. S. et al. Salmonella mutagenicity assessment of airborne particulate matter collected from urban areas of Rio Grande do Sul State, Brazil, differing in anthropogenic influences and polycyclic aromatic hydrocarbon levels. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 702, n. 1, p. 78–85, set. 2010.

PEREIRA, T. S. et al. Toxicogenetic monitoring in urban cities exposed to different airborne contaminants. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 90, p. 174–182, abr. 2013.

PITTS JR, J. N. et al. Mutagenic activity of airborne particulate organic pollutants. **Toxicology Letters**, v. 1, n. 2, p. 65–70, 1977.

PITTS JR., J. N. et al. Mutagens in diesel exhaust particulate identification and direct activities of 6-nitrobenzo[a]pyrene, 9-nitroanthracene, 1-nitropyrene and 5H-phenanthro[4,5-bcd]pyran-5-one. **Mutation Research Letters**, v. 103, n. 3-6, p. 241–249, 1982.

POMA, A. et al. Genotoxicity induced by fine urban air particulate matter in the macrophages cell line RAW 264.7. **Toxicology in Vitro**, v. 20, n. 6, p. 1023–1029, set. 2006.

POPE, C. A. et al. Lung cancer and cardiovascular disease mortality associated with ambient air pollution and cigarette smoke: Shape of the exposure-response relationships. **Environmental Health Perspectives**, v. 119, n. 11, p. 1616–1621, 2011.

POZO, K. et al. Survey of persistent organic pollutants (POPs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the atmosphere of rural, urban and industrial areas of Concepción, Chile, using passive air samplers. **Atmospheric Pollution Research**, v. 3, n. 4, p. 426–434, out. 2012.

PRÁ, D. et al. Genotoxicity and mutagenicity of iron and copper in mice. **BioMetals**, v. 21, n. 3, p. 289–297, 10 jun. 2008.

PRIEDITIS, H.; ADAMSON, I. Y. R. Comparative pulmonary toxicity of various soluble metals found in urban particulate dusts. **Experimental Lung Research**, v. 28, n. 7, p. 563–576, 2 jan. 2002.

QUEROL, X. et al. Impact of the implementation of PM abatement technology on the ambient air levels of metals in a highly industrialised area. **Atmospheric Environment**, v. 41, n. 5, p. 1026–1040, fev. 2007.

QURESHI, S. et al. Elemental composition of PM_{2.5} aerosols in Queens, New York: Solubility and temporal trends. **Atmospheric Environment**, v. 40, n. SUPPL. 2, p. 238–251, 2006.

R CORE TEAM. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria, <https://www.R-project.org>, 2016.

RAASCHOU-NIELSEN, O. et al. Air pollution and lung cancer incidence in 17 European cohorts: Prospective analyses from the European Study of Cohorts for Air Pollution Effects (ESCAPE). **The Lancet Oncology**, v. 14, n. 9, p. 813–822, 2013.

RAVINDRA, K. et al. Seasonal and site-specific variation in vapour and aerosol phase PAHs over Flanders (Belgium) and their relation with anthropogenic activities. **Atmospheric Environment**, v. 40, n. 4, p. 771–785, fev. 2006.

RAVINDRA, K.; SOKHI, R.; VAN GRIEKEN, R. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. **Atmospheric Environment**, v. 42, n. 13, p. 2895–2921, abr. 2008.

REHWAGEN, M. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons associated with particles in ambient air from urban and industrial areas. **Science of The Total Environment**, v. 348, n. 1-3, p. 199–210, set. 2005.

ROSAS PÉREZ, I. et al. Relations between PM10 composition and cell toxicity: A multivariate and graphical approach. **Chemosphere**, v. 67, n. 6, p. 1218–1228, abr. 2007.

ROUBICEK, D. A. et al. Micronuclei induced by airborne particulate matter from Mexico City. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 631, n. 1, p. 9–15, 2007.

SALAZAR, A. M.; SORDO, M.; OSTROSKY-WEGMAN, P. Relationship between micronuclei formation and p53 induction. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 672, n. 2, p. 124–128, jan. 2009.

SAMARA, C. et al. Chemical mass balance source apportionment of PM sub(10) in an industrialized urban area of Northern Greece. **Atmospheric Environment**, v. 37, n. 1, p. 41–54, 2003.

SAMARA, C.; VOUTSA, D. Size distribution of airborne particulate matter and associated heavy metals in the roadside environment. **Chemosphere**, v. 59, n. 8, p. 1197–1206, 2005.

SANTOS, M. et al. Determination of water-soluble and insoluble compounds in size classified airborne particulate matter. **Microchemical Journal**, v. 91, n. 1, p. 133–139, jan. 2009.

SÃO PAULO (ESTADO). Decreto Estadual nº 59.113, de 23 de abril 2013. Estabelece novos padrões de qualidade do ar e dá providências correlatas, 2013.

SARKAR, S.; KHILLARE, P. S. Association of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and metallic species in a tropical urban atmosphere – Delhi, India. **Journal of Atmospheric Chemistry**, v. 68, n. 2, p. 107–126, 13 jun. 2011.

SATHRUGNAN, K.; BALASUBRAMANIAN, R. Evaluation of a microwave-assisted extraction technique for determination of water-soluble inorganic species in urban airborne particulate matter. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, n. 8, p. 1604–1608, 2005.

SATO, K.; TAMURA, T.; FURUTA, N. Partitioning between soluble and insoluble fractions of major and trace elements in size-classified airborne particulate matter collected in Tokyo. **Journal of Environmental Monitoring : JEM**, v. 10, n. 2, p. 211–218, fev. 2008.

SATO, M. I. et al. Mutagenicity of airborne particulate organic material from urban and industrial areas of São Paulo, Brazil. **Mutation Research**, v. 335, n. 3, p. 317–330, dez. 1995.

SAVÓIA, E. J. L. et al. Biomonitoring genotoxic risks under the urban weather conditions and polluted atmosphere in Santo André, SP, Brazil, through Trad-MCN bioassay. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, n. 1, p. 255–260, jan. 2009.

SCHAUMANN, F. et al. Metal-rich Ambient Particles (Particulate Matter 2.5) Cause Airway Inflammation in Healthy Subjects. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 170, n. 8, p. 898–903, 15 out. 2004.

SCHILIRÒ, T. et al. Chemical characterisation and cytotoxic effects in A549 cells of urban-air PM10 collected in Torino, Italy. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 29, n. 2, p. 150–157, mar. 2010.

SEINFELD, J. H.; PANDIS, S. N. **Atmospheric Chemistry and Physics - From Air Pollution to Climate Change**. 2. ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2006.

SENTHILKUMAR, S. et al. Characterization and genotoxicity evaluation of particulate matter collected from industrial atmosphere in Tamil Nadu State, India. **Journal of Hazardous Materials**, v. 274, p. 392–398, jun. 2014.

SHARMA, H.; JAIN, V. K.; KHAN, Z. H. Characterization and source identification of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the urban environment of Delhi. **Chemosphere**, v. 66, n. 2, p. 302–10, jan. 2007.

SHI, J. Characterization and Source Identification of PM10-bound Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Urban Air of Tianjin, China. **Aerosol and Air Quality Research**, v. 10, n. 5, p. 507–518, out. 2010.

SHI, T. et al. Hydroxyl radical generation by electron paramagnetic resonance as a new method to monitor ambient particulate matter composition. **Journal of Environmental Monitoring : JEM**, v. 5, n. 4, p. 550–556, 2003.

SHIMADA, T. et al. Metabolic Activation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Aryl and Heterocyclic Amines by Human Cytochromes P450 2A13 and 2A6. **Chemical Research in Toxicology**, v. 26, n. 4, p. 529–537, 15 abr. 2013.

SHIMADA, T.; FUJII-KURIYAMA, Y. Metabolic activation of polycyclic aromatic hydrocarbons to carcinogens by cytochromes P450 1A1 and 1B1. **Cancer Science**, v. 95, n. 1, p. 1–6, jan. 2004.

SHUSTER-MEISELES, T. et al. ROS-generating/ARE-activating capacity of metals in roadway particulate matter deposited in urban environment. **Environmental Research**, v. 146, p. 252–262, 2016.

SIENRA, M. R.; ROSAZZA, N. G.; PRÉNDEZ, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons and their molecular diagnostic ratios in urban atmospheric respirable particulate matter. **Atmospheric Research**, v. 75, n. 4, p. 267–281, jun. 2005.

SILVA JR, F. M. R.; VAZ ROCHA, J. A.; VARGAS, V. M. F. Extraction parameters in the mutagenicity assay of soil samples. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 23, p. 6017–6023, 2009.

SILVA, C. S. et al. Characterization of an area of reference for inhalable particulate matter (PM_{2.5}) associated with genetic biomonitoring in children. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 778, p. 44–55, jan. 2015.

SIMCIK, M. F.; EISENREICH, S. J.; LIOY, P. J. Source apportionment and source/sink relationships of PAHs in the coastal atmosphere of Chicago and Lake Michigan. **Atmospheric Environment**, v. 33, n. 30, p. 5071–5079, dez. 1999.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry. The Principles and Practice of Statistics in Biological Research.** 4. ed. New York: Peter Marshall, 2012.

SRIMURUGANANDAM, B.; SHIVA NAGENDRA, S. M. Chemical characterization of PM₁₀ and PM_{2.5} mass concentrations emitted by heterogeneous traffic. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 17, p. 3144–3157, 2011.

STEARNS, R. C.; PAULAUSKIS, J. D.; GODLESKI, J. J. Endocytosis of ultrafine particles by A549 cells. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 24, n. 2, p. 108–115, 2001.

SÝKOROVÁ, B.; KUCBEL, M.; RACLAVSKÝ, K. Composition of airborne particulate matter in the industrial area versus mountain area. **Perspectives in Science**, v. 7, p. 369–372, mar. 2016.

TAVARES, M. et al. Emission of polycyclic aromatic hydrocarbons from diesel engine in a bus station, Londrina, Brazil. **Atmospheric Environment**, v. 38, n. 30, p. 5039–5044, 2004.

THOMAIDIS, N. S.; BAKEAS, E. B.; SISKOS, P. A. Characterization of lead, cadmium, arsenic and nickel in PM_{2.5} particles in the Athens atmosphere, Greece. **Chemosphere**, v. 52, n. 6, p. 959–966, 2003.

TOBISZEWSKI, M.; NAMIEŚNIK, J. PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources. **Environmental Pollution**, v. 162, p. 110–119, 2012.

TRAVERSI, D. et al. Involvement of nitro-compounds in the mutagenicity of urban PM_{2.5} and PM₁₀ in Turin. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 726, n. 1, p. 54–59, nov. 2011.

UMBUZEIRO, G. A. et al. Mutagenicity and DNA adduct formation of PAH, nitro-PAH, and oxy-PAH fractions of atmospheric particulate matter from São Paulo, Brazil. **Mutation Research/ Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 652, n. 1, p. 72–80, 2008a.

UMBUZEIRO, G. A. et al. 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, n. 4, p. 249–255, maio 2008b.

UMBUZEIRO, G. A.; ROUBICEK, D. A. Genotoxicidade Ambiental. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Eds.). **Ecotoxicologia aquática: princípios e aplicações**. 1. ed. Ribeirão Preto, SP: RiMa Editora, 2008.

USEPA. **Air Quality Criteria for Particulate Matter - EPA/600/P-99/002bF**. Research Triangle Park, NC: [s.n.].

USEPA. **Particulate Matter (PM)**. Disponível em: <www3.epa.gov/pm/health.html>. Acesso em: 3 fev. 2016.

VALAVANIDIS, A. et al. Characterization of atmospheric particulates, particle-bound transition metals and polycyclic aromatic hydrocarbons of urban air in the centre of Athens (Greece). **Chemosphere**, v. 65, n. 5, p. 760–768, 2006.

VALAVANIDIS, A.; FIOTAKIS, K.; VLACHOGIANNI, T. Airborne Particulate Matter and Human Health: Toxicological Assessment and Importance of Size and Composition of Particles for Oxidative Damage and Carcinogenic Mechanisms. **Journal of Environmental Science and Health, Part C**, v. 26, n. 4, p. 339–362, 2008.

VALERIO, F.; PALA, M. Effects of temperature on the concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) adsorbed onto airborne particulates. **Fresenius J Anal Chem**, v. 339, p. 777–779, 1991.

VARGAS, V. M. F. Mutagenic activity as a parameter to assess ambient air quality for protection of the environment and human health. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 544, n. 2-3, p. 313–319, nov. 2003.

VARGAS, V. M. F.; BRITO, K. C. T. DE; CORONAS, M. V. Genetic Biomarkers Applied to Environmental Air Quality : Ecological and Human Health Aspects. In: MAZZEO, N. (Ed.). **Air Quality Monitoring, Assessment and Management**. [s.l.] InTech, 2011. p. 268–284.

VASCONCELLOS, P. C. et al. Determination of anthropogenic and biogenic compounds on atmospheric aerosol collected in urban, biomass burning and forest areas in São Paulo, Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 408, n. 23, p. 5836–5844, nov. 2010.

VASCONCELLOS, P. C. et al. Measurements of polycyclic aromatic hydrocarbons in airborne particles from the metropolitan area of São Paulo City, Brazil. **Atmospheric Environment**, v. 37, n. 21, p. 3009–3018, jul. 2003.

VASCONCELLOS, P. C. et al. Seasonal Variation of n-Alkanes and Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Concentrations in PM10 Samples Collected at Urban Sites of São Paulo State, Brazil. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 222, n. 1-4, p. 325–336, 21 nov. 2011.

VELALI, E. et al. Redox activity and in vitro bioactivity of the water-soluble fraction of urban particulate matter in relation to particle size and chemical composition. **Environmental Pollution**, v. 208, p. 774–786, jan. 2016.

VILLALOBOS-PIETRINI, R. et al. Mutagenicity and polycyclic aromatic hydrocarbons associated with extractable organic matter from airborne particles $\leq 10\mu\text{m}$ in southwest Mexico City. **Atmospheric Environment**, v. 40, n. 30, p. 5845–5857, 2006.

VOUTSA, D.; SAMARA, C. Labile and bioaccessible fractions of heavy metals in the airborne particulate matter from urban and industrial areas. **Atmospheric Environment**, v. 36, n. 22, p. 3583–3590, ago. 2002.

WANG, G. et al. Characterization of water-soluble species of PM10 and PM2.5 aerosols in urban area in Nanjing, China. **Atmospheric Environment**, v. 36, n. 8, p. 1299–1307, 2002.

WECKWERTH, G. Verification of traffic emitted aerosol components in the ambient air of Cologne (Germany). **Atmospheric Environment**, v. 35, n. 32, p. 5525–5536, nov. 2001.

WHITE, P. A. The genotoxicity of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 515, n. 1-2, p. 85–98, 2002.

WHITE, P. A.; CLAXTON, L. D. Mutagens in contaminated soil: a review. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 567, n. 2-3, p. 227–345, nov. 2004.

WHO. **Air Quality Guidelines. Global update 2005.** Copenhagen: World Health Organization, 2006.

WHO. **Health Effects of Ambient Particulate Matter - Policy implications for countries in eastern Europe, Caucasus and central AsiaWorld Health Organization.** Copenhagen, Denmark. 2013

WHO. **WHO guidelines for indoor air quality: selected pollutants.** Copenhagen: World Health Organization Regional Office for Europe, 2010.

WICKRAMASINGHE, A. P.; KARUNARATNE, D. G. G. P.; SIVAKANESAN, R. PM10-bound polycyclic aromatic hydrocarbons: Concentrations, source characterization and estimating their risk in urban, suburban and rural areas in Kandy, Sri Lanka. **Atmospheric Environment**, v. 45, n. 16, p. 2642–2650, maio 2011.

WILK, A. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons-induced ROS accumulation enhances mutagenic potential of T-antigen from human polyomavirus JC. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 11, p. 2127–2138, nov. 2013.

WIRIYA, W.; PRAPAMONTOL, T.; CHANTARA, S. PM10-bound polycyclic aromatic hydrocarbons in Chiang Mai (Thailand): Seasonal variations, source identification, health risk assessment and their relationship to air-mass movement. **Atmospheric Research**, v. 124, p. 109–122, abr. 2013.

WISEMAN, C. L. S. Analytical methods for assessing metal bioaccessibility in airborne particulate matter: A scoping review. **Analytica Chimica Acta**, v. 877, p. 9–18, jun. 2015.

WISEMAN, C. L. S.; ZEREINI, F. Characterizing metal(loid) solubility in airborne PM10, PM2.5 and PM1 in Frankfurt, Germany using simulated lung fluids. **Atmospheric Environment**, v. 89, p. 282–289, jun. 2014.

WOJAS, B.; ALMQUIST, C. Mass concentrations and metals speciation of PM2.5, PM10, and total suspended solids in Oxford, Ohio and comparison with those from metropolitan sites in the Greater Cincinnati region. **Atmospheric Environment**, v. 41, n. 39, p. 9064–9078, 2007.

YAN, J. et al. Photomutagenicity of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons from the US EPA priority pollutant list. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 557, n. 1, p. 99–108, 2004.

ZEIGER, E. Mutagens that are not carcinogens: faulty theory or faulty tests? **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 492, n. 1-2, p. 29–38, 31 maio 2001.

ZENG, Y. et al. Assessment of genetic toxicity with major inhalable mineral granules in A 549 cells. **Applied Clay Science**, 2015.

ZEREINI, F. et al. Concentration and distribution of heavy metals in urban airborne particulate matter in Frankfurt am Main, Germany. **Environmental Science & Technology**, v. 39, n. 9, p. 2983–9, 1 maio 2005.

ZHANG, J. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in atmospheric dustfall from the industrial corridor in Hubei Province, Central China. **Environmental Geochemistry and Health**, v. 37, n. 5, p. 891–903, 12 out. 2015.

ANEXO 1

PALACIO, I.C. et. al. Evaluating the mutagenicity of the water-soluble fraction of air particulate matter: A comparison of two extraction strategies. ***Chemosphere***, v. 158, p. 124-130, set. 2016.



Evaluating the mutagenicity of the water-soluble fraction of air particulate matter: A comparison of two extraction strategies

Isabel C. Palacio ^{a,b}, Ivo F. Oliveira ^a, Robson L. Franklin ^a, Silvia B.M. Barros ^b, Deborah A. Roubicek ^{a,*}

^a Dept. Environmental Analyses, São Paulo State Environmental Agency, CETESB, Av. Prof. Frederico Hermann Jr, 345, 05459-900, São Paulo, SP, Brazil

^b Dept. Clinical Analyses and Toxicology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, 580, 05508-000, São Paulo, SP, Brazil

HIGHLIGHTS

- We compared microwave-assisted and ultrasonic bath extractions of airborne PM.
- Extraction method can significantly affect the results of mutagenicity of PM.
- Metals associated with airborne PM have mutagenic potential (Ames test).
- Based on the biological response, MW is suitable and efficient extraction method.
- Water-soluble extracts can be frozen up to 60 days before testing.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 March 2016

Accepted 19 May 2016

Handling Editor: Jianying Hu

Keywords:

Extraction

Genotoxicity

Air particulate matter

Water-soluble fraction

ABSTRACT

Many studies have focused on assessing the genotoxic potential of the organic fraction of airborne particulate matter. However, the determination of water-soluble compounds, and the evaluation of the toxic effects of these elements can also provide valuable information for the development of novel strategies to control atmospheric air pollution.

To determine an appropriate extraction method for assessing the mutagenicity of the water-soluble fraction of PM, we performed microwave assisted (MW) and ultrasonic bath (US) extractions, using water as solvent, in eight different air samples (TSP and PM10). Mutagenicity and extraction performances were evaluated using the *Salmonella*/microsome assay with strains TA98 and TA100, followed by chemical determination of water-soluble metals. Additionally, we evaluated the chemical and biological stability of the extracts testing their mutagenic potential and chemically determining elements present in the samples along several periods after extraction. Reference material SRM 1648a was used.

The comparison of MW and US extractions did not show differences on the metals concentrations, however positive mutagenic responses were detected with TA98 strain in all samples extracted using the MW method, but not with the US bath extraction. The recovery, using reference material was better in samples extracted with MW. We concluded that the MW extraction is more efficient to assess the mutagenic activity of the soluble fraction of airborne PM. We also observed that the extract freezing and storage over 60 days has a significant effect on the mutagenic and analytical results on PM samples, and should be avoided.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Many epidemiological studies have demonstrated the association between exposure to airborne particulate matter (PM) and adverse human health effects as lung cancer and cardiovascular diseases at concentrations commonly found in urban areas around the world (Boffetta, 2006; Kim et al., 2015; Silva et al., 2010).

PM consists of a complex mixture of different organic and

* Corresponding author.

E-mail addresses: icpb@usp.br (I.C. Palacio), ifoliveira@sp.gov.br (I.F. Oliveira), rfranklin@sp.gov.br (R.L. Franklin), smbarros@usp.br (S.B.M. Barros), droubicek@sp.gov.br (D.A. Roubicek).

inorganic compounds, many of which have mutagenic, genotoxic and/or carcinogenic capacity (Baja et al., 2010; Ceretti et al., 2015; Cheng et al., 2004; Pope et al., 2002; Roubicek et al., 2007). The mutagenicity of the airborne particulate matter has been linked to approximately 500 compounds of different chemical classes. Among these, the best known are the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). In contrast, few studies have focused on investigating the water soluble fraction of the particulate matter and the differential contribution of different chemical species to the genotoxic and mutagenic damage (Claxton et al., 2004).

Because of the complex chemical nature of PM, standard chemical analyses are limited in their ability to characterize the chemical composition of these mixtures and allow the identification of potential genotoxic substances present in the samples (Claxton et al., 1998). The combination of short-term bioassays with chemical-analytical techniques have been successfully used to identify a variety of mutagenic compounds in complex matrices such as air. The bioassays are valuable tools because they allow the detection of the effects of several chemicals and their interactions, even when they occur at low concentrations (Kessler et al., 2012). The *Salmonella*/microsome assay is one of the most valuable tools for identifying the presence of mutagens in the environment and it is considered an essential bioassay for environmental monitoring studies aimed at genotoxic or cancer risk assessment (Villalobos-Pietrini et al., 2006).

Toxicological studies implicated the metal content (particularly water-soluble metal) as a possible harmful component of PM (Shuster-Meiseles et al., 2016; Wiseman, 2015). Metals associated with PM may be in highly mobile forms (water-soluble) and, therefore, potentially bioavailable (Fernández Espinosa et al., 2002; Mbengue et al., 2015). Toxic metals can be absorbed in lung tissue during breathing influencing biological functions (Lemos et al., 2012).

Although genotoxic positive results caused by metals linked to the inorganic soluble fraction of the PM have been reported in literature (Dellinger et al., 2001; Gutiérrez-Castillo et al., 2006; Mukherjee et al., 2004; Valavanidis et al., 2000), the determination of the mutagenic effects using the *Salmonella*/microsome assay with water as sole solvent is still uncommon. Traditionally, a combination of acids and oxidizing agents (HNO_3 , HF, H_2O_2 , and H_3BO_3) is used in the extraction process of the inorganic fraction of the particulate matter, in order to chemically quantify the total metal content, and in the determination of oxidative damage induced by soluble metals on the DNA. This methodology cannot be applied to the *Salmonella*/microsome assay and other biological systems, like cell cultures, due to its high sensitivity to the acidification of the sample.

Because the toxicity of the particulate matter is influenced by the solubility of metals and its reactive capacity, determining the content of soluble metals and their mutagenic potential in particulate matter samples by simple and reliable methods is important to understand their impact on human health and the environment. The method of extraction can significantly affect the results of mutagenicity testing of complex mixtures, as the preparation of these complex samples is a critical step in the analytical procedure. Approximately 55–95% of the inter-laboratory variability in the results of mutagenicity tests of particulate matter samples is due to differences in analytical methods rather than real differences in the mutagenic potential of the samples (Marvin and Hewitt, 2007). In recent years there has been an increased search for new, quick, and more efficient extraction techniques as a result of the large number of PM samples collected and analyzed in the networks of monitoring the air quality (Sathrugnan and Balasubramanian, 2005). Usually, ultrasonic baths are used to extract substances from particulate matter; however microwave radiation assisted procedures

are increasingly more used for preparing the samples (Karthikeyan et al., 2006).

This study aimed to compare the efficiency of microwave-assisted and ultrasound bath in the extraction of the soluble fraction of particulate matter, using water as solvent and the *Salmonella*/microsome assay to measure the mutagenic response. The efficiency of the extraction method was evaluated using standard reference material SRM 1648a based on recovery results, and the chemical and biological stability of the water-soluble fraction of the particulate material was also evaluated.

2. Material and methods

2.1. Air particulate matter samples

A total of four samples of total suspended particles (TSP) and four samples of coarse inhalable particles (PM10) were analyzed in order to compare the extraction methods. TSP and PM10 samples were collected in glass fiber filters (Pall Corporation type A/E, 20.3 cm × 25.4 cm) with high volume samplers (General Metal Works INC/Energetica, respectively) operating with a sampling flow of 1.13 m³/min for 24 h, every six days, by the São Paulo State Environmental Agency (CETESB), as part of the regular air quality monitoring program. The collected material was determined gravimetrically. The filters were dried for 48 h in a desiccator under a temperature of 15–30 °C, controlled relative humidity and were weighed before and after collection. The TSP and PM10 concentration was expressed in µg/m³ of air sampled. The filters were stored at room temperature and protected from light until analysis. All samples were collected in different places in the state of São Paulo that have an industrial economic vocation. For the purpose of this study, samples were pooled together regardless the site they were collected.

2.2. Extraction procedures

The samples were submitted to extraction using ultrapure water as sole solvent. Each sample consisted of a pool of ¼ of 4 filters, and the total mass from each sample was calculated by the sum of ¼ of the mass of all filters belonging to that sample. Although the mass of each filter was different, we extracted all pools with the same amount of water relative to PM mass in order to get 2 ml of the extract as a maximum dose in the *Salmonella* assay.

2.2.1. Microwave-assisted (MW) extraction

The extraction of the water-soluble substances contained in the particulate matter was performed in a Milestone microwave, model Ethos 1 (Sorisole-BG, Italy), medium pressure system, for up to 12 tubes of TFM®. The filters were placed in the tubes with 20 ml of ultrapure water (18.2 MΩ) (Purelab Ultra SC MK2 Elga, WS-England). The equipment was set to a power of 1000 W and a temperature of 100 °C for 10 min with a heating ramp-up for 10 min. After cooling, the suspension was filtered in a 0.45 µm Millipore membrane filter (Billerica, MA-USA).

2.2.2. Ultrasonic bath (US) extraction

The filters were fractionated and deposited in an Erlenmeyer flask with 40 ml ultrapure water. The samples were agitated in a shaker (SOLAB SL, 223, SP-Brazil) for 1 h at 160 rpm at 36 °C and placed in an ultrasonic bath for 30 min at room temperature. This procedure was repeated twice for each sample. We used a Unique USC-1800 Ultrasonic bath (São Paulo, SP, Brazil) (40 KHz, 154 W). After extraction, the sample was passed through a 0.45 µm Millipore membrane filter (Billerica, MA-USA).

Additionally, clean control filters were treated in the same way

that those used in the microwave-assisted and ultrasound extractions for metal determination and mutagenicity tests.

After extraction, part of the sample was separated for chemical analyses, and the rest was frozen until biological testing. Before the bioassay, samples were thawed and used directly.

2.3. Determination of soluble metals

To determine the concentration of soluble metals present in the aqueous extracts, 10 ml of each filtered sample was separately stored and acidified with 20 µl of sub-boiling nitric acid (Destillacid, Berghof-Germany). The metal content quantification was carried out using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES Spectro Modula S). Results were expressed in ng/m³. Detection limits were: 10 µg/L for Ni, Ti, V, Zn and Mn; 20 µg/L for Co, Cr and Cu; 50 µg/L for Fe and Pb.

Reference material SRM 1648a (Urban Particulate Matter - National Institute of Standards and Technology - NIST, Gaithersburg, MD, USA), was used to compare the efficiency of the extraction recovery of the soluble inorganic elements between both extraction methods (microwave-assisted and ultrasonic bath), and as quality control of our experiments. Six samples of SRM 1648a (10 mg each) were independently extracted with 15 ml of ultrapure water.

The chemical quantification of SRM 1648a samples was performed by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS Thermo Scientific X Series 2) with the following limits of quantification: 0.005 µg/L for Cd, 0.01 µg/L for Co and Sb, 0.05 µg/L for Pb, 0.10 µg/L for Mn and Ni, 0.20 µg/L for Cu, V, Cr, Zn, As, Sc and Ti, 2.00 µg/L for Fe. The final concentration of each element was calculated as the average of three replicas. As internal standards 9Be, 115In, 209Bi were used.

Results were expressed in µg/L and transformed to dry weight (mg/kg), to be compared with concentrations defined in the reference material (SRM 1648a). To ensure the quality of results, clean filters were extracted in the same extraction process of the samples.

2.4. *Salmonella*/microsome assay -Ames test

A modification of the *Salmonella*/Microsome assay (Ames test - Maron and Ames, 1983) was employed to assess the mutagenic potential of the water-soluble extracts, as described in Vargas et al. (1995). In this study the tests were performed with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium¹ strains TA98 and TA100, to detect frameshift mutations and base-pair substitutions, respectively; in the presence or absence of *in vitro* metabolic activation, S9 mix (lyophilized liver homogenate of Sprague-Dawley rats induced with Aroclor 1254, Moltox Ltd., Boone, NC, USA). In this variation of the original assay, top agar (supplemented with histidine and biotin) was prepared in different concentrations, and the aqueous samples themselves were used as diluents. All assays were carried out in triplicates. Negative controls using sterile water were used, as well as tubes without any solvent. The positive controls used were 4-nitroquinoline-1-oxide (4NQO - Alfa Aesar) 0.5 µg/plate without metabolic activation and 2-aminoanthracene (2AA - Sigma-Aldrich) 2.5 µg/plate in the presence of S9.

2.5. Stability of the sample extracts

With the purpose of determining the chemical and biological

stability of the PM soluble inorganic fraction, a microwave-assisted extraction was performed for a pool-sample of a set of 11 p.m.10 filters. Subsamples from the extract were frozen at -20 °C until analysis.

The *Salmonella*/microsome assay was employed to evaluate the mutagenic potential of the defrosted subsamples at different periods of time after extraction (0–109 days). In the same way, 10 ml of each defrosted subsample was used to determine the content of water-soluble elements by ICP-MS.

2.6. Data analysis

Ames test results were statistically analyzed applying the Bernstein model (Bernstein et al., 1982) with the "Salanal" program (Salmonella Assay Analysis, version 1.0, Integrated Laboratory Systems, RTP, North Carolina, USA). Samples were considered mutagenic when they presented a significant difference between doses (ANOVA, $p < 0.05$), positive dose-response curve ($p < 0.05$) and mutagenicity ratio (MR) ≥ 1.5 . Results were expressed in number of revertants per gram of PM (rev/g).

A Spearman correlation analysis was performed to determine the correlation between the chemical composition and biological response. A Wilcoxon test for paired samples ($p < 0.05$) was used to compare the mutagenic response of the different extraction methods. To compare the metal contents we used Mann-Whitney *U* test ($p < 0.05$).

For the efficiency of the extraction methods with the reference material, and the effect of storage time, a general linear model was adjusted to logarithmically transformed data.

The F-Fisher ($p < 0.05$) was used to compare the chemical data and the Bonferroni method of multiple comparisons to the sample stability.

The SPSS Software, version 21, was used for the analyses.

3. Results and discussion

The concentrations of Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb, Ti, V, and Zn were determined in the eight samples of particulate matter. Table 1 presents the results of the metals where concentrations were above quantification limits at least in one of the samples analyzed. All elements in the blank samples were determined below the limit of quantitation.

The concentrations of Cr, Co and Ti were below the limit of quantification for all samples. Pb was not detected in any of the studied extracts, possibly because this metal is mainly associated with the fine inhalable fraction (PM2.5) of the PM (Lemos et al., 2012; Wojas and Almquist, 2007).

In all extracts analyzed, only the concentrations of Cu and V exceeded the limit of quantification of ICP-OES, regardless of the extraction method. Although V concentration was higher in MW compared to US, and Cu concentration lower, no statistically significance difference was found between the extraction methods for both metals.

Several studies confirm the high solubility of V and Cu. By measuring metal concentrations of the soluble fraction of PM10 collected in the city of Edinburgh, Heal et al. (2005) found that the water-soluble fraction of V was greater than 50% of the total concentration of V, and that of soluble Cu was between 35 and 45% of total found for this metal in the samples analyzed. Similar results were obtained by Kyotani and Iwatsuki (2002) in Kofu (Japan), Gutiérrez-Castillo et al. (2006) in Mexico City, and Jiang et al. (2014) in Hong Kong. These authors also reported a low solubility of Ti and Cr. The differences in the solubility of individual elements can be due to the different chemical speciation of the metals, particle size or different emission sources (Desboeufs et al., 2005).

¹ We adopted the taxonomy revision that occurred for the genus *Salmonella*, where *Salmonella typhimurium* was revised as *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

Table 1

Concentration of metals (ng/m^3) determined in both microwave-assisted and ultrasonic bath aqueous extracts of TSP and PM10 by ICP-OES.

Metals (ng/m^3)	Extraction Method															
	Microwave-assisted								Ultrasonic Bath							
	TSP-1	TSP-2	TSP-3	TSP-4	PM10-1	PM10-2	PM10-3	PM10-4	TSP-1	TSP-2	TSP-3	TSP-4	PM10-1	PM10-2	PM10-3	PM10-4
Nickel	<LQ	4.32	<LQ	<LQ	<LQ	2.19	<LQ	<LQ	2.18	5.76	2.21	2.42	<LQ	4.20	<LQ	<LQ
Copper	23.27	19.11	3.55	36.48	5.95	4.33	2.28	5.11	49.80	24.30	6.22	76.67	18.09	12.83	5.87	13.12
Zinc	2.42	18.95	1.54	1.97	<LD	<LD	<LD	<LD	8.09	67.64	<LD	2.56	<LD	<LQ	<LD	<LD
Iron	<LQ	15.50	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	12.38	40.59	<LQ	10.40	<LQ	15.13	<LQ	<LQ
Manganese	<LQ	3.28	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	4.31	123.6	<LQ	1.36	<LQ	1.65	<LQ	<LQ
Vanadium	5.58	12.51	6.64	13.37	2.81	19.80	2.23	2.84	3.59	7.96	5.73	10.79	2.00	18.41	1.64	2.48

<LD = below the detection limit; <LQ = below the quantification limit.

Table 2 show the results of the comparison of the extraction of the reference material SRM 1648a by both methods, the percentage of recovery, and the statistic comparison using Fisher F-test. Water-soluble metals in reference material samples were quantified by ICP-MS due to the large amount of data determined below the detection limit in PM samples with ICP-OES (Table 1).

The Fisher F-test showed a significant interaction between extraction methods and the concentrations of elements ($P \leq 0.05$). When comparing the results obtained in the aqueous extractions with those reported in the reference material, SRM 1648a shows that for almost all elements quantified the percentage of recovery was higher in samples extracted with the microwave-assisted technique.

The recovery, however, is underestimated, since the reference material does not provide information on the water solubility of the elements analyzed. A significant proportion (24–47%) of Sb, V, Mn, Fe, Ni, Cd and Cu was determined in the soluble fraction for samples extracted with the microwave-assisted method. Low solubility (<2.0%) was observed for Cr and Ti. Conversely a high degree of solubility was found for As (64.2%) and Zn (65.1%). In the samples extracted with ultrasonic bath, the solubility of the elements ranged from 0.4% (Ti) to 67.4% (Fe).

The recovery percentages obtained in the reference material extracted with MW in our study can be comparable to those reported by Karthikeyan et al. (2006) and are higher than those determined by Heal et al. (2005) using US.

Karthikeyan et al. (2006) compared the extraction of water soluble trace metals in urban dust and urban particulate matter reference materials by the two techniques and showed that they performed similarly. Canepari et al. (2005) evaluated the

microwave assisted and ultrasonic extractions for OCd, Cr, Ni, Pb, Zn, Cu, Al, As, Co, Fe, Mg and Mn in sediments, and the microwave-assisted method presented higher recoveries for all elements. Sathrugnan and Balasubramanian (2005) found that the microwave-assisted technique was a suitable and accurate alternative to conventional ultrasonic extraction of atmospheric particulates.

According to Capelo et al. (2005) the paradoxical results reported in the literature using ultrasonication in the preparation of the samples is related to the ultrasonic bath itself, since the power and the distribution profile of the ultrasonic energy may vary depending on the manufacturer, and may produce contradictory results between different laboratories.

Chen et al. (2008) reported that the microwave-assisted extraction not only provides satisfactory results, but allows complete or partial automation of the analytical process, reducing extraction time. Different studies might therefore be compared more accurately, facilitating the identification of compounds that are potentially mutagenic.

The *Salmonella*/microsome mutagenicity results of the airborne particulate matter extracted using the two mentioned methods are presented in Table 3.

We found differences in the mutagenic detection by the two extraction methods. Positive mutagenic responses were detected with *Salmonella enterica* ser. Typhimurium TA98 strain in all samples extracted using the microwave assisted method, but not with the ultrasonic bath extraction.

The results of Wilcoxon test indicated that the mutagenic response was statistically different between the two extraction methods for TA98 strain with and without metabolic activation, but

Table 2

Dry weight values of the elements extracted by microwave-assisted and ultrasound bath methods of reference material SRM 1648a and recovery (%). Average of six independent experiments.

Element	NIST 1648a (mg/Kg) ^b	Microwave-assisted					Ultrasonic bath (mg/Kg)					Fisher F-test	
		Avg	SD	Min	Max	Rec (%)	Avg	SD	Min	Max	Rec (%)	P	Result
V	127	54.01	3.87	47.93	59.58	42.53	43.26	3.10	38.67	47.48	34.06	0.029	MW > US
Cr	402	7.78	0.57	7.12	8.62	1.93	7.60	1.44	5.93	9.89	1.89	0.722	MW = US
Zn	4800	3124.80	307.66	2808.00	3624.00	65.10	2529.00	237.01	2137.50	2853.00	52.69	0.038	MW > US
As	115.5	74.09	4.57	67.25	80.74	64.15	54.04	4.70	48.12	60.86	46.79	0.002	MW > US
Se ^a	—	18.13	1.04	16.98	19.92	—	14.57	1.74	12.63	17.03	—	0.029	MW > US
Ti	4021	6.19	0.50	5.47	6.78	0.15	15.33	8.76	6.25	30.75	0.38	<0.001	MW < US
Mn	790	266.64	16.90	252.30	286.50	33.75	235.15	13.36	208.20	244.50	29.77	0.237	MW = US
Fe	3.92%	204.62	39.60	166.20	268.95	47.22	417.48	216.48	200.40	810.45	67.40	<0.001	MW < US
Co	17.93	4.49	0.18	4.27	4.75	25.07	4.04	0.21	3.66	4.26	22.51	0.285	MW = US
Ni	81.1	25.53	0.85	24.41	26.58	31.48	24.28	1.57	21.50	25.83	29.93	0.624	MW = US
Cu	619	162.78	24.46	144.23	205.05	26.30	118.54	10.14	102.87	133.74	19.15	0.002	MW > US
Cd	73.7	28.59	5.07	24.92	37.29	38.80	22.38	2.86	17.69	26.61	30.37	0.019	MW > US
Sb	45.4	11.14	0.60	10.11	11.58	24.54	7.23	0.84	6.42	8.39	15.94	<0.001	MW>US

Avg – average, SD – standard deviation, Min – minimum value, Max – maximum value, Rec - recovery

^a The value of Se is not certified in the reference material SRM 1648a, but was evaluated in both extraction methods.

^b Certified values of NIST 1648a in mg/kg, unless indicated as %

Table 3

Results of the *Salmonella*/microsome mutagenicity assays of air particulate matter water soluble extracts in number of revertants/gram $\times 10^3$.

Sample	Revertants $\times 10^3$ /g							
	Microwave-assisted				Ultrasonic bath			
	TA98-S9	TA98 + S9	TA100-S9	TA100 + S9	TA98-S9	TA98 + S9	TA100-S9	TA100 + S9
TSP 1	6.9	8.2	13	19	7.4	2.3	ND	8.4
TSP 2	20	19	35	52	7.9	8.6	ND	20
TSP 3	15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
TSP 4	12	6.2	10	17	4.7	4.7	ND	16
PM10-1	10	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PM10-2	14	23	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PM10-3	10	18	ND	ND	ND	ND	ND	ND
PM10-4	9.6	22	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND = Not detected under test conditions

no significant differences were found comparing TA100 strain results. Differences in chemical analyses, on the other hand, were not conclusive. However, the biological response verified in our investigation suggests that the microwave-assisted extraction for atmospheric PM water-soluble fraction can be more efficient than the ultrasonic bath extraction. That could be because of the effect that pressurization exerted by the MW, promoting higher solubilization of some elements. These findings confirm the importance of studying and improving sample extraction techniques, preventing the interpretation of false negative results.

As the comparison of MW and US extractions shows differences in the mutagenic activity and not on the metals concentrations, an analysis based exclusively on the chemical composition would not be sufficient to determine the most suitable extraction method to detect mutagenic contaminants. The use of bioassays is required in the search for appropriate methodologies for extracting substances with mutagenic potential within environmental samples (Da Silva Junior et al., 2009).

Most of the researches on air pollution and their sources are based on physicochemical analyses. Several authors had reported the presence of metals in PM in different regions around the world (Liu et al., 2015; Loyola et al., 2006; Manalis et al., 2005; Mukhtar and Limbeck, 2013; Samara and Voutsas, 2005; Zereini et al., 2005), but, as discussed above, the total metals content in polluted environmental samples is a poor indicator of its bioavailability, mobility or toxicity (Araujo et al., 2008). The PM's genotoxic potential evaluated by chemical analysis alone contains some limitations, as these analyses do not predict biological effects, antagonistic or synergistic actions in these mixtures of contaminants (White and Claxton, 2004).

In general, PM metallic components with high solubility can be more readily bio-activated and thus may be potentially more harmful to humans (Qureshi et al., 2006). To determine the bioavailable fraction of trace elements, particulate samples are often extracted with phosphate buffered saline or potassium citrate. However, this may introduce interference in some chemical detection methods, and produce unacceptable blank values (Karthikeyan et al., 2006). Therefore, water was chosen as a suitable solvent for the determination of the soluble metals in this work.

Although a statistically significant correlation between the concentrations of soluble metals and the biological response was not found with the available data (several of the metals analyzed were below of the quantification limit), other water soluble compounds present in the samples studied could be also responsible for the observed mutagenic activity.

Acute inflammatory responses in mice exposed to particulate matter from different sources were found directly related to the content of metals and their water solubility (Costa and Dreher, 1997). In vitro studies with samples of PM10 from Utah Valley demonstrated the importance of the content of the soluble fraction

of transition metals in the cytotoxic response and pro-inflammatory potential (Frampton et al., 1999). Using the Comet assay, Gutiérrez-Castillo et al. (2006) demonstrated that the soluble fractions of PM10 and PM2.5 samples from Mexico City were able to induce DNA damage in A549 alveolar cells. In order to investigate the mechanism by which PM induces oxidative DNA damage, TSP samples from Duisburg and three other German cities (Knaapen et al., 2002; Shi et al., 2003) were extracted with deionized water, by sonication. The studies showed how the soluble fraction contributed to the genotoxic hazard of airborne particulate matter.

It has been shown that different extraction processes applied to the same sample of airborne particulate matter may result in differences in the mutagenic responses (Buschini et al., 2001). The absence of mutagenic activity in the extracts obtained by ultrasonic bath, as show in Table 3, may be related to the efficiency of the extraction process. The ultrasonic bath has been widely used for extracting organic mutagens in PM samples (Carreras et al., 2013; De Oliveira Alves et al., 2014), however, according to our results, this methodology seems not to have the same efficiency in the extraction of water-soluble compounds.

We have also analyzed the effect of storage and freezing the extracts on the mutagenic response, and on the concentration of 15 elements in the soluble fraction of one sample of PM10 that was a pool of 11 filters. Since it is very difficult to test many samples at the same time immediately after extraction, the stability of the extract is very important.

Tables 4 and 5 show the results of the concentrations of soluble components that were determined and the mutagenic activity after storage of the sample at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ for different periods of time.

Significant differences were found between the average concentrations of the elements due to the freezing time ($p < 0.001$). The results obtained at day 88 after extraction for Fe, Co, Ni, Cu, Pb and Zn are in general higher than the concentrations determined at the other three analyses. Those odd results could be because of an analytical error or contamination. Nevertheless, the Bonferroni test ($p = 0.023$) evidenced that after 64 days of freezing there are significant differences in relation to the concentrations obtained at the day that the extraction was performed. According to the indicative straight decreasing concentration trend, obtained in percentage independently of the parameter, a decrease of 2.1% every 10 days of freezing was verified.

Although we do not have enough data to perform statistical analysis on the biological results, the Ames test corroborates the chemical analyses, and we suggest that a two-month period of storage at $-20\text{ }^\circ\text{C}$ is suitable for sample stability (Table 5). Mutagenic activity was not detected with *Salmonella enterica* ser. Typhimurium TA100 \pm S9.

The stability of the chemical species in environmental samples is critical during storage because of degradation processes or interaction between the chemical elements that could significantly

Table 4Concentration of water soluble elements ($\mu\text{g/L}$) of a PM10 sample extract stored at -20°C for different periods of time.

Days after extraction	Soluble metals ($\mu\text{g/L}$)								
	Fe	Co	Ni	Cu	Cd	Pb	V	Cr	Zn
0	160.70	1.94	12.87	121.80	0.28	1.10	297.10	38.29	12.51
46	102.70	1.87	11.67	118.50	0.26	0.88	298.70	37.42	19.18
64	102.60	1.89	11.79	119.10	0.23	0.86	276.70	34.93	14.19
88	145.70	2.46	13.47	123.70	0.36	1.99	271.30	35.92	17.29
109	112.60	1.85	11.40	116.70	0.26	0.84	258.50	33.29	12.11
Average	124.86	2.0	12.24	120.0	0.28	1.13	280.46	36.0	15.05
SD	26.72	0.26	0.88	2.77	0.05	0.49	17.24	1.98	3.08
Coefficient of variation (%)	21.40	13.02	7.24	2.31	17.35	43.12	6.15	5.52	20.44

Table 5Mutagenic activity of a sample extract stored at -20°C for different periods of time, expressed in rev/g.

Days of storage and freezing of the extract	Mutagenic activity (rev/ $\text{g} \times 10^3$)	
	TA98-S9	TA98 + S9
0	7.7	7.7
46	9.0	6.9
64	16.2	7.7
88	12.7	12.2
109	8.7	4.9

impair the quality of environmental monitoring results (Gómez Ariza, 2000). The preservation and stability of elements between sampling and analysis is a difficult task and may be influenced by different factors such as sample pH, temperature and light at the storage place.

The large number of PM samples usually analyzed in environmental monitoring studies makes the storage of extracts an essential step in environmental monitoring, enabling laboratories to increase their analytical capability.

4. Conclusions

Although soluble metals are a fundamental part of atmospheric pollutants, and their determination in the total fraction of particulate matter is an important parameter in the assessment of the effects on human health and the environment, yet little research on techniques for the extraction of this fraction of the particulate material is done. Our results on the mutagenicity and chemical composition of different air particulate matter samples, and of the SRM 1648a reference material, showed an increased extraction efficiency in the microwave-assisted methodology in comparison to the ultrasonic bath conventional method for the water soluble fraction both TSP and PM10 particle sizes. This process is also less time consuming and more reproducible, as it is easier to control test conditions. As of our knowledge, it is also the first report on the stability of those extracts kept frozen at 20°C using chemical analyses and the Ames test as an indicator of biological damage. We do not recommend a period greater than 60 days of freezing after extraction of the soluble fraction of the particulate matter sample. This period was very conservative in our analysis, taking into account that only one sample was evaluated. The combination of air PM microwave-assisted extraction and the *Salmonella* mutagenicity test proved to be useful, and could be used routinely to monitor air pollution.

Acknowledgements

This study is part of Isabel Palacio's PhD Thesis, for which she

received a scholarship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES. She is also thankful to Dr. Carlos Roberto dos Santos, director of Engineering and Environmental Quality and Maria Inês Z. Sato manager of the Department of Environment Analyses at CETESB, for allowing her to do the research at their facilities. The authors want to thank CETESB's Air Sampling and Analyses Sector staff, especially Maria Cristina N. de Oliveira for providing the air particulate matter filters, and the team of the Toxicology and Genotoxicity Sector, for their support and help in so many steps of this study. A very special thank you to Antonio de Castro Bruni for his great collaboration in the statistical analyses.

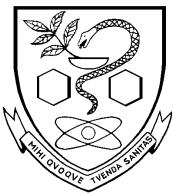
References

- Arain, M.B., Kazi, T.G., Jamali, M.K., Jalbani, N., Afridi, H.I., Baig, J.A., 2008. Speciation of heavy metals in sediment by conventional, ultrasound and microwave assisted single extraction methods: a comparison with modified sequential extraction procedure. *J. Hazard. Mater.* 154, 998–1006. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2007.11.004>.
- Baja, E.S., Schwartz, J.D., Wellenius, G.A., Coull, B.A., Zanobetti, A., Vokonas, P.S., Suh, H.H., 2010. Traffic-related air pollution and QT interval: modification by diabetes, obesity, and oxidative stress gene polymorphisms in the normative aging study. *Environ. Health Perspect.* 118, 840–846. <http://dx.doi.org/10.1289/ehp.0901396>.
- Bernstein, L., Kaldor, J., McCann, J., Pike, M.C., 1982. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat. Res.* 97, 267–281. [http://dx.doi.org/10.1016/0161-1161\(82\)90026-7](http://dx.doi.org/10.1016/0161-1161(82)90026-7).
- Boffetta, P., 2006. Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. *Mutat. Res.* 608, 157–162. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.02.015>.
- Buschini, A., Cassoni, F., Anceschi, E., Pasini, L., Poli, P., Rossi, C., 2001. Urban airborne particulate: genotoxicity evaluation of different size fractions by mutagenesis tests on microorganisms and comet assay. *Chemosphere* 44, 1723–1736. [http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535\(00\)00550-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0045-6535(00)00550-6).
- Canepari, S., Cardarelli, E., Ghighi, S., Scimone, L., 2005. Ultrasound and microwave-assisted extraction of metals from sediment: a comparison with the BCR procedure. *Talanta* 66, 1122–1130. <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2005.01.014>.
- Capelo, J.L., Maduro, C., Vilhena, C., 2005. Discussion of parameters associated with the ultrasonic solid-liquid extraction for elemental analysis (total content) by electrothermal atomic absorption spectrometry. An overview. *Ultrason. Sonochem.* 12, 225–232. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ulsonch.2003.10.010>.
- Carreras, H.A., Calderón-Segura, M.E., Gómez-Arroyo, S., Murillo-Tovar, M.A., Amador-Muñoz, O., 2013. Composition and mutagenicity of PAHs associated with urban airborne particles in Córdoba, Argentina. *Environ. Pollut.* 178, 403–410. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.03.016>.
- Ceretti, E., Zani, C., Zerbini, I., Viola, G., Moretti, M., Villarini, M., Dominici, L., Monarca, S., Feretti, D., 2015. Monitoring of volatile and non-volatile urban air genotoxins using bacteria, human cells and plants. *Chemosphere* 120, 221–229. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.07.004>.
- Chen, L., Song, D., Tian, Y., Ding, L., Yu, A., Zhang, H., 2008. Application of on-line microwave sample-preparation techniques. *TrAC Trends Anal. Chem.* 27, 151–159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2008.01.003>.
- Cheng, Y.W., Lee, W.W., Li, C.H., Lee, C.C., Kang, J.J., 2004. Genotoxicity of motorcycle exhaust particles in vivo and in vitro. *Toxicol. Sci.* 81, 103–111. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfh173>.
- Claxton, L.D., Houk, V.S., Hughes, T.J., 1998. Genotoxicity of industrial wastes and effluents. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 410, 237–243. [http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5742\(98\)00008-8](http://dx.doi.org/10.1016/S1383-5742(98)00008-8).
- Claxton, L.D., Matthews, P.P., Warren, S.H., 2004. The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: *Salmonella* mutagenicity. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 567,

- 347–399. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2004.08.002>.
- Costa, D.L., Dreher, K.L., 1997. Bioavailable transition metals in particulate matter mediate cardiopulmonary injury in healthy and compromised animal models. *Environ. Health Perspect.* 105 (Suppl. I), 1053–1060. <http://dx.doi.org/10.2307/3433509>.
- Da Silva Junior, F.M.R., Vaz Rocha, J.A., Vargas, V.M.F., 2009. Extraction parameters in the mutagenicity assay of soil samples. *Sci. Total Environ.* 407, 6017–6023. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2009.08.021>.
- De Oliveira Alves, N., De Souza Hacon, S., De Oliveira Galvão, M.F., Simões Peixotoc, M., Artaxo, P., De Castro Vasconcellos, P., De Medeiros, S.R.B., 2014. Genetic damage of organic matter in the Brazilian Amazon: a comparative study between intense and moderate biomass burning. *Environ. Res.* 130, 51–58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2013.12.011>.
- Dellinger, B., Pryor, W., Cueto, R., Squadrito, G., Hegde, V., Deutsch, W., 2001. Role of free radicals in the toxicity of airborne fine particulate matter. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1371–1377. <http://dx.doi.org/10.1021/tx010050x>.
- Desboeufs, K.V., Sofikitis, A., Losno, R., Colin, J.L., Ausset, P., 2005. Dissolution and solubility of trace metals from natural and anthropogenic aerosol particulate matter. *Chemosphere* 58, 195–203. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.02.025>.
- Fernández Espinosa, A.J., Ternero Rodríguez, M., Barragán De La Rosa, F.J., Jiménez Sánchez, J.C., 2002. A chemical speciation of trace metals for fine urban particles. *Atmos. Environ.* 36, 773–780. [http://dx.doi.org/10.1016/S1352-2310\(01\)00534-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1352-2310(01)00534-9).
- Frampton, M.W., Ghio, A.J., Samet, J.M., Carson, J.L., Carter, J.D., Devlin, R.B., 1999. Effects of aqueous extracts of PM(10) filters from the Utah valley on human airway epithelial cells. *Am. J. Physiol.* 277, L960–L967.
- Gómez Ariza, J., 2000. Stability of chemical species in environmental matrices. *TrAC Trends Anal. Chem.* 19, 200–209. [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936\(99\)00192-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-9936(99)00192-2).
- Gutiérrez-Castillo, M.E., Roubicek, D.A., Cebrán-García, M.E., De Vizcaya-Ruiz, A., Sordo-Cedeño, M., Ostrosky-Wegman, P., 2006. Effect of chemical composition on the induction of DNA damage by urban airborne particulate matter. *Environ. Mol. Mutagen* 47, 199–211. <http://dx.doi.org/10.1002/em.20186>.
- Heal, M.R., Hibbs, L.R., Agius, R.M., Beverland, I.J., 2005. Total and water-soluble trace metal content of urban background PM10, PM2.5 and black smoke in Edinburgh, UK. *Atmos. Environ.* 39, 1417–1430. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosev.2004.11.026>.
- Jiang, S.Y.N., Yang, F., Chan, K.L., Ning, Z., 2014. Water solubility of metals in coarse PM and PM2.5 in typical urban environment in Hong Kong. *Atmos. Pollut. Res.* 5, 236–244. <http://dx.doi.org/10.5094/APR.2014.029>.
- Karthikeyan, S., Joshi, U.M., Balasubramanian, R., 2006. Microwave assisted sample preparation for determining water-soluble fraction of trace elements in urban airborne particulate matter: evaluation of bioavailability. *Anal. Chim. Acta* 576, 23–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2006.05.051>.
- Kessler, N., Schauer, J.J., Yagur-Kroll, S., Melamed, S., Tirosh, O., Belkin, S., Erel, Y., 2012. A bacterial bioreporter panel to assay the cytotoxicity of atmospheric particulate matter. *Atmos. Environ.* 63, 94–101. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosev.2012.09.048>.
- Kim, K.-H., Kabir, E., Kabir, S., 2015. A review on the human health impact of airborne particulate matter. *Environ. Int.* 74, 136–143. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.005>.
- Knaapen, A.M., Shi, T., Borm, P.J.A., Schins, R.P.F., 2002. Soluble metals as well as the insoluble particle fraction are involved in cellular DNA damage induced by particulate matter. *Mol. Cell. Biochem.* 234–235, 317–326. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1015970023889>.
- Kyotani, T., Iwatsuki, M., 2002. Characterization of soluble and insoluble components in PM2.5 and PM10 fractions of airborne particulate matter in Kofu city, Japan. *Atmos. Environ.* 36, 639–649. [http://dx.doi.org/10.1016/S1352-2310\(01\)00494-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1352-2310(01)00494-0).
- Lemos, A.T., Coronas, M.V., Rocha, J.A.V., Vargas, V.M.F., 2012. Mutagenicity of particulate matter fractions in areas under the impact of urban and industrial activities. *Chemosphere* 89, 1126–1134. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.05.100>.
- Liu, X., Zhai, Y., Zhu, Y., Liu, Y., Chen, H., Li, P., Peng, C., Xu, B., Li, C., Zeng, G., 2015. Mass concentration and health risk assessment of heavy metals in size-segregated airborne particulate matter in Changsha. *Sci. Total Environ.* 517, 215–221. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.02.066>.
- Loyola, J., De Almeida, P.B., Quiterio, S.L., Sousa, C.R., Arbillia, G., Escalera, V., De Carvalho, M.I., Da Silva, A.D.S.A.G., 2006. Concentration and emission sources of airborne metals in particulate matter in the industrial district of Medio Paraíba, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 51, 485–493. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-005-0313-3>.
- Manalis, N., Grivas, G., Protonotarios, V., Moutsatsou, a., Samara, C., Chaloulakou, a., 2005. Toxic metal content of particulate matter (PM10), within the Greater Area of Athens. *Chemosphere* 60, 557–566. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.01.003>.
- Maron, D.M., Ames, B.N., 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutat. Res.* 113, 173–215. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](http://dx.doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9).
- Marvin, C.H., Hewitt, L.M., 2007. Analytical methods in bioassay-directed investigations of mutagenicity of air particulate material. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 636, 4–35. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2006.05.001>.
- Mbengue, S., Alleman, L.Y., Flament, P., 2015. Bioaccessibility of trace elements in fine and ultrafine atmospheric particles in an industrial environment. *Environ. Geochem. Health* 37, 875–889. <http://dx.doi.org/10.1007/s10653-015-9756-2>.
- Mukherjee, S., Palmer, L.J., Kim, J.Y., Aeschliman, D.B., Houk, R.S., Woodin, M.A., Christiani, D.C., 2004. Smoking status and occupational exposure affects oxidative DNA injury in boilermakers exposed to metal fume and residual oil fly ash. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 13, 454–460.
- Mukhtar, A., Limbeck, A., 2013. Recent developments in assessment of bioaccessible trace metal fractions in airborne particulate matter: a review. *Anal. Chim. Acta*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2013.02.008>.
- Pope, C.A., Burnett, R.T., Thun, M.J., Calle, E.E., Krewski, D., Ito, K., Thurston, G.D., 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA* 287, 1132–1141.
- Qureshi, S., Dutkiewicz, V.A., Khan, A.R., Swami, K., Yang, K.X., Husain, L., Schwab, J.J., Demerjian, K.L., 2006. Elemental composition of PM2.5 aerosols in Queens, New York: solubility and temporal trends. *Atmos. Environ.* 40, 238–251. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2005.12.070>.
- Roubicek, D.A., Gutiérrez-Castillo, M.E., Sordo, M., Cebrán-García, M.E., Ostrosky-Wegman, P., 2007. Micronuclei induced by airborne particulate matter from Mexico City. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen* 631, 9–15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2007.04.001>.
- Samara, C., Voutsas, D., 2005. Size distribution of airborne particulate matter and associated heavy metals in the roadside environment. *Chemosphere* 59, 1197–1206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2004.11.061>.
- Sathrugnan, K., Balasubramanian, R., 2005. Evaluation of a microwave-assisted extraction technique for determination of water-soluble inorganic species in urban airborne particulate matter. *Anal. Bioanal. Chem.* 381, 1604–1608. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-005-3138-z>.
- Shi, T., Schins, R.P.F., Knaapen, A.M., Kuhlbusch, T., Pitz, M., Heinrich, J., Borm, P.J.a, 2003. Hydroxyl radical generation by electron paramagnetic resonance as a new method to monitor ambient particulate matter composition. *J. Environ. Monit.* 5, 550–556. <http://dx.doi.org/10.1039/B303928p>.
- Shuster-Meiseles, T., Shafer, M.M., Heo, J., Pardo, M., Antkiewicz, D.S., Schauer, J.J., Rudich, A., Rudich, Y., 2016. ROS-generating/ARE-activating capacity of metals in roadway particulate matter deposited in urban environment. *Environ. Res.* 146, 252–262. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.01.009>.
- Silva, F.S., Cristale, J., André, P.A., Saldíva, P.H.N., Marchi, M.R.R., 2010. PM2.5 and PM10: the influence of sugarcane burning on potential cancer risk. *Atmos. Environ.* 44, 5133–5138. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2010.09.001>.
- Valavanidis, A., Salika, A., Theodoropoulou, A., 2000. Generation of hydroxyl radicals by urban suspended particulate air matter. The role of iron ions. *Atmos. Environ.* 34, 2379–2386. [http://dx.doi.org/10.1016/S1352-2310\(99\)00435-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1352-2310(99)00435-5).
- Vargas, V.M., Guidobono, R.R., Jordão, C., Henriques, J.A., 1995. Use of two short-term tests to evaluate the genotoxicity of river water treated with different concentration/extraction procedures. *Mutat. Res.* 343, 31–52. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-1218\(95\)90060-8](http://dx.doi.org/10.1016/0165-1218(95)90060-8).
- Villalobos-Pietrini, R., Amador-Muñoz, O., Waliszewski, S., Hernández-Mena, L., Munive-Colin, Z., Gómez-Arroyo, S., Bravo-Cabrera, J.L., Frías-Villegas, A., 2006. Mutagenicity and polycyclic aromatic hydrocarbons associated with extractable organic matter from airborne particles $\leq 10\mu\text{m}$ in southwest Mexico City. *Atmos. Environ.* 40, 5845–5857. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2006.05.009>.
- White, P.A., Claxton, L.D., 2004. Mutagens in contaminated soil: a review. *Mutat. Res.* 567, 227–245. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2004.09.003>.
- Wiseman, C.L.S., 2015. Analytical methods for assessing metal bioaccessibility in airborne particulate matter: a scoping review. *Anal. Chim. Acta*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2015.01.024>.
- Wojas, B., Almquist, C., 2007. Mass concentrations and metals speciation of PM2.5, PM10, and total suspended solids in Oxford, Ohio and comparison with those from metropolitan sites in the Greater Cincinnati region. *Atmos. Environ.* 41, 9064–9078. <http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.08.010>.
- Zereini, F., Alt, F., Messerschmidt, J., Wiseman, C., Feldmann, I., von Bohlen, A., Müller, J., Liebl, K., Püttmann, W., 2005. Concentration and distribution of heavy metals in urban airborne particulate matter in Frankfurt am Main. *Ger. Environ. Sci. Technol.* 39, 2983–2989. <http://dx.doi.org/10.1021/es0404040t>.

ANEXO 2

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Doutorado.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Secretaria de Pós-Graduação

Informações para os Membros de Bancas Julgadoras de Mestrado/Doutorado

1. O candidato fará uma apresentação oral do seu trabalho, com duração máxima de trinta minutos.
2. Os membros da banca farão a arguição oral. Cada examinador disporá, no máximo, de trinta minutos para arguir o candidato, exclusivamente sobre o tema do trabalho apresentado, e o candidato disporá de trinta minutos para sua resposta.
 - 2.1 Com a devida anuência das partes (examinador e candidato), é facultada a arguição na forma de diálogo em até sessenta minutos por examinador.
3. A sessão de defesa será aberta ao público.
4. Terminada a arguição por todos os membros da banca, a mesma se reunirá reservadamente e expressará na ata (relatório de defesa) a aprovação ou reprovação do candidato, baseando-se no trabalho escrito e na arguição.
 - 4.1 Caso algum membro da banca reprove o candidato, a Comissão Julgadora deverá emitir um parecer a ser escrito em campo exclusivamente indicado na ata.
 - 4.2 Será considerado aprovado o aluno que obtiver aprovação por unanimidade ou pela maioria da banca.
5. Dúvidas poderão ser esclarecidas junto à Secretaria de Pós-Graduação: pgfarma@usp.br, (11) 3091 3621.

São Paulo, 23 de maio de 2014.

Prof. Dr. Adalberto Pessoa Junior
Presidente da CPG/FCF/USP

ANEXO 3

Curriculum Lattes.



Isabel Cristina Palacio Betancur

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/1339771641943129>

Última atualização do currículo em 01/06/2016

Resumo informado pelo autor

Possui mestrado em Maestría en Biología - Universidad de Antioquia (2011). Tem experiência na área de Ecología, com ênfase em Ecotoxicología, atuando principalmente nos seguintes temas: ichthyic species, genotoxicity, micronuclei e lentic environments.

(Texto gerado automaticamente pelo Sistema Lattes)

Dados pessoais

Nome	Isabel Cristina Palacio Betancur
Filiação	Jaime Alberto Palacio e Judith Betancur
Nascimento	22/08/1980 - Medellín/ - Colômbia
Carteira de Identidade	--
CPF	235.145.688-20
Passporte	cc43207168

Formação acadêmica/titulação

2012	Doutorado em Toxicología e Análises Toxicológicas. Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil
2006 - 2011	Mestrado em Maestría en Biología. Universidad de Antioquia, UdeA, Colômbia Título: Empleo de la prueba de Micronúcleos para establecer estrés genotóxico en 16 especies icticas en un ambiente acuatico impactado por la mineria de oro, Ano de obtención: 2011 Orientador: Jaime Alberto Palacio

Formação complementar

2015 - 2015	Curso de curta duração em Water Security: Integrating Lessons Learned for Wa. (Carga horária: 20h). International Union of Toxicology, IUTOX, Estados Unidos Bolsista do(a): International Union of Toxicology
2012 - 2012	Curso de curta duração em Contaminantes químicos, patógenos e toxinas de alg. (Carga horária: 30h). Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, CETESB, São Paulo, Brasil
2010 - 2010	Curso de curta duração em • PRIMO International School on Marine Ecology. (Carga horária: 45h). Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil
2010 - 2010	IV International Workshop on Pollutants in the Env. . (Carga horária: 24h). Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio De Janeiro, Brasil
2007 - 2007	Curso de curta duração em • Ecología de Peces de Ecosistemas Estuarinos. (Carga horária: 32h). Universidad Nacional de Colombia - Bogotá, UNAL/Bogotá, Bogotá, Colômbia
2007 - 2007	Curso de curta duração em Tratamiento de Datos. (Carga horária: 64h). Universidad de Antioquia, UdeA, Colômbia
2007 - 2007	Curso de curta duração em Ecología de peces. (Carga horária: 17h). Universidad de Antioquia, UdeA, Colômbia

Atuação profissional

1. Fundación para el Desarrollo del Quindío - FDQ

Vínculo institucional

2008 - 2009	Enquadramento funcional: Biologa, Regime: Dedicação exclusiva Outras informações: Programa de Aprovechamiento Sostenible de Minerales en la Sabana de Bogotá. Convenio FDQ-Ministerio de Minas y Energía
--------------------	--

2. Universidad de Antioquia - UdeA

Vínculo institucional

2010 - 2011	Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Biologa, Regime: Parcial Outras informações: EVALUACIÓN EX-POST DE LOS PROCESOS DE CONSULTA PREVIA REALIZADOS EN EL MARCO
--------------------	---

DEL TRÁMITE DE LICENCIAMIENTO AMBIENTAL DE COMPETENCIA DEL MINISTERIO DE AMBIENTE, VIVIENDA Y DESARROLLO TERRITORIAL EN EL SECTOR DE HIDROCARBUROS

- 2005 - 2006** Vínculo: Celetista , Enquadramento funcional: Biologa, Regime: Parcial
Outras informações:
Ensayos de toxicidad en Tilapia (Tilapia rendalli) para efluentes industriales. Grupo en Gestión y Modelación Ambiental-GAIA
- 2005 - 2006** Enquadramento funcional: Biologa, Regime: Parcial
Outras informações:
Ensayos de toxicidad en Daphnia pulex con el producto de la fotodegradación de tres pesticidas. Grupo en Gestión y Modelación Ambiental-GAIA

Revisor de periódico

1. Environmental Monitoring and Assessment (Print)

Vínculo

- 2011 - 2011** Regime: Parcial

Áreas de atuação

1. Ecotoxicologia

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1.   PALACIO, ISABEL C.; OLIVEIRA, IVO F.; FRANKLIN, ROBSON L.; BARROS, SILVIA B.M.; ROUBICEK, DEBORAH A.
Evaluating the mutagenicity of the water-soluble fraction of air particulate matter: A comparison of two extraction strategies. Chemosphere (Oxford). **JCR**, v.168, p.124 - 130, 2016.
2.  BETANCUR, I. C. P.; BAENA, J. P.; GUERRERO, M. C.
Micronuclei test application to wild tropical ichthyic species common in two lentic environments of the low zones in Colombia. Actualidades Biológicas. , v.30, p.67 - 77, 2009.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1.  BETANCUR, I. C. P.; BARROS, S. B.; ROUBICEK, D. A.
Air particulate matter: water- soluble and organic extracts induce both gene and chromosomal mutations In: Environmental Mutagenesis and Genomics Society 46th Annual Meeting, 2015, New Orleans.
Abstracts from the Environmental Mutagenesis and Genomics Society 46th Annual Meeting.
Molecular and Environmental Mutagenesis, 2015. v.56. p.1 - 91
2. BETANCUR, I. C. P.; BARROS, S. B.; ROUBICEK, D. A.
Relation between the genotoxicity of air particulate matter and their chemical composition In: 9th Congress of Toxicology in Developing Countries - CTDC9, 2015, Natal - RN.
XIX Congresso brasileiro de toxicologia. , 2015. v.1.
3. BETANCUR, I. C. P.; FRANKLIN, R. L.; SUZUKI, C. F.; OLIVEIRA, I. F.; ROUBICEK, D. A.; BARROS, S. B.
Different extraction strategies to evaluate the genotoxicity of the water soluble fraction of air particulate matter In: 52nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2013, San Antonio.
52 Annual Meeting and ToxExpo. , 2013.
4. BETANCUR, I. C. P.; FRANKLIN, R. L.; MORETO, A. J.; BARROS, S. B.; ROUBICEK, D. A.
Mutagenicity and metal contents of the water soluble fraction of air particulate matter collected in two different places in Sao Paulo, Brazil In: 11th International Conference on Environmental Mutagens, 2013, Foz do Iguaçu.
11th ICEM-Program and Abstract Book. , 2013.
5. BETANCUR, I. C. P.; BAENA, J. P.; GUERRERO, M. C.
Aplicación de la prueba de micronúcleos a especies ícticas en dos ambientes lenticos de Colombia In: I Congreso Nacional de Cienegas y Lagunas de Colombia, 2008, Medellin.
Memorias del I Congreso Nacional de Cienegas y Lagunas de Colombia. Medellin: Universidad de Antioquia, 2008. p.114 - 115
6. BETANCUR, I. C. P.; BERMUDEZ, A.; BAENA, J. P.
Algunos Aspectos sobre la Biología de las Especies Ícticas Presentes en la Ciénaga de Ayapel (Córdoba, Colombia) In: II Congreso Colombiano de Zoología, 2006, Santa Marta.
Memorias del II Congreso Colombiano de Zoología. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia, 2006. p.310 - 311

Página gerada pelo sistema Currículo Lattes em 01/06/2016 às 22:32:10.

ANEXO 4

Ficha de Aluno.



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 7925651/1 - Isabel Cristina Palacio Betancur

Email: icpb@usp.br
Data de Nascimento: 22/08/1980
Cédula de Identidade: RNE - V800656-F - DF
Local de Nascimento: Colômbia
Nacionalidade: Colombiana
Graduação: Bióloga - Universidad de Antioquia - Colômbia - 2006
Mestrado: Magíster en Biología (1) - Universidad de Antioquia - Colômbia - 2011

Curso: Doutorado
Programa: Toxicologia e Análises Toxicológicas
Data de Matrícula: 06/02/2012
Início da Contagem de Prazo: 06/02/2012
Data Limite para o Depósito: 06/06/2016
Orientador: Prof(a). Dr(a). Silvia Berlanga de Moraes Barros - 06/02/2012 até o presente. Email: smbarros@usp.br
Co-orientador: Prof(a). Dr(a). Deborah Arnsdorff Roubicek - 22/11/2012 até o presente. Email: roubicdr@uol.com.br
Proficiência em Línguas: Inglês, Aprovado em 06/02/2012
Português, Aprovado em 13/06/2014
Prorrogação(ões): 120 dias
Período de 06/02/2016 até 05/06/2016
Data de Aprovação no Exame de Qualificação: Aprovado em 04/04/2014
Data do Depósito do Trabalho:
Título do Trabalho:
Data Máxima para Aprovação da Banca:
Data de Aprovação da Banca:
Data Máxima para Defesa:
Data da Defesa:
Resultado da Defesa:
Histórico de Ocorrências: Primeira Matrícula em 06/02/2012
Prorrogação em 24/11/2015

Aluno matriculado no Regimento da Pós-Graduação USP (Resolução nº 5473 em vigor de 18/09/2008 até 19/04/2013).

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 01/02/2016

Impresso em: 01/06/2016 22:09:15



Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Documento sem validade oficial
FICHA DO ALUNO

9141 - 7925651/1 - Isabel Cristina Palacio Betancur

Sigla	Nome da Disciplina	Início	Término	Carga Horária	Cred.	Freq.	Conc.	Exc.	Situação
FBC5803- 2/1	Sistemas da Garantia da Qualidade em Laboratórios Analíticos	05/03/2012	18/03/2012	30	2	100	A	N	Concluída
HSA5721- 6/2	Prevenção e Controle da Poluição do Ar (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	06/03/2012	19/06/2012	60	4	100	A	N	Concluída
ICA5767- 1/1	Avaliação de Impacto Ambiental (Universidade de São Paulo)	14/03/2012	05/06/2012	120	8	83	A	N	Concluída
FBC5883- 5/1	Avaliação da Toxicidade de Contaminantes em Amostras Ambientais	09/08/2012	19/09/2012	60	4	100	A	N	Concluída
FBC5802- 3/1	Tópicos Avançados em Toxicologia I	14/08/2012	26/11/2012	15	1	90	A	N	Concluída
FBC5784- 3/2	Tópicos Avançados em Toxicologia II	05/03/2013	17/06/2013	15	1	100	A	N	Concluída
FBC5752- 2/4	Danos em Biomoléculas e o seu Papel no Monitoramento da Exposição a Agentes Tóxicos	05/06/2013	09/07/2013	45	3	100	A	N	Concluída
HSA5747- 5/4	Política e Gestão Ambiental (Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo)	11/03/2014	30/06/2014	60	0	-	-	N	Matrícula cancelada
FBA5728- 3/10	Aprimoramento Didático	19/08/2014	15/09/2014	60	4	100	A	N	Concluída

	Créditos mínimos exigidos		Créditos obtidos
	Para exame de qualificação	Para depósito de tese	
Disciplinas:	10	20	27
Estágios:			
Total:	10	20	27

Créditos Atribuídos à Tese: 167

Observações:

1) Título de mestre obtido no(a) Universidad de Antioquia. Reconhecimento da equivalência do título aprovada pela Câmara Curricular do Conselho de Pós-Graduação, em Sessão de 08/05/2013..

Conceito a partir de 02/01/1997:

A - Excelente, com direito a crédito; B - Bom, com direito a crédito; C - Regular, com direito a crédito; R - Reprovado; T - Transferência.

Um(1) crédito equivale a 15 horas de atividade programada.

Última ocorrência: Matrícula de Acompanhamento em 01/02/2016

Impresso em: 01/06/2016 22:09:15