Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

"Avaliação do potencial genotóxico do impacto da queima de biomassa na região Sul da Amazônia Legal. Estudo de caso na região de Tangará da Serra/MT"

por

Herbert Ary Arzabe Antezama Costa Nóbrega Sisenando

Tese apresentada com vistas à obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Saúde Pública e Meio Ambiente.

Orientadora principal: Prof.ª Dr.ª Sandra de Souza Hacon
Segunda orientadora: Prof.ª Dr.ª Silvia Regina Batistuzzo de Medeiros

Rio de Janeiro, fevereiro de 2012.

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

Esta tese, intitulada

"Avaliação do potencial genotóxico do impacto da queima de biomassa na região Sul da Amazônia Legal. Estudo de caso na região de Tangará da Serra/MT"

apresentada por

Herbert Ary Arzabe Antezama Costa Nóbrega Sisenando

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva

Prof. Dr. Álvaro Augusto da Costa Leitão

Prof. Dr. Hermano Albuquerque de Castro

Prof.ª Dr.ª Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos

Prof.ª Dr.ª Sandra de Souza Hacon – Orientadora principal

Tese defendida e aprovada em 16 de fevereiro de 2012.

Catalogação na fonte
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca de Saúde Pública

S622 Sisenando, Herbert Ary Arzabe Antezama Costa Nóbrega
Avaliação do Potencial Genotóxico do Impacto da Queima de Biomassa na Região Sul da Amazônia Legal. Estudo de Caso na Região de Tangará da Serra/MT. / Herbert Ary Arzabe Antezama Costa Nóbrega Sisenando. -- 2012.
xviii,124 f. : il. ; tab. ; graf. ; mapas

Orientador: Hacon, Sandra de Souza
Medeiros, Sílvia Regina Batistuzzo de
Tese (Doutorado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2012

1. Genotoxicidade. 2. Testes de Mutagenicidade. 3. Saccharum. 4. Testes para Micronúcleos. 5. Ecossistema Amazônico. I. Título.

CDD - 22.ed. – 363.7392098172

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

A U T O R I Z A Ç Ã O

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores.

Rio de Janeiro, 16 de fevereiro de 2012.

_____

Herbert Ary Arzabe Antezama Costa Nóbrega Sisenando

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus, pois sem Ele nada seria possível.

A toda minha família, em especial, aos meus pais e irmãos pelo esforço, dedicação e compreensão em todos os momentos desta e de outras caminhadas.

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, pela força, saúde e determinação para vencer mais esse obstáculo na minha vida.

Aos meus pais, tios e irmãos pelo apoio moral, financeiro e, sobretudo, pelo companheirismo nos momentos mais difíceis desta jornada.

A meus tios, em especial, a Maria do Carmo e Ideuza, pelo suporte financeiro e emocional tão necessário durante o curso desta jornada.

Aos meus amigos e amigas, em especial, a Magno F. Oliveira, pelo apoio e o ombro, aos quais, por muitas vezes, recorri para enxugar as lágrimas das dificuldades ou para comemorar os sucessos obtidos.

Aos professores da Universidade do Estado do Mato Grosso (UNEMAT); Maurecilne L. S. Carvalho, Ilio F. Carvalho, Dionei J. Silva, Rivanildo Dallacort e, em especial, Eliane Ignotti, pelo apoio logístico em todas as etapas do meu estudo.

Às alunas da Universidade do Estado do Mato Grosso (UNEMAT), Adrielle S. de Cruz, Suzan L. S. Perreira, Viviane L. Hunhoff, Ruth Ferreira e, em especial, Evânia Leite de Oliveira, pelo companheirismo, amizade e dedicação em todos os momentos dessa longa jornada de muitas dificuldades, como também de muitos frutos colhidos.

À professora Silvia Regina Batistuzzo de Medeiros**,** pelo apoio intelectual e científico, que foram fundamentais para o desenvolvimento de muitas etapas desta minha tese.

Aos amigos do Laboratório de Mutagênese Ambiental da UFRN, em especial, a Nilmara Alves, Felipe Galvão, Thiago Cabral e Jana Dara, pela cooperação e pelo apoio logístico.

Aos amigos da Escola Nacional de Saúde Pública, em especial, a Dennys Mourão, Cleber Carmo, Karen Gonçalves, Renata Emin, Thais Sholl, Victor Vilas-Bôas, Vinícius

Souza, Cláudia Vega, Marta Brandão, Gesiele Veríssimo, Beatriz Oliveira e Ludmila Viana pela cooperação durante todos os momentos desta minha jornada.

A toda equipe dos Laboratórios do CESTEH/ENSP/Fiocruz, pelo acolhimento, em especial, a Ione Soares Ferreira Ginuino e a Drª. Ana Rosa Linde-Arias.

Aos professores Aurelino Caldas, Vânia Chaves e Marli Coutinho, pelo suporte apoio durante a realização dos ensaios de genotoxicidade nas cidades de Tangará da Serra e Chapada dos Guimarães.

Aos professores Paulo Artaxo e Paulo H. N. Saldiva, pelo suporte financeiro e intelectual necessário para realização deste trabalho.

À Escola Nacional de Saúde Pública/Fiocruz, pela bolsa de doutoramento concedida durante toda a minha estadia no programa.

Gostaria de agradecer do fundo do coração à professora Sandra de Souza Hacon, pelo acolhimento, confiança e chance de realizar esse grande sonho.

EPÍGRAFE

"Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto, hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e, principalmente, viver."

Dalai Lama

SUMÁRIO

	Dedicatória	**iv**
	Agradecimentos	**v**
	Epígrafe	**vii**
	Lista de Tabelas	**x**
	Lista de Figuras	**xi**
	Resumo	**xiv**
	Abstract	**xv**
	Resumen	**xvi**
1.	**Introdução**	**1**
2.	**Revisão Bibliográfica**	**3**
2.1.	Amazônia	**3**
2.2.	Cana-de-açúcar	**5**
2.3.	Queima de biomassa x poluição atmosférica x Agravos a Saúde	**9**
2.4.	Genotoxicidade ambiental	**15**
3.	**Objetivos**	**22**
4.	**Metodologia**	**24**
4.1.	Área de estudo	**24**
4.2.	Dados ambientais	**25**
4.3.	Dados de saúde	**25**
4.4.	Coleta, gravimetria e extração do PM_{10} amostrado em filtros Teflon	**26**
4.5.	Teste de genotoxicidade *in vitro* com DNA plasmidial	**27**
4.6.	Ensaio de Mutagênese para frente e citotoxicidade com cepa selvagem e mutante de *Escherichia coli.*	**27**

4.7.	Ensaio de viabilidade celular com linhagem de pulmão humano (MTT Assay).	**28**
4.8.	Ensaio de Micronúcleo *in vitro* em linhagem de pulmão humano (CBMN Assay).	**29**
4.9.	Ensaio de Micronúcleo em Tradescantia pallida (Trad-MCN Assay).	**30**
4.10.	Ensaio de Micronúcleo em células esfoliadas de mucosa oral (Oral-MCN Assay).	**30**
4.11.	Análise Estatística	**31**
4.12.	Outras Informações	**32**
5.	**Artigos da Tese**	**33**
5.1.	**Publicados**	**34**
01	*Tradescantia pallida*: mais do que uma linda flor, um importante bioindicador da qualidade ambiental.	**34**
02	Genotoxic potential generated by biomass burning in the Brazilian Legal Amazon by Tradescantia micronucleus bioassay: a toxicity assessment study.	**39**
03	Micronucleus frequency in children exposed to biomass burning in the Brazilian Legal Amazon region: a control case study.	**48**
5.2.	**Submetido**	**65**
04	Evaluation of mutagenic potential of particulate matter derived from biomass burning in Legal Brazilian Amazon: an environmental assessment study.	**65**
6.	**Conclusão**	**92**
7.	**Apêndice**	**93**
7.1.	Certificado de honra ao mérito por trabalho premiado em Congresso/Simpósio.	**93**

7.2 Resumos publicados em anais de Congressos/Simpósios **94**

8. Anexos **95**

8.1 Parceria com a Universidade do Estado do Mato Grosso – UNEMAT para difusão do uso da *T. pallida* como indicador de dano ambiental na Amazônia. **95**

01 Teste de micronúcleo com *Tradescantia pallida* e de viabilidade polínica aplicado ao biomonitoramento da qualidade do ar no município de Tangará da Serra-MT. **96**

8.2 Prancha de imagens citogenéticas **112**

9. Referências **113**

LISTA DE TABELAS

Artigo 02

Tabela 1 Distribution of environmental and meteorological variables at all sampling stations. **41**

Tabela 2 Correlation coefficients (and corresponding significance level) between the average micronucleus frequency of the sampling stations and the corresponding environmental and health data. **43**

Artigo 03

Tabela 1 Distribution of environmental and meteorological data of the study sites in the years 2008 and 2009. **62**

Tabela 2 Micronucleus frequency of exfoliated buccal cells in children. **63**

Artigo 04

Tabela 1 Mutant frequency in wild-type and *mut*M- and *mut*Y- deficient *E.coli* strains treated with organic extract of PM_{10}. **85**

Tabela 2 Micronuclei frequency and NDI in MRC5 cells treated with organic extract of PM_{10}. **85**

Artigo - Anexo

Tabela 1 Comparação das médias de micronúcleos (%) entre os pontos, por período de coleta, e entre os períodos de coleta por ponto. **104**

Tabela 2	Comparação das médias de viabilidade polínica (%) entre os pontos, por período de coleta, e entre os períodos de coleta por ponto.	**107**

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1	Distribuição dos focos de calor no período de 2007-2009. **A** – focos de calor na Amazônia Legal comparado ao restante do Brasil. **B –** focos de calor por Estado brasileiro. **C**- focos de calor no Estado do Mato Grosso.	**4**
Figura 2	Área plantada de cana-de-açúcar na região de Tangará da Serra/MT no ano de 2009.	**8**
Figura 3	Etapas da combustão do material orgânico num incinerador.	**10**
Figura 4	Diâmetro do material particulado capaz de chegar ao trato respiratório.	**11**
Figura 5	Deposição do material particulado no trato respiratório humano.	**11**
Figura 6	Mecanismo tóxico inflamatório sugerido para o particulado ambiental no epitélio pulmonar.	**12**
Figura 7	Toxicodinâmica dos diferentes agentes tóxicos presentes no ambiente.	**13**
Figura 8	Mecanismo carcinogênico dos poluentes ambientais.	**14**
Figura 9	Diagrama esquemático da formação dos micronúcleos.	**16**
Figura 10	Diagrama esquemático de diferentes tipos de células bucais e os possíveis mecanismos para sua origem.	**18**

Artigo 01

Figura 1 *Tradescantia pallida* Purpurea: Inflorescência com flores (A), Inflorescência sem flor (B), vasos de *T. pallida* em ponto de exposição (C) e Flor (D). **36**

Figura 2 Bancada de trabalho: Espiriteira (A), carmim acético 2% (B), Tubos com inflorescências fixadas e conservadas em álcool 70% (C), Lamínulas (D), Lâminas (E), Explorador dental (F), Pinça anatômica reta (G), Estilete histológico (H) e Pinça clínica (I). **36**

Figura 3 Folha para coleta de dados no teste Trad-MCN: Inflorescência analisada em cada ponto (A), Data da coleta (B), Número de MCN encontrados por tétrade analisada (C), Total de MCN encontrados na inflorescência analisada (D), Total de MCN divididos por 3 (E) e Anormalidades encontradas na lâmina (F). **37**

Figura 4 Estágios celulares observados no Trad-MCN. Todas as lâminas foram coradas com carmim acético 2% e fotografadas em microscópio óptico. As lâminas de A até S foram fotografadas em aumento 40 X e a lâmina T em aumento 4 X. MCN = Micronúcleo. **37**

Artigo 02

Figura 1 Spatial distribution of the study site, delimiting the southern region of the Legal Amazon and the cities studied. Georeferencing of sampling stations for the Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) assay. **40**

Figura 2 Active exposure, micronuclei frequency in *T. pallida* at the study sites. **42**

Figura 3 Passive exposure, micronuclei frequency in *T. pallida* at the study sites. **42**

Figura 4 Micronucleus frequencies in *T. pallida* in active and passive monitoring. **42**

Artigo 03

Figura 1 Geographical location of sites of study, delimiting the region of the Brazilian Amazon. **64**

Artigo 04

Figura 1	Geographic location of the study site.	**87**
Figura 2	Distribution of environmental variables in the study site.	**88**
Figura 3	Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA.	**89**
Figura 4	Analysis of the cytotoxicity induced by PM_{10} in CC104 strains.	**90**
Figura 5	Cell viability of human lung fibroblast treated with PM_{10} extract by MTT assay.	**91**

Artigo - Anexo

Figura 1	Localização dos pontos de monitoramento de *Tradescantia pallida* em canteiros públicos da cidade de Tangará da Serra.	**101**
Figura 2	Fases dos botões florais de *Tradescantia pallida*.	**101**
Figura 3	Células-mãe de grãos de pólen de *Tradescantia pallida* var. purpurea.	**104**
Figura 4	Índice de precipitação pluviométrica (mm) ocorrido na região de Tangará da Serra/MT no ano de 2009.	**105**
Figura 5	Morfologias dos grãos de pólen viáveis e inviáveis de *T. pallida*.	**107**

RESUMO

A Amazônia Legal brasileira vem sendo impactada com o desenvolvimento econômico e o uso do solo não sustentável, em especial, devido à expansão das commodities agrícolas sobre as áreas de florestas e grandes projetos de infraestrutura. A região de Tangará da Serra/Brasil está localizada no Sul da Amazônia Legal, caracterizando-se pela produção de cana-de-açúcar não mecanizada, além de estar na rota de dispersão da pluma dos poluentes gerados pela queima de biomassa no arco do desmatamento. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial de genotoxicidade e mutagenicidade gerado pela exposição aos poluentes atmosféricos liberados a partir da queima de biomassa. Para tanto, foram realizados ensaios cromossômicos por meio da contagem de micronúcleo em sistema vegetal e humano, bem como análise de mutação gênica em sistema bacteriano. Os resultados mostraram uma forte correlação entre a exposição à poluição atmosférica da região e o aumento na frequência de micronúcleos em células de mucosa oral e de linhagem pulmonar humana, como também em células vegetais. O estudo também observou uma relação forte e significante entre a frequência de micronúcleos e a morbidade hospitalar por doenças respiratórias em criança. Em conclusão, o presente estudo mostra que o biomonitoramento através de um ensaio sensível e de baixo custo (ensaio de micronúcleo) pode ser uma alternativa para o monitoramento da qualidade do ar nas regiões remotas e pobres.

Palavras-chave: *Genotoxicidade. Mutagenicidade. Cana-de-açúcar. Micronúcleo. Amazônia.*

ABSTRACT

The Brazilian Legal Amazon have been impacted with the economic development is not sustainable, particularly given the expansion of agricultural commodities on forest areas. The region of Tangará da Serra / Brazil is located in the southern Amazon region, characterized by the production of cane sugar as well as non-mechanized be in the path of the plume dispersion of pollutants generated by biomass burning in the arc of deforestation. The objective of this study was to evaluate the genotoxicity and mutagenicity generated by exposure to air pollutants released from burning biomass. The results showed a strong relationship between exposure to air pollution in the region and increased frequency of micronuclei in oral mucosa cells and Human lung cells, as well as in plant cells. The study also noted a strong and significant correlation between the frequency of micronuclei and morbidity from respiratory diseases in children. In conclusion, this study shows that biomonitoring using a sensitive assay and low cost (micronucleus assay) may be an alternative for monitoring air quality in remote and poor regions**.**

Keywords: *Genotoxicity. Mutagenicity. Sugarcane. Micronucleus. Amazon.*

RESUMEN

La Amazonia brasileña Legal ha sido afectada con el desarrollo económico no sostenible, en particular, dada la expansión de los productos agrícolas en las zonas forestales. La región de Tangará da Serra/Brasil se encuentra en la región Sur de la Amazonía, que se caracteriza por la producción de caña de azúcar no mecanizada. La región está en el camino de la dispersión de la pluma de contaminantes generados por la combustión de biomasa en el arco de la deforestación. El objetivo de este estudio fue evaluar la genotoxicidad y mutagenicidad generados por la exposición a contaminantes del aire liberado de la quema de biomasa. Los resultados mostraron una fuerte relación entre la exposición y la contaminación del aire en la región y el aumento de la frecuencia de micronúcleos en células de la mucosa oral y células pulmonares humanas, así como en las células vegetales. El estudio también señala una correlación fuerte y significativa entre la frecuencia de micronúcleos y la morbilidad por enfermedades respiratorias en los niños. En conclusión, este estudio muestra que la vigilancia biológica al usar un ensayo sensible y de bajo costo (ensayo de micronúcleos) éste puede ser una alternativa para el monitoreo de la calidad del aire en regiones remotas y pobres.

Palabras Claves: *Genotoxicidad. Mutagenicidad. Caña de azúcar. Micronúcleos. Amazonas.*

1. INTRODUÇÃO

A região da Amazônia Legal corresponde a 61% da área do território brasileiro, e sofre com o avanço do desenvolvimento econômico desordenado, em especial, pelo agronegócio e pela pecuária, o que provoca mudança no padrão do uso do solo, tendo como consequência o aumento do desmatamento e o aumento da incidência de focos de queima de biomassa [1; 2]. A cana-de-açúcar destinada à produção de agrocombustíveis é um exemplo de agronegócio que está em plena expansão na região de bioma amazônico, impulsionado pela política de incentivo à produção e ao consumo tanto no cenário regional quanto no internacional. A queima da palha da cana-de-açúcar na época da safra é um método utilizado na produção brasileira para redução de custos e que resulta no aumento das concentrações de poluentes na atmosfera [3; 4; 5; 6]. Entre os compostos liberados na atmosfera pela queima da palha de cana, podem-se destacar o monóxido de carbono, material particulado, e o carbono elementar; como poluentes primários, e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e o ozônio, como poluentes secundários [7; 8; 9; 10].

Em termos de agravos à saúde humana gerados pela exposição aos poluentes atmosféricos, estudos têm demonstrado que o aumento nos níveis dos poluentes atmosféricos está associado ao aumento do número de internações hospitalares por doenças respiratórias [11; 12; 13; 14], tendo como população mais susceptível as crianças, os idosos e os portadores de doenças cardiorrespiratórias prévias, incluindo os asmáticos. A presença de um determinado poluente ou de uma mistura complexa pode ter a capacidade, em altas concentrações ou após longa exposição, de induzir danos na molécula do DNA não apenas em humanos, como também em animais, plantas e bactérias, podendo comprometer a saúde dos ecossistemas [15].

Entre os muitos biomarcadores empregados para avaliação do potencial tóxico dos poluentes presentes na atmosfera, a pesquisa de micronúcleo destaca-se por sua simplicidade metodológica e alta sensibilidade. O Teste de Micronúcleo em *Tradescantia pallida* foi primeiramente desenvolvido por Ma e colaboradores [16] e caracteriza-se como um dos ensaios genotóxicos mais utilizados pela comunidade científica para avaliar regiões impactadas por poluentes atmosféricos.

A quantificação dos micronúcleos também pode ser observada em humanos, por meio da realização de ensaios *in vivo* com células esfoliadas de mucosa oral ou *in vitro* com linhagem humana. Outros ensaios utilizando cepas bacterianas (*Salmonella typhimurium* ou *Escherichia coli*) na realização do ensaio do AMES ou Mutagênese para frente (direta), além de linhagens celulares estabelecidas através do ensaio Cometa também são muito utilizados na avaliação do potencial genotóxico advindo da exposição a poluentes atmosféricos [17; 18; 19; 20; 21; 22].

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Amazônia

A Amazônia está localizada ao Norte da América do Sul, ocupando uma área total de mais de 6,5 milhões de quilômetros quadrados, fazendo parte do território de nove países: Brasil, Venezuela, Colômbia, Peru, Bolívia, Equador, Suriname, Guiana e Guiana Francesa. O bioma amazônico tem 85% da área inserida em território brasileiro, em que ocupa mais de 05 milhões de quilômetros quadrados, aproximadamente 61% da área do país, recebendo a denominação de Amazônia Legal Brasileira [23]. Sua população, entretanto, corresponde a menos de 10% do total de habitantes do Brasil. Em termos de área, a Amazônia Legal é sete vezes maior que a França e corresponde a 32 países da Europa Ocidental. Em termos administrativos brasileiros, a região é composta dos seguintes Estados: Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, além de parte dos estados de Mato Grosso, Tocantins e Maranhão [24].

A região vem sendo impactada com o avanço do desenvolvimento econômico, em especial, pelo agronegócio e pela pecuária, o que provoca mudança no padrão do uso do solo, tendo como consequência o aumento do desmatamento e da incidência de focos de queima de biomassa, tanto em áreas de floresta nativa quanto de pastagem [1; 2]. Segundo dados coletados pelo Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) [25], a região concentra 62% dos focos de queimadas que ocorrem no Brasil durante todo o período do ano (Figura 01). Os Estados que concentram os índices de focos de queima são o Mato Grosso e o Pará [25].

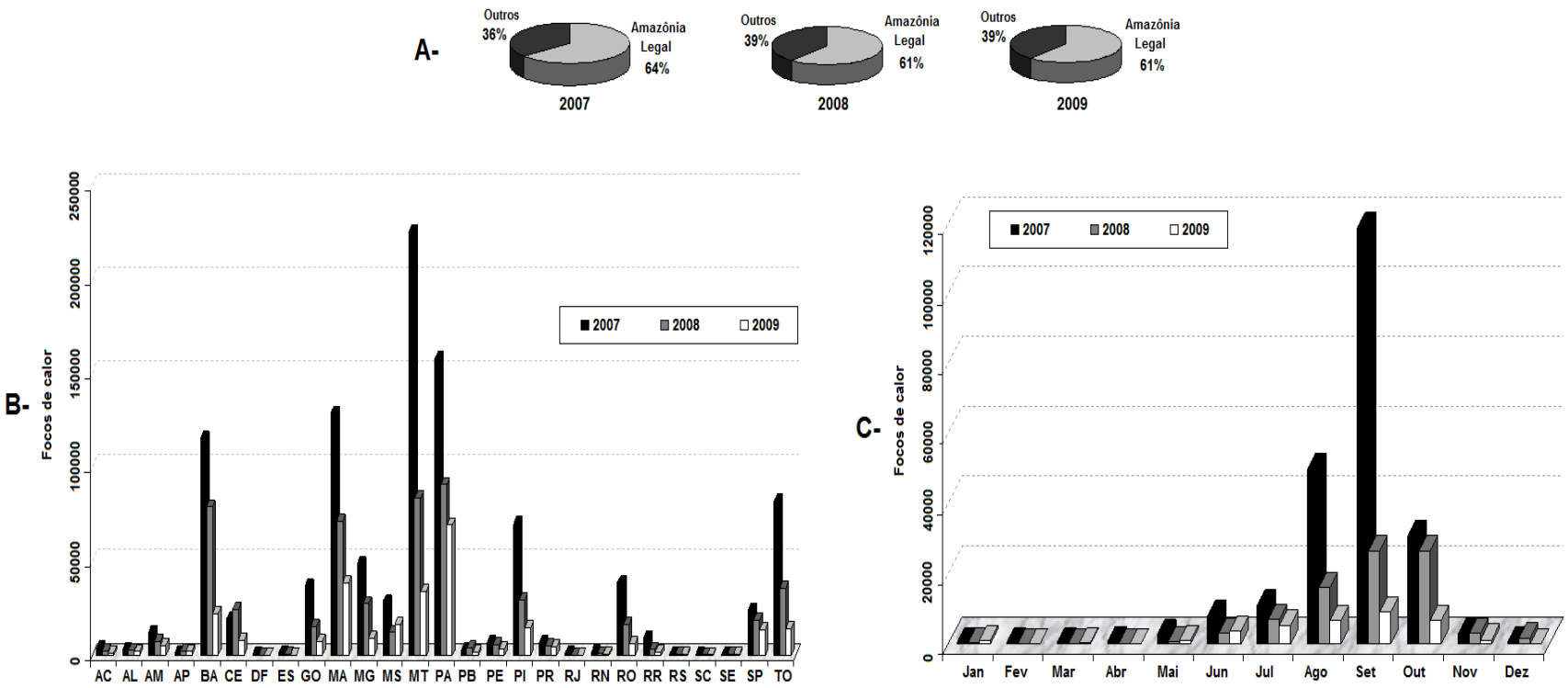


Figura 1 – Distribuição dos focos de calor no período de 2007-2009. **A** – focos de calor na Amazônia Legal comparado ao restante do Brasil. **B –** focos de calor por Estado brasileiro. **C**- focos de calor no Estado do Mato Grosso. Fonte: INPE [25]

2.2. Cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar e seus subprodutos vêm apresentando marcante importância em todo curso da história da humanidade. Remonta ao século 03 d.C. a utilização do açúcar de cana como produto medicinal em algumas regiões do Norte da Índia. Em 1170 d.C., o álcool foi preparado medicinalmente em países da Europa e, até o século XVI, era vendido em boticas como remédio. O cultivo de cana foi introduzido no Brasil por Martim Affonso de Souza, em 1532, iniciando na capitania de São Vicente (Estado de São Paulo) e, anos depois, sendo introduzido com sucesso na região Nordeste, especialmente nas capitanias de Pernambuco e Bahia. A indústria alcooleira foi uma consequência da produção açucareira, uma vez que o álcool podia ser obtido a partir da destilação do mel residual, proveniente da fabricação do açúcar [26].

Os primeiros incentivos governamentais para introdução do álcool como fonte de energia ocorreu no governo do presidente Getúlio Vargas na década de 30. Em 1975, o presidente Ernesto Geisel criou o programa Nacional de Álcool Anidro (Proálcool) que tinha como meta a produção e o incentivo a mistura do álcool combustível à gasolina, objetivando diminuir a dependência nacional ao combustível fóssil produzido fora do país. Com o agravamento da crise do petróleo, em 1979, o presidente João Figueiredo deu início à segunda fase do programa que culminou com a produção de veículos movidos exclusivamente a álcool [26]. O final da guerra Irã-Iraque no início da década de 90, e a pressão econômica das potenciais produtoras de petróleo fizeram com que o programa Proálcool fosse gradativamente sendo deixado de lado. A retomada do incentivo à produção de cana se deu como consequência às boas condições de comercialização do açúcar no mercado internacional e ao incentivo mundial ao uso de combustíveis menos poluentes ocorridos nos primeiros anos do governo de Luiz Inácio Lula da Silva [4].

A produção canavieira brasileira ocupa uma posição de liderança no cenário internacional, à frente de países como Índia, China e Paquistão. Na safra de 2008, a produção brasileira atingiu 558.717.700 toneladas, apresentando, com isso, um crescimento de 14,2% em comparação ao colhido na safra de 2007 [6; 27]. A área plantada brasileira cobre 7,4 milhões de hectares, com rendimento de 76,5 t ha^{-1}, sendo a produção distribuída em 357 usinas/destilarias por todo o país. O incentivo à produção de biocombustível associado à crescente demanda e ao preço no mercado internacional proporcionaram condições favoráveis para o crescimento da destinação da cana colhida para a produção de álcool combustível. A Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) estima para a safra de 2008 um crescimento de 17,8% na produção de álcool total, contabilizando 27.085.982.400 mil litros e com um rendimento de 6.280 L ha^{-1}. Do total de cana colhida, 57% (317.823.000 t) serão destinada à produção de álcool, representando um aumento de 17,3% em comparação a safra de 2007 [6; 27]. O Estado do Mato Grosso apresenta-se como um dos maiores produtores de cana do país, apresentando produção superior a países como Vietnã e Cuba, e caracterizando-se como uma produção voltada para a fabricação de etanol. Números da CONAB [6] indicam uma produção na safra de 2008 na ordem de 14.277.500 t, sendo 10.136.300 t destinadas à produção de álcool e representando 815.646.100 litros produzidos. O município de Tangará da Serra, localizado no Sudoeste do Estado do Mato Grosso, encontra-se geograficamente inserido numa região que concentra 77,7% de toda cana cultivada no Estado (Figura 02) [6; 27; 28; 29].

Os impactos ambientais gerados pela produção e comercialização do álcool combustível não são tão positivos quanto aqueles que o governo menciona. O uso abusivo de agrotóxicos durante o plantio [30] e a queima da palha da cana para facilitar o corte e melhorar o rendimento dos cortadores são práticas usuais em quase todos os 97 países produtores, inclusive no Brasil. Alguns Estados produtores (SP, PR, MS, GO e MG) adotaram ajustes de

conduta para tratar da eliminação da queimada no processo produtivo da cana-de-açúcar, visando à redução gradual da área queimada com base num calendário e tendo como objetivo final a eliminação desta prática. O aumento do controle do corte manual tem estimulado a mecanização das colheitas, que já chega a 35% na região Centro-Sul [4].

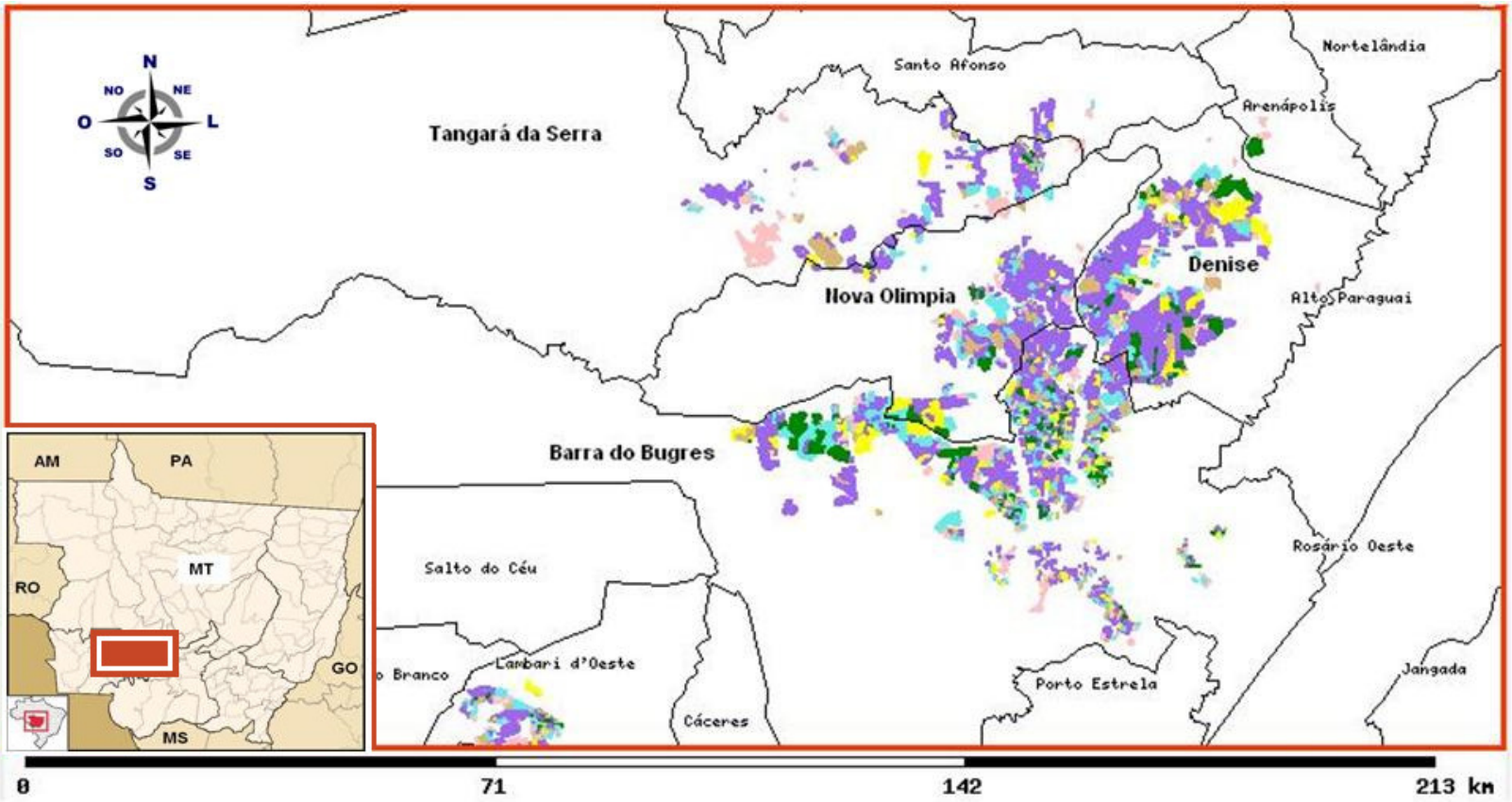


Figura 02 - Área plantada de cana-de-açúcar na região de Tangará da Serra/MT no ano de 2009. Fonte: Adaptado de CANASAT [29].

2.3. Queima de Biomassa x Poluição Atmosférica x Agravos a Saúde

A combustão é um processo químico pelo qual a matéria orgânica reage com o oxigênio do ar, podendo ser classificada como completa ou incompleta. A combustão completa se caracteriza pela oxidação do carbono e hidrogênio a dióxido de carbono e água, ocorrendo apenas em condições ideais. A combustão incompleta (mais comum) caracteriza-se pela produção de uma mistura complexa de compostos obtidos por meio de processos de redução (ex.: hidrocarbonetos e amônia) ou por processos de oxidação incompletos (ex.: monóxido de carbono) (Figura 03) [31].

Os compostos derivados da combustão são encontrados na fumaça, a qual, frequentemente, consiste em partículas respiráveis e gases. A fumaça é uma mistura complexa com componentes que dependem do tipo de combustão, do conteúdo do material, da quantidade de biomassa queimada, dos aditivos existentes no material (ex.: agrotóxicos e fertilizantes) e da temperatura da combustão [32]. Entre os vários compostos gerados direta e indiretamente pela queima de biomassa, destacam-se os óxidos de carbono, enxofre e nitrogênio, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, material particulado e o ozônio como importantes compostos tóxicos. Além desses compostos, também são produzidos o metano, a amônia, o cloreto de metila, o hidrogênio e o carbono elementar (Black Carbon) [33].

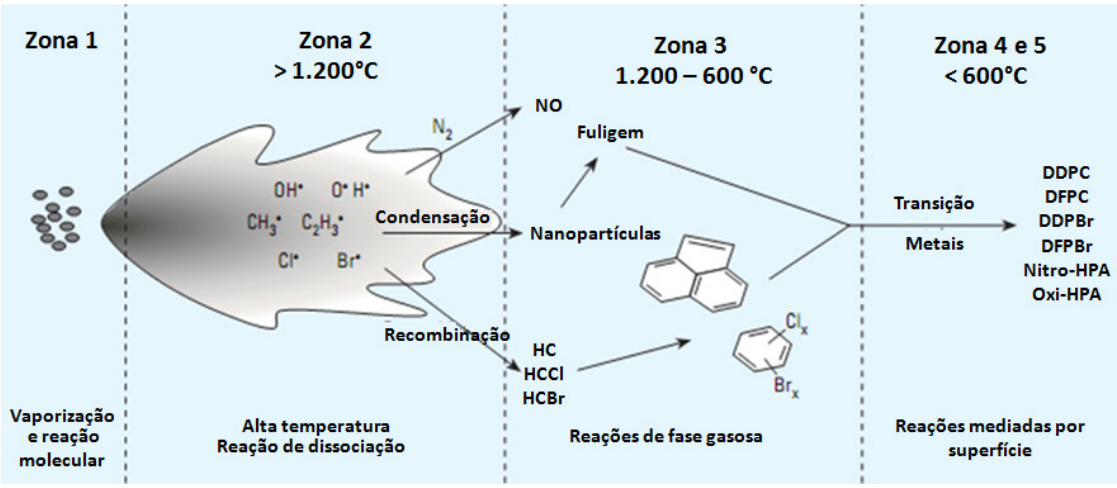


Figura 03 – Etapas da combustão do material orgânico num incinerador. Fonte: Adaptado de Cormier e colaboradores [34]. HC: Hidrocarbonetos. HCCl: Hidrocarbonetos clorados. HCBr: Hidrocarbonetos bromados. DDPC: Dibenzo-p-dioxinas policloradas. DFPC: Dibenzo-p-furanos policlorados. DDPBr: Dibenzo-p-dioxinas polibromadas. DFPBr: Dibenzo-p-furanos polibromados.

O material particulado (PM) é uma mistura complexa de substâncias originadas de fontes naturais ou antropogênicas. O PM é classificado segundo o diâmetro da partícula suspensa no ar em: material particulado total (TPM), com diâmetro menor que 100 µm; partículas grossas (PM_{10}), com diâmetro entre 2,5 e 10,0 µm; partículas finas ($PM_{2.5}$), com diâmetro entre 0,1 e 2,5 µm, e partículas ultrafinas ($PM_{0.1}$), estas últimas definidas como partículas com diâmetros menores que 0,1 µm (Figura 04) [35; 36]. Os materiais particulados grosso, fino e ultrafino são classificados como inaláveis por terem a capacidade chegar ao trato respiratório. As partículas ultrafinas não permanecem longos períodos na atmosfera por se aglutinarem em partículas de tamanho maiores [37]. Quanto à sua origem, as partículas grossas são predominantemente originadas a partir de processos mecânicos ou da ressuspensão de partículas presentes no solo superficial da crosta terrestre; as partículas finas e ultrafinas, que constituem aproximadamente 90% de todo o material particulado, formam-se

predominantemente a partir da queima de biomassa ou através da fragmentação de partículas maiores [38; 39; 40].

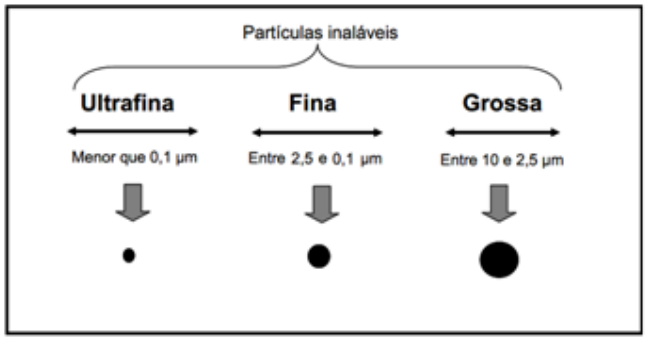


Figura 04 – Diâmetro do material particulado capaz de chegar ao trato respiratório. Fonte: Adaptado de Alves [41].

O material particulado fino e ultrafino tem a capacidade de passar através das barreiras naturais do organismo e, com isso, penetra diretamente no trato respiratório inferior, atuando em nível alveolar (Figura 05). Quanto menor o diâmetro, mais fácil será a penetração no organismo através da circulação sistêmica [9].

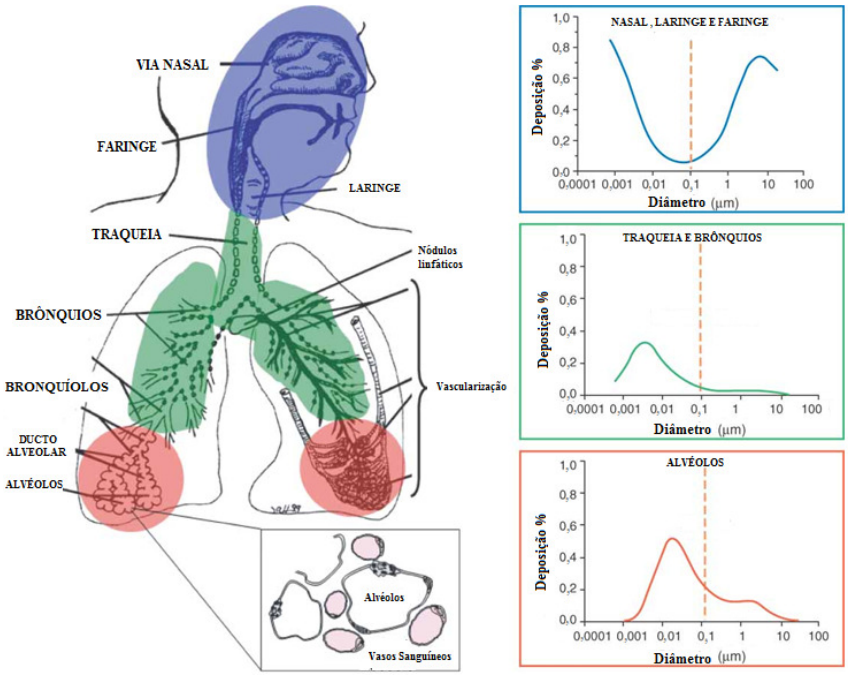


Figura 05 – Deposição do material particulado no trato respiratório humano. Fonte: Adaptado de Elder e colaboradores [42].

O mecanismo toxicodinâmico pelo qual o PM atuaria no desdobramento das doenças respiratórias ainda não foi totalmente elucidado e tem sido alvo de diversos estudos. O mecanismo tóxico mais aceito seria a capacidade de desencadear uma resposta inflamatória a partir da interação com células de defesa (ex.: macrófagos) (Figura 06) [8]. Esse mecanismo pré-inflamatório estaria diretamente associado com a liberação de radicais livres (espécies reativas de oxigênio – ERO) que teriam a capacidade de estimular a cascata inflamatória, como também, desencadear danos na molécula do DNA das células. Como consequência, podemos observar um comprometimento da função pulmonar, aumento da susceptibilidade alergênica e da incidência de infecções respiratórias [9; 43].

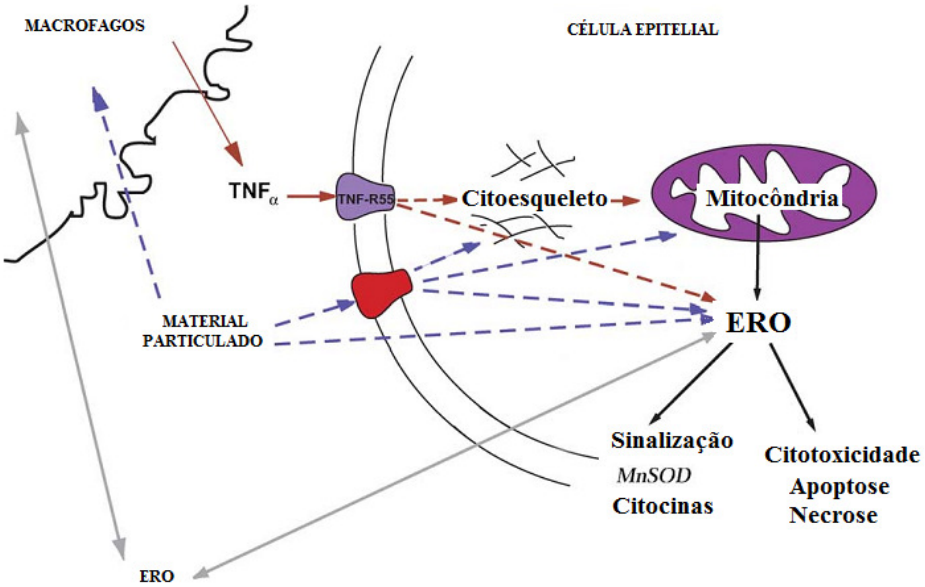


Figura 06 – Mecanismo tóxico inflamatório sugerido para o particulado ambiental no epitélio pulmonar. Fonte: Adaptado de Gonzáles-Flecha [44]. TNF$_\alpha$: Fator de Necrose Tumoral alfa. ERO: Espécie reativa de oxigênio. *MnSOD*: Enzima Mn Superóxido dismutase.

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são importantes agentes tóxicos gerados pela queima de biomassa devido à sua comprovada propriedade mutagênica e

carcinogênica. Entre os diversos tipos de HPAs, 16 compostos são considerados contaminantes pela Agência Norte Americana de Saúde [45]. Em estudo realizado por Magalhães e colaboradores [3] na região de Araraquara/SP, caracterizada pela intensa produção de cana-de-açúcar, foi identificada a presença de HPAs com propriedade genotóxica, entre eles: benzo(g,h,i)pirileno, indeno(1,2,3-cd)pireno, benzo(e)pireno, benzo(a)antraceno e o pireno. O Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) observou que, durante o período das queimadas na região canavieira de Ribeirão Preto/SP, a concentração de ozônio mensurado na atmosfera foi o dobro da concentração normal estabelecida pela Organização Mundial de Saúde [46]. Estudos mostram que tanto o ozônio quanto os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos apresentam a capacidade de gerar danos à molécula DNA através da formação de 8-oxo-dG ou adutos (Figura 07) [47; 48; 49].

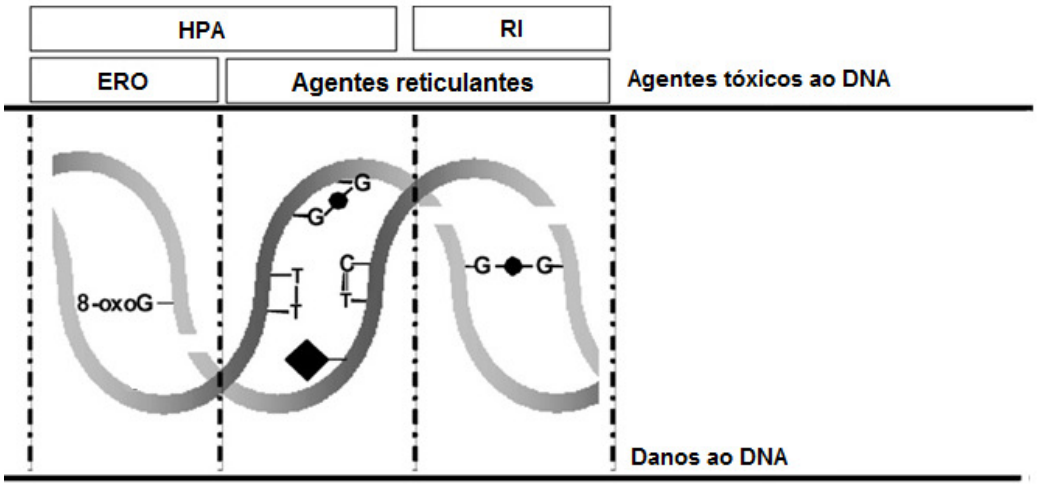


Figura 07 – Toxicodinâmica dos diferentes agentes tóxicos presentes no ambiente. Fonte: Adaptado de Iarmarcovai e colaboradores [47]. HPA: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. RI: Radiação ionizante. ERO: Espécie reativa de oxigênio.

Em termos de agravos à saúde humana gerados pela exposição aos poluentes oriundos da queima de biomassa, sabe-se que crianças, idosos e pessoas com doenças

cardiorrespiratórias prévias, incluindo os asmáticos, compõem a população mais suscetível aos efeitos da exposição à poluição atmosférica. As doenças respiratórias fazem parte de um grupo de consequências mais facilmente evidenciáveis. No entanto, a poluição pode, especialmente entre crianças, desencadear doenças cardiovasculares, respiratórias, mentais e câncer (Figura 08) [50; 51; 52; 53; 54; 55].

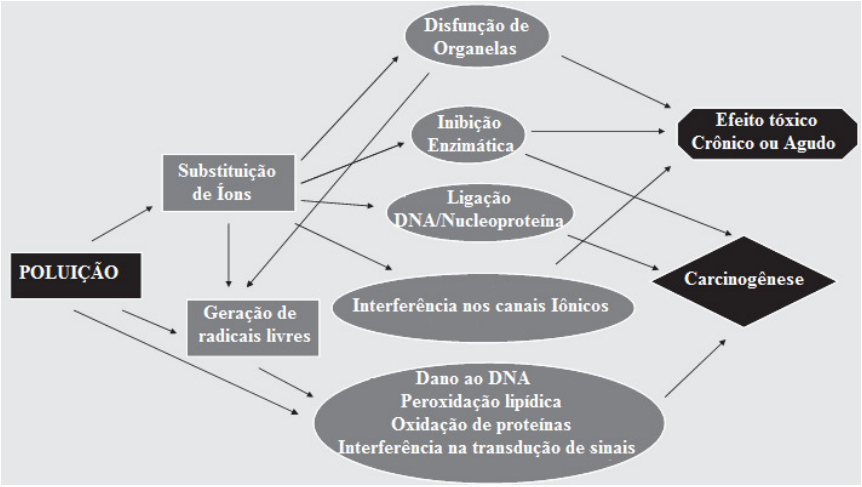


Figura 08 – Mecanismo carcinogênico dos poluentes ambientais. Fonte: Adaptado de Kampa & Castanas [56].

Ensaios experimentais têm demonstrado que o acréscimo nos níveis dos poluentes do ar está associado ao aumento do número de internações hospitalares por doenças respiratórias [11; 12; 57]. Braga e colaboradores [58], em estudo realizado em Itapira/SP no período de 2003-2004, analisaram a exposição de crianças menores de treze anos às concentrações de PM_{10}, encontrando um aumento de 12% no número de atendimentos por Doenças do Aparelho Respiratório (DAR), associado ao aumento de 10µg/m^3 diário de PM_{10}. Em estudo realizado em Piracicaba/SP no período de 1997-1998, Cançado e colaboradores [59] avaliaram internações por DAR em crianças menores de 15 anos e concluíram que o aumento de 10 µg/m^3 de $PM_{2.5}$ proporcionou um aumento de 21% nas hospitalizações.

Existem poucos estudos que relacionam os efeitos sobre a saúde e a exposição à poluição do ar em consequência da queima da cana-de-açúcar [14; 60; 61; 62]. A poluição do ar gerada pela queima da palha da cana no período de pré-colheita resulta em sérios agravos à saúde de populações expostas, especialmente crianças e idosos, particularmente nos períodos de estiagem associados com a baixa umidade relativa do ar. Um estudo realizado em Piracicaba/SP mostrou que a queima da cana contribuiu em 60% da geração de partículas finas e promoveu um aumento nas concentrações de PM_{10} e $PM_{2.5}$, refletindo em um expressivo aumento do número de casos de internações hospitalares associados a problemas respiratórios. O número médio de internações hospitalares por agravos respiratórios em crianças foi mais do que o dobro das registradas para os idosos no mesmo período [14; 59]. Estudo realizado por Bruce e colaboradores [43] em países em desenvolvimento evidenciou uma relação entre a deposição de partículas de carbono nos pulmões e a exposição do indivíduo à queima da biomassa.

2.4. Genotoxicidade Ambiental

Em ambientes onde as concentrações dos poluentes são elevadas, dependendo da toxicidade do poluente, estes podem induzir efeitos genotóxicos não apenas em humanos, mas também em animais, plantas e bactérias, podendo comprometer a saúde dos ecossistemas [15]. Entre os muitos bioindicadores empregados para avaliação do potencial mutagênico da atmosfera, destacam-se os ensaios *in vitro* com bactérias e os testes em cultura celular ou com plantas devido à sensibilidade destes organismos à maioria dos agentes tóxicos ambientais.

2.4.1. Ensaios de genotoxicidade *in vivo*

O ensaio de micronúcleo em vegetais foi primeiro utilizado por Evans e colaboradores [63] em experimentos *in vitro* com raiz de *Vicia faba,* sendo hoje aplicado em outros modelos

vegetais, como *Allium cepa* e *Tradescantia sp.* (Commelinaceae), e é amplamente utilizado em pesquisas visando ao monitoramento ambiental [64].

O Teste de micronúcleo em *Tradescantia pallida* (Trad-MCN) é considerado por muitos pesquisadores uma importante ferramenta, devido à simplicidade da metodologia e à sensibilidade desta planta à exposição aos agentes genotóxicos [65; 66]. O ensaio Trad-MCN com *Tradescantia* clone 4430 foi validado por Ma e colaboradores [16] através da exposição da planta a 140 tipos de substâncias com diferentes propriedades. Os micronúcleos são estruturas resultantes de cromossomos inteiros ou de fragmentos cromossômicos que se perdem na divisão celular e, por isso, não são incluídos no núcleo das células filhas, permanecendo no citoplasma das células interfásicas (Figura 09) [67]. Refletem, portanto, a ocorrência de danos estruturais nos cromossomos ou no fuso mitótico, permitindo detectar a ação de agentes clastogênicos e/ou aneugênicos [68].

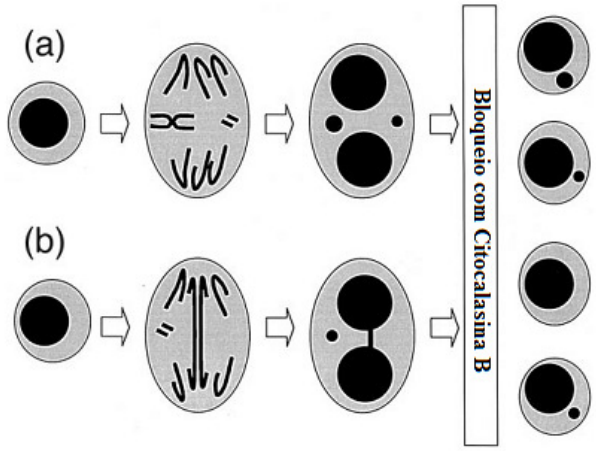


Figura 09 – Diagrama esquemático da formação dos micronúcleos. Fonte: Adaptado de Fenech [69]. (a) micronúcleos formados por danos clastogênico e aneugênico. (b) micronúcleo formado por dano clastogênico.

Outros ensaios utilizando *Tradescantia* que podem ser utilizados no biomonitoramento ambiental são: o ensaio por mutação do pelo estaminal em *Tradescantia* (Trad-SHM) e a

pesquisa por aborto de pólen (Trad-Pólen). O Trad-SHM baseia-se na mutação pontual (mitótica) na qual é suprimida a expressão do caráter azul dominante em flores de plantas heterozigóticas, resultando no aparecimento da cor rosa recessiva. Este teste também pode ser conhecido como ensaio do filamento do estame da *Tradescantia* e foi desenvolvido por Underbrink e colaboradores [70], e Sparrow e colaboradores [71]. Além da detecção de mutação somática em radiobiologia, este ensaio também foi utilizado na mutagênese química e monitoração da poluição atmosférica [72; 73].

Os testes envolvendo a *T. pallida* (Trad-MCN) têm sido mundialmente utilizados como um excelente indicador de possível dano ao material genético por substâncias tóxicas presente nas mais diversas formas. Dentre as aplicabilidades, consta na literatura científica a sua eficácia no monitoramento da poluição ambiental urbana [15; 66; 74; 75; 76; 77; 78; 79; 80], poluentes industriais [81; 82; 83; 84], incineração de resíduos urbanos [85], naftaleno [86; 87], radiação [65; 88; 89], ozônio [90], tolueno e derivados [91], solo contaminado [92] e agrotóxicos [93].

Na monitorização dos danos causados aos seres humanos pela exposição aos agentes presentes no ambiente, o ensaio de micronúcleo em células esfoliadas de mucosa oral (Oral-MCN) tem sido amplamente usado devido à sua simplicidade no processo de execução e à excelente sensibilidade. O teste tem a capacidade de detectar danos no DNA da célula nos mais diferentes estágios de maturação. Dentre os danos detectados, temos: Micronúcleos (danos aneugênicos ou clastogênicos), Broto nuclear ou Nuclear bud (falha na amplificação gênica), Binucleação (falha na citocinese) e Fragmentação nuclear (falha mitótica) (Figura 10) [94]. A escolha de crianças como público fonte em diversos trabalhos de abordagem genotóxica tem se mostrado uma ferramenta importante, pois estas, além de serem mais susceptíveis ao desenvolvimento de agravos oriundos da exposição a agentes tóxicos, também sofrem menor influência de possíveis fatores de confundimento associados a danos ao DNA, como, por exemplo: tabagismo, alcoolismo, exposição ocupacional e estilo de vida [95; 96].

Na literatura científica, observamos o emprego do ensaio Oral-MCN nas mais diversas áreas. Na área ocupacional, observamos trabalhos analisando a frequência de micronúcleos (MN‰) frente à exposição a agrotóxicos [97; 98; 99; 100], a foto-copiadora [101], a agentes citostáticos [102], a solventes orgânicos [103], ao diesel [104], a HPAs [105], ao benzeno [106; 107], e ao formaldeído [108; 109]. Estudos também associaram o uso do telefone celular [110], o consumo do tabaco [111; 112; 113], o consumo crônico de álcool [114], hábitos de higiene oral [115], uso de antineoplásicos [116], consumo de Folato por mulheres em menopausa [117] ao dano no material genético das células esfoliadas de mucosa oral. Na área ambiental, observamos estudos que utilizaram o ensaio em células de mucosa oral para avaliar a genotoxicidade da exposição ao ozônio [118], às dioxinas [119], ao arsênio [120; 121] e à poluição urbana [122; 123]. A literatura científica também já demonstrou uma correlação positiva entre a MN‰ e doenças como Diabetes [124], Síndrome de Down [125], Amigdalite crônica [126] e câncer [94].

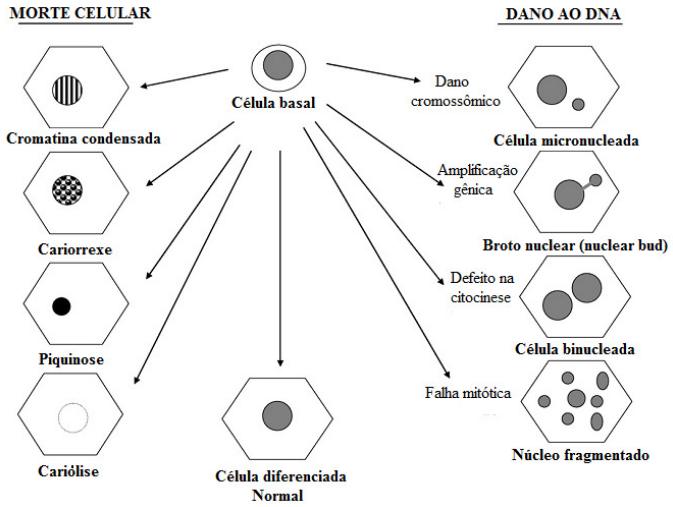


Figura 10 – Diagrama esquemático de diferentes tipos de células bucais e os possíveis mecanismos para sua origem. Fonte: Adaptado de Holland e colaboradores [94].

2.4.2. Ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade *in vitro*

A avaliação da genotoxicidade por meio da realização de testes *in vitro* pode ser obtida com o uso de plasmídeos. O teste se fundamenta na capacidade que algumas substâncias químicas apresentam de quebrar as ligações fosfodiéster do DNA, produzindo alterações na conformação plasmidial. O mesmo plasmídeo tratado pode ser submetido a outros testes que detectam outros tipos de lesões que não chegam a quebrar a fita de DNA, como o ensaio para detecção de sítios abásicos por meio da exonuclease III [127].

O plasmídeo é uma molécula circular dupla de DNA capaz de se reproduzir independentemente do DNA cromossômico bacteriano. O pBCKS (pBluescript II KS) apresenta 3.400 pares de base, sendo produzido a partir do pUC19. O plasmídeo apresenta um gene de resistência ao clorafenicol, o que permite a seleção do vetor em bactérias e contém o gene lacZ, o qual pode ser usado como alvo para mutagênese, uma vez que pode estabelecer α complementação em bactérias com genótipo *lac*ZΔM15 [128].

A eletroforese é uma técnica de separação de moléculas que envolvem a migração de partículas em um meio gelatinoso durante a aplicação de uma diferença de potencial. A eletroforese em gel de agarose é um método simples e rápido para separação e visualização de fragmentos de DNA. Para se avaliar as possíveis lesões geradas na molécula de DNA, adotam-se como parâmetros a forma e o tamanho das bandas após corrida. Quando na sua forma íntegra, o plasmídeo se apresenta sob a forma supernovelada (forma I), a qual migra rapidamente, colocando-se em uma posição mais distal em relação ao ponto de aplicação no gel. Ocorrendo quebra em uma das fitas do seu DNA, ele assume a forma circular-relaxada (Forma II), proporcionando migração mais lenta e se coloca em posição mais próxima em relação ao ponto de aplicação do DNA. Um aumento da forma II, com redução da forma I, pode ser interpretado como resultante de quebra na cadeira fosfodiéster após exposição com agente genotóxico. Em alguns casos extremos, determinadas substâncias, podem proporcionar

duas quebras na ligação fosfodiéster, uma em cada fita de DNA, fazendo com que o plasmídeo assuma uma forma linear (forma III). Essa forma linear é favorecida por sua conformação e migra mais rápido que a forma II, colocando em uma posição intermediária entre as forma I e II no gel de agarose [128].

A avaliação do potencial mutagênico de um determinado composto ambiental pode ser obtida através do uso de espécies bacterianas que apresentam mutações pontuais conhecidas. Linhagens bacterianas derivadas da *Escherichia coli*, denominadas de CC, tem um importante papel na detecção da mutagenicidade pelo fato de apresentarem mutações no códon para o ácido glutâmico, o que possibilita a detecção de mutagenicidade por meio de dois sistemas: mutagênese reversa com o gene *lacZ* e mutagênese para frente com o gene *rpoB* [129].

A detecção da mutagenicidade através do sistema de mutagênese direta consiste na exposição de cepas da linhagem CC a um meio enriquecido com rifampicina, e posterior observação do crescimento de colônias mutantes. O ensaio fundamenta-se na capacidade que a rifampicina tem de ligar-se à subunidade β da enzima RNA polimerase, inibindo, com isso, a transcrição de genes importante para codificação de proteínas indispensáveis para a sobrevivência bacteriana. O processo mutacional responsável pelo crescimento de colônias no meio com rifampicina é resultado de uma mutação por substituição de bases no gene *rpoB*, o qual é responsável pela codificação da subunidade β da RNA polimerase [130].

Dentre as várias linhagens de CC104 utilizadas nos laboratórios científicos, as linhagens selvagem (proficiente de reparo) e mutante (deficiente em reparo de DNA) são as mais utilizadas nos ensaios de mutagenicidade. A linhagem mutante (CC104*mut*M*mut*Y) é deficiente em duas enzimas (Formamidopirimidina-DNA-glicosilase e a MutY-glicolase) envolvidas no sistema de reparo de lesões oxidativas. A dupla deficiência proporciona um aumento na frequência de mutação espontânea em virtude da ocorrência de lesões oxidativas geradas durante o metabolismo celular. A deficiência de FPG proporciona um aumento na

taxa de mutação espontânea (transversões do tipo G→T) devido ao acúmulo de 8-oxo-7-hidrodesoxiguanosina no DNA [131]. Já a deficiência de MutY-glicolase proporciona um acúmulo de falhas por emparelhamentos errôneos de bases nitrogenadas e também uma deficiência no processo de sinalização de sítios abásicos [132].

O teste de mutagênese para frente também permite avaliar a citotoxicidade do composto em estudo por meio da análise da sobrevivência bacteriana após o tratamento em relação ao controle. Nesse caso, as cepas CC104 e CC104*mut*M*mut*Y são distribuídas em meio contendo estreptomicina e tetraciclina/canamicina, respectivamente.

Embora sejam observados na literatura relatos que mostram a capacidade do PM e do ozônio em gerar estresse oxidativo após exposição, não existem trabalhos publicados que utilizaram o ensaio de mutagênese direta para detecção de eventos mutacionais desencadeados pela exposição a poluentes atmosféricos [48; 49]. Trabalhos realizados com diversos fitocompostos, como: óleo de coco [133], aroeira (*Schinus terebinthifolius)* [127; 128], *Eugenia caryophyllata* [134] e a lectina de folhas de *Bauhinia monandra* (BmoLL) [135], mostram a capacidade deste ensaio para detecção de mutagênese associada ao estresse oxidativo.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- Avaliar o potencial genotóxico dos poluentes atmosféricos oriundos da queima de biomassa na região de Tangará da Serra/MT.

3.2. Específico

- Determinar a toxicidade do material particulado captado em amostrador ativo através da quebra do DNA plasmidial da *E. coli;*
- Avaliar o potencial mutagênico do material particulado captado em amostrador ativo por meio do ensaio de mutagênese para frente com cepas mutantes de *Escherichia coli*;
- Avaliar a citotoxicidade do material particulado captado em amostrador ativo através do:
    - Ensaio de viabilidade com cepas bacterianas (proficientes e mutantes de *E. coli*);
    - Ensaio de viabilidade em linhagem celular pelo método MTT com MRC5.
- Avaliar a frequência de micronúcleos em células binucleadas de MRC5.
- Avaliar a frequência de micronúcleos em plantas de *T. pallida* (Trad-MCN) após exposição crônica (passiva) aos poluentes atmosféricos;
- Avaliar a frequência de micronúcleos em plantas de *T. pallida* (Trad-MCN) após exposição aguda (ativa) aos poluentes atmosféricos;

- Correlacionar os dados obtidos nos ensaios Trad-MCN com os dados de material particulado, meteorológicos e de internação por doenças respiratórias da população em idade escolar da região;
- Avaliar a genotoxicidade em um grupo populacional humano sensível (crianças) à exposição aos poluentes atmosféricos através da contagem de micronúcleos em células esfoliadas de mucosa oral (Oral-MCN);

4. METODOLOGIA

4.1. Área de estudo

O estudo foi realizado em uma microrregião localizada no Sudoeste do Estado do Mato Grosso/Brasil e que engloba os municípios de Barra do Bugre, Denise, Nova Olímpia e Tangará da Serra (Fig.1/ Artigo 02). A microrregião está inserida numa área de transição entre o Bioma Amazônico e o Cerrado, com ciclos de seca e chuva típicos que modificam os níveis de poluição atmosférica. Os dados meteorológicos mostram uma temperatura média de 25ºC e umidade em torno de 80%, podendo atingir 25% ou menos em períodos de seca extrema [136].

Todos os municípios sofrem com a influência direta da pluma dos poluentes gerados pelo arco do desmatamento da Amazônia brasileira, como também dos poluentes oriundos de outros países e da cultura canavieira [5]. O Estado do Mato Grosso tem um total de 11 usinas de beneficiamento da cana-de-açúcar em pleno funcionamento, estando as duas maiores usinas (Barralcool e Itamarati) localizadas na microrregião estudada [29].

A região apresenta uma população de 152.422 habitantes distribuídos numa área de 23.728,712 km^2 [137]. A rede de saúde é composta por 259 leitos distribuídos entre hospitais particulares e unidades mistas de saúde, em que 111 leitos estão à disposição do Sistema Único de Saúde [138]. Tangará da Serra é o principal município da região com 79.870 habitantes, em que 90% residem na área urbana [139]. O município de Chapada dos Guimarães/MT, com uma população de 17.821 habitantes distribuídos numa área de 5.983,595 km^2, foi adotado como área controle neste estudo por apresentar melhor qualidade do ar quando comparado aos outros municípios, mesmo sendo influenciado pelas mesmas variáveis meteorológicas (Tab.1/Artigo 02).

4.2. Dados Ambientais

Os dados de PM_{10}, $PM_{2.5}$, Black Carbon e Ozônio da atmosfera dos municípios integrantes da microrregião de Tangará da Serra foram mensurados pela rede de monitoramento da qualidade do ar do Programa LBA/GEPA da USP, por meio do uso do Amostrador fino e grosso (AFG), Dataram, Aetalômetro e do Medidor de Ozônio. A atmosfera foi amostrada tanto no período seco (maio-outubro) quanto no período chuvoso (novembro-abril) no ano de 2008.

Outra fonte de dados ambientais que foi utilizada neste trabalho foi a disponibilizada pelo Sistema de Informações Ambientais Integrados à Saúde Ambiental – SISAM (http://sisam.cptec.inpe.br/msaude/). As médias diárias dos poluentes atmosféricos (material particulado fino) e das variáveis meteorológicas (precipitação pluviométrica, umidade e temperatura) dos municípios de Barra do Bugres, Chapada dos Guimarães, Denise, Nova Olímpia e Tangará da Serra foram obtidas através do modelo atmosféricos CATT-BRAMS (Coupled Aerosol and Tracer Transport model to the Brazilian Regional Atmospheric Modeling System), nos períodos seco e chuvoso, nos anos de 2008 e 2009 [140]. O modelo CATT-BRAMS é um modelo 3D Euleriano que permite o prognóstico da concentração de determinados poluentes atmosféricos de forma simultânea e consistente no estado atmosférico simulado pelo modelo BRAMS (baseado no modelo RAMS). Uma descrição mais detalhada desse modelo foi apresentada por Freitas e colaboradores [10; 141; 142].

4.3. Dados de Saúde

Os dados referentes às taxas de internação hospitalar por doenças respiratórias (Capítulo X/CID-10) ocorridas na região de estudo e na área controle, nos períodos seco e chuvoso dos anos de 2008 e 2009, foram obtidos de bancos de dados disponibilizados pelo Ministério da Saúde através das Autorizações de Internação Hospitalar (AIH) do

Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (http://www.datasus.gov.br). Foi calculada a taxa de internação padronizada (Internações hospitalares/1000 habitantes) em crianças (idade < 5 anos), utilizando-se dados populacionais disponibilizados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [137]. As crianças foram selecionadas para este estudo por se tratarem de um grupo extremamente susceptível ao desenvolvimento de agravos oriundos da exposição aos poluentes atmosféricos, como também por sofrerem menor influência de possíveis fatores de confundimento (ex.: consumo de álcool e/ou cigarro) [95; 96].

4.4. Coleta, gravimetria e extração do PM_{10} amostrado em filtros Teflon

O material particulado grosso foi coletado em filtros Teflon (diâmetro de 47 mm) de forma contínua por 48 horas durante os períodos seco (agosto-outubro) e chuvoso (novembro-dezembro) do ano de 2008 no município de Tangará da Serra/MT. Depois de amostrados, os filtros Teflon foram embalados em papel alumínio, climatizados e transportados para o Instituto de Física da Universidade de São Paulo em que foram realizadas as análises gravimétricas.

Com o propósito de realizar as análises genotóxicas, os filtros foram transportados para o Laboratório de Mutagênese Ambiental da UFRN em que foi realizada uma extração pelo método de ultrassom usando diclorometano (DCM) na proporção de 1:1 entre o solvente (ml) e o PM_{10} (mg). O volume do extrato foi reduzido em Rotavapor e seco com nitrogênio puro. A concentração de material orgânico extraído foi determinada e a amostra foi armazenada a -20 °C em 5 ml de DCM. Para os ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro*, as amostras foram homogeneizadas em DMSO para obter concentrações de 0,1; 0,5 e 1,0 $mg.L^{-1}$ de PM_{10} orgânico. O protocolo de amostragem e pesagem dos filtros Teflon, como também a extração orgânica do $PM_{10,}$ foi descrito com mais detalhes por Alves [41] na sua dissertação de mestrado.

4.5. Teste de genotoxicidade *in vitro* com DNA plasmidial

Os ensaios *in vitro* com DNA plasmidial bacteriano seguiram o protocolo de tratamento e leitura descrito por Rolim e colaboradores [143] e Sisenando e colaboradores [135]. Todos os testes foram repetidos três vezes.

4.5.1. Pesquisa de quebra no DNA plasmidial

Um µg de pBCKS foi tratado por 1 h a 37º C com três concentrações do extrato orgânico de PM_{10}. O ensaio incluiu um controle negativo (plasmídeo tratado com extrato orgânico obtido dos filtros brancos) e um controle positivo (plasmídeo tratado com a enzima Bam *HI*). As quebras no DNA plasmidial foram avaliadas através da presença das formas linear e circular, uma vez que a quebra na cadeia fosfodiéster promove o relaxamento da tensão da forma supernovelada.

4.6. Ensaio de Mutagênese para frente e citotoxicidade com cepa selvagem e mutante de *Escherichia coli.*

As culturas *Escherichia coli* do tipo selvagem (CC104) e mutante (CC104*mut*M*mut*Y) foram diluídas em meio Lysogeny Broth (LB) juntamente com as concentrações dos extratos orgânicos de material particulado para 10^3 células/mL e incubadas por 20-24 horas com agitação constante (200 rpm) a 37 °C. Após a incubação, o conteúdo dos tubos foi dividido em duas séries, o primeiro foi usado na análise mutagênica e o segundo na análise de citotoxicidade. Para a análise de citotoxicidade, uma nova diluição para 10^3 células/mL foi realizada com meio LB, e 100 µL desta diluição foi novamente semeada em Agar LB suplementado com estreptomicina (50 µg/µL) para CC104; e tetraciclina (50 µg/ µL) e mais canamicina (50 µg/µL) para CC104*mut*M*mut*Y. As placas foram incubadas por 18-20 horas a

37 °C e as colônias contadas. A sobrevivência foi calculada a partir da razão entre o número de colônias após o tratamento e número de colônias no controle negativo. Para a análise de mutagenicidade, alíquotas de 100 µL de culturas tratadas (sem diluição) foram semeadas em Agar LB suplementado com rifampicina (100 µg/µL) e incubadas por 18-20 horas a 37 ºC. O controle positivo utilizado no experimento foi a luz ultravioleta (30 W Lâmpada germicida UV a partir do material irradiado para 0 e 60 segundos) e o extrato orgânico obtido dos filtros brancos serviu como controle negativo. As colônias foram contadas e a taxa de mutação estabelecida como a razão entre o número de colônias em meio com e sem rifampicina. Este ensaio foi realizado em triplicata, e seguiu o protocolo descrito por Sisenando e colaboradores [135].

4.7. Ensaio de viabilidade celular com linhagem de pulmão humano (MTT Assay).

As células MRC-5 (5 x 10^4 células/mL) foram cultivadas em microplacas de 96 poços contendo 200 µL de DMEM/poço por 24 horas a 37 ºC. Após este período de crescimento celular, as células foram tratadas com as concentrações do extrato orgânico obtido dos filtros de Teflon expostos à poluição atmosférica, com sete réplicas por concentração. Para o grupo controle, foi utilizado o extrato orgânico obtido a partir dos filtros brancos. As células foram mantidas em incubação por 24, 48 e 72 horas, e, após este período, as células foram lavadas com 100 µL de PBS. Uma solução de MTT (250 mg L^{-1}) foi adicionada em todas as concentrações e, novamente, as células foram incubadas a 37ºC por 4 horas, tempo necessário para a redução do MTT. As placas foram agitadas por 10 minutos e a absorbância correspondente a cada amostra foi medida no leitor de placas (Elisa Microplate Autoreader) a 550 nm. A absorbância considerada foi proporcional ao número de células viáveis. Este ensaio foi realizado repetido duas vezes e seguiu o protocolo descrito por Zhao e colaboradores [22].

4.8. Ensaio de Micronúcleo *in vitro* em linhagem de pulmão humano (CBMN Assay).

O Ensaio foi iniciado a partir da semeadura de $1,5 \times 10^5$ células em placas de cultura com seis poços, após 24 horas de incubação, as células foram tratadas com diferentes concentrações do extrato orgânico de PM_{10}. A Citocalasina B (Sigma) foi adicionada 24 horas mais tarde em uma concentração final de 6 µg/mL. Para os controles negativos, as células foram tratadas com DMEM e com DMSO. Nos controles positivos, as células foram tratadas com 10 ng/mL de uma mistura de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Após 48 horas de exposição, as células foram colhidas, fixadas com solução fixadora (metanol-ácido acético 3:1), e, posteriormente, coradas com Giemsa 10% (solução estoque diluído 1:10 em PBS) por 7 minutos, lavadas em água destilada e secas a temperatura ambiente. Para cada tratamento, a presença de micronúcleos foi avaliada em 3.000 células contadas através de microscópio óptico em aumento de 400 x. O índice de divisão nuclear (IDN) foi calculado para cada ponto experimental de acordo com Eastmond e Tucker [144].

As células foram marcadas para determinar a frequência de 1, 2, 3 ou 4 núcleos, e o IDN foi calculada pela fórmula:

$$\mathbf{IDN} = \frac{(M_1 + 2\,M_2 + 3\,M_3 + 4\,M_4)}{N}$$

Onde:

- M_1, M_2, M_3 e M_4 representam o número de células que apresentam de 1 a 4 núcleos;
- N foi o número total de células contabilizadas;
- O IDN é um parâmetro útil para comparar os efeitos dos agentes citostáticos examinados no ensaio CBMN.

4.9. Ensaio de Micronúcleo em Tradescantia pallida (Trad-MCN Assay).

Neste estudo, foram realizados 02 (dois) tipos de avaliação: Ativa e Passiva. Na avaliação ativa, as *T. pallida* foram cultivadas em vasos (50 cm x 17 cm x 17 cm) com solo orgânico e regado diariamente. Após o período de recuperação os vasos, foram dispostos em 06 (seis) pontos amostrais (Figura 01/Artigo 02), regados diariamente. A avaliação passiva foi realizada em 06 (seis) pontos, usando plantas da mesma espécie e que cresciam nos jardins públicos das cidades avaliadas neste trabalho (Figura 01/Artigo 02). A escolha dos pontos no ensaio passivo teve como critérios de inclusão a proximidade com os pontos adotados para o monitoramento ativo e a existência de plantas cultivadas há mais de 01 (um) ano. A coleta das inflorescências foi realizada ao mesmo tempo nos 02 (dois) tipos de avaliação, ocorrendo em 02 (dois) períodos distintos, período seco (maio/2008 a outubro/2008) e período chuvoso (novembro/2008 a abril/2009).

As inflorescências foram fixadas em solução de etanol-ácido acético (3:1) por 24 horas e transferidas para uma solução de etanol 70% para estocagem [145]. Os botões florais contendo tétrades em estágios iniciais foram dissecados, montados em lâminas e corados em carmim-acético 2% de acordo com o protocolo estabelecido por Ma e colaboradores [145]. A análise consistiu na contagem de 300 células em estágio de tétrades por lâmina, somando um total de 3.000 células por ponto, em que foi determinada a frequência média de micronúcleos (MN%) de acordo com os critérios adotados por Fenech [146].

4.10. Ensaio de Micronúcleo em células esfoliadas de mucosa oral (Oral-MCN Assay).

O teste foi desenvolvido de acordo com o protocolo estabelecido por Stich e colaboradores [147]. As amostras de mucosa oral foram coletadas em 574 crianças com idade entre 6-16 anos (446 diretamente expostas à queima de biomassa e 128 crianças moradoras da

área controle) durante a estação das queimadas (período seco), que ocorre entre os meses de maio a outubro.

As amostras foram obtidas esfregando levemente a mucosa oral dos participantes com uma escova do tipo Cytobrush. As células foram coletadas em frascos contendo 5 mL da solução tampão BC (0,1 M EDTA, Tris-HCl 0,01 e 0,02 mM de NaCl, pH 7), transportadas para o laboratório e armazenadas sob refrigeração até o momento do processamento. As amostras foram centrifugadas por 02 vezes a 1500 rpm por 10 minutos, descartando o sobrenadante e ressuspendendo o precipitado com 5 ml de Tampão BC. Cada participante gerou 2 (duas) lâminas que foram secas à temperatura ambiente por 48 horas e, posteriormente, fixadas em metanol gelado 80%. Após fixação, as lâminas foram coradas através da técnica de coloração desenvolvida por Feulgen & Ressenberck [148] e analisadas conforme critérios estabelecidos por Tolbert e colaboradores [149]. Um total de 1.000 células foi examinado por lâmina em microscopia óptica no aumento 100 x, contabilizando 2.000 células analisadas por participante. Todo o material utilizado na coleta das amostras foi individual e descartável.

4.11. Análise Estatística

Os dados foram analisados por meio da análise de variância com a subsequente realização de um pós-teste de comparação entre os valores médios obtidos pelos grupos testes e controle, de forma paramétrica ou não paramétrica, com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os dados de frequência de micronúcleo, ambientais e saúde também foram correlacionados através do método de Spearman usando o programa estatístico SPSS® versão 16. Os dados foram tabulados no programa Excel 2007® e estatisticamente analisados através dos programas InStat® e SPSS®.

4. 12. Outras Informações

Todo o material coletado foi analisado utilizando a infra-estrutura do Laboratório de Genética e Microbiologia da UNEMAT, Laboratório de Ecotoxicologia do CESTEH/FIOCRUZ e Laboratório de Mutagênese Ambiental da UFRN.

Todos os participantes foram informados e esclarecidos a cerca da pesquisa e assinaram um termo de consentimento que foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da Escola Nacional de Saúde Pública/FIOCRUZ – sob o número do CAAE 0054.0.031.000-08 (Parecer n° 38/2008).

5. ARTIGOS DA TESE

5.1. Artigos Publicados:

1. *Tradescantia pallida*: mais do que uma linda flor, um importante bioindicador da qualidade ambiental. ***Genética na Escola/SBG***, 2009.
2. Genotoxic potential generated by biomass burning in the Brazilian Legal Amazon by Tradescantia micronucleus bioassay: a toxicity assessment study. ***Environmental Health***, 2011.
3. Micronucleus frequency in children exposed to biomass burning in the Brazilian Legal Amazon region: a control study. ***BMC Oral Health****, 2012*.

5.2. Artigo Submetido:

4. Evaluation of mutagenic potential of particulate matter derived from biomass burning in Legal Brazilian Amazon: an environmental assessment study. ***Particle and Fibre Toxicology***, 2012.

5.1. Artigos Publicados:

ISSN 1980-3540

Genética NA ESCOLA

04.02, 09-13 (2009)
www.sbg.org.br

SBG

TRADESCANTIA PALLIDA: MAIS DO QUE UMA LINDA FLOR, UM IMPORTANTE BIOINDICADOR DA QUALIDADE AMBIENTAL.

Sisenando, H. A.[1*]; Batistuzzo de Medeiros, S. R.[2]; Hacon, S. S.[1]

1- Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca – ENSP/Fundação Oswaldo Cruz – Fiocruz.
2- Departamento de Biologia Celular e Genética/Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN.
* Correspondência do Autor: Avenida Leopoldo Bulhões nº 1480, Manguinhos, ENSP, Sala 620, CEP: 21041-210, Rio de Janeiro/RJ, Brasil.
E-mail: herbertsisenando@yahoo.com.br

Palavras-chave: Biomonitoramento, genotoxicidade, micronúcleo, poluição, Trad-MCN

Introdução

O desenvolvimento industrial e urbano, observado a partir do século XIX, desencadeou uma elevada tendência de emissão de agentes tóxicos na atmosfera (Machado, 2008). Entre as diversas fontes de emissão, podemos destacar: o aumento da frota de veículos nas cidades, a exploração industrial desordenada, as extensas áreas de queimadas no cerrado e nas florestas e o avanço do homem sobre áreas nativas de florestas. Os principais agentes tóxicos envolvidos nos processos de deterioração ambiental são: dióxido de carbono (CO_2), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Benzopireno), material particulado ($MP_{2,5}$ e MP_{10}), monóxido de carbono (CO), óxidos de enxofre (SO_2 e SO_3), óxidos de nitrogênio (NO e NO_2) e o ozônio (O_3) (Bernstein et al., 2004; Passarelli, 2003) .

Estudos realizados no estado de São Paulo mostraram que a poluição gerada pela ação do homem promove um aumento significativo nas concentrações de diversos compostos tóxicos, entre eles o material particulado grosso e fino, refletindo em um expressivo aumento do número de casos de internações hospitalares associados a problemas respiratórios (Cançado et al., 2006; Carmos et al., in press). Em ambientes onde as concentrações dos poluentes são elevadas, dependendo da toxicidade do mesmo, estes podem induzir efeitos genotóxicos não apenas em humanos, mas também em animais, plantas e bactérias, podendo comprometer a saúde dos ecossistemas (Isidori et al., 2003).

O teste de micronúcleo em Tradescantia (Trad-MCN) é considerado uma valiosa ferramenta por muitos pesquisadores devido à simplicidade da metodologia e sensibilidade desta planta à exposição aos agentes genotóxicos (Guimarães *et al*., 2000; Batalha *et al*., 1999). O teste foi desenvolvido, no Brookhaver National Laboratory - EUA, por Ma e colaboradores em 1976, e, inicialmente, utilizava como planta teste a Tradescantia clone 4430 que, posteriormente, foi sendo adaptado para a *Tradescantia pallida* (Ma *et al*., 1994; Batalha *et al*., 1999). A espécie *Tradescantia pallida cv. purpurea* é originária do leste do golfo do México e se caracteriza pela fácil adaptabilidade às condições climáticas (Chimpan e Sipos, 2009). A visualização de micronúcleo (MCN) a partir do teste Trad-MCN, após exposição a 140 tipos de substâncias, mostrou concordância de resultado em 67% quando comparado aos obtidos a partir do teste de Ames, nas mesmas condições experimentais (Ma *et al*., 1984). Os micronúcleos são pequenos fragmentos do núcleo que se formam a partir da quebra cromossômica (processo clastogênico) ou perda de um cromossomo inteiro do fuso celular (processo aneugênico) durante a mitose (divisão celular) refletindo, portanto, a ocorrência de danos de caráter genotóxico (Rodrigues *et al*., 1997).

Material e Métodos

O protocolo seguiu os procedimentos descritos por Ma (1981), Ma e colaboradores (1994), Rodrigues e colaboradores (1997), Alves e colaboradores (2001), Savoia e colaboradores (2009).

1. MODELO EXPERIMENTAL

Para desenvolver um experimento com base científica, é fundamental a adoção de alguns cuidados para que o experimento tenha reprodutibilidade e que os resultados sejam confiáveis. No estudo com *T. pallida in situ* como bioindicador da qualidade do ar se faz necessária a adoção de um ponto referência, também denominado de ponto de comparação negativo; este ponto será adotado como padrão para comparação dos resultados do ponto teste. As plantas expostas nos pontos testes e controle deveram ter sido cultivadas, cuidadas e regadas da mesma forma. É de fundamental importância que a

coleta de todos os pontos seja realizada na mesma época, para evitar viés no estudo. Dependendo do tipo do estudo, é aconselhável que as coletas sejam realizadas seguindo alguns parâmetros, que podem ser do período de distribuição de chuva (coleta no período seco e chuvoso) até correlacionado às estações do ano (coleta no inverno, primavera, verão e outono). Caso seja possível, o experimento pode adotar um ponto, sabidamente afetado pela poluição que se deseja avaliar, e usar como ponto de comparação positivo (controle positivo).

2. PREPARO DOS VASOS

Em uma floreira de plástico (com dimensões: 50 cm x 17 cm x 17 cm), mistura-se de forma homogênea os seguintes componentes: 2 partes de terra vegetal + 1 parte de substrato (ex.: Plantmax) + 1 parte de vermiculita fina + 1 parte de húmus de minhoca. Cada vaso deve receber no máximo 05 talos de *T. pallida*. Para melhorar o desenvolvimento das plantas, deve-se aplicar um fertilizante à base de NPK 10:10:10 na forma líquida, mensalmente, obedecendo a diluição do fabricante. Geralmente, processa-se a diluição de 1 colher de sopa (15 ml) do produto na sua forma concentrada em um litro de água. Cada vaso deve receber um volume aproximado de 350 ml de solução diluída, que deve ser aplicado diretamente sobre o solo e, preferencialmente, num horário com pouca incidência de raios solares.

3. SOLUÇÕES

3.1 SOLUÇÃO DE FIXAÇÃO (Solução de Carnoy)

Proporção de 3:1 de álcool etílico absoluto e ácido acético 45%. Para 1 litro de solução: 750 ml de álcool etílico absoluto + 250 ml de ácido acético 45%. Misturar e conservar em temperatura ambiente.

3.2 SOLUÇÃO DE COLORAÇÃO (Carmim acético 2%)

2 g de Carmim + 100 ml de ácido acético 45%. Misturar os componentes num condensador de refluxo com o auxílio de "bolinhas" de vidro durante 3 horas, espera esfriar e filtra a solução em papel filtro (21 mm). Armazenar em vidro âmbar sob refrigeração de 2-5ºC.

4. FIXAÇÃO

Retirar a inflorescência no formato de "barquinha" sem flor (Fig.1-B) com auxílio de uma pinça (Fig.2- G ou I) e armazenar em um recipiente com ótima vedação (Ex.: tubo do tipo Falcon ou coletor universal) com solução de Carnoy por 24 horas. Após o período de fixação, substituir a solução de fixação por álcool 70% e deixar armazenado por um período máximo de 6 meses.

5. CONFECÇÃO DAS LÂMINAS

Inicialmente, deve-se montar a bancada de trabalho de acordo com o exposto pela figura 2. Com o auxílio das pinças (Fig.2-G e I) e do explorador (Fig.2-F) é realizado o procedimento de dissecação da inflorescência, tendo como meta a retirada do botão que apresente células-mãe de grãos de pólen em estágio de tétrades. A escolha do estágio de tétrade para pesquisa de micronúcleo se dá pelo fato de que neste estágio a célula encontra-se em interfase (não divisão), o que facilita a visualização do núcleo e do possível MCN existente. Outra vantagem desse estágio celular é o tempo de duração (36-48 h), facilitando os procedimentos de análises.

As inflorescências jovens são as mais indicadas para a análise, por apresentar células em estágio de tétrade em botões de estágio intermediário. O botão escolhido deve ser dissecado e posteriormente macerado com o auxílio do estereomicroscópio, estilete histológico, do explorador e de uma gota de carmim acético 2%, devendo ser retirado todos os "debris" (fragmentos celulares resultantes da maceração do botão) antes de colocar a lamínula. Observar a presença de tétrades com auxílio da objetiva 4 X do microscópio óptico (Fig.4-T), caso seja positivo, deixar a lâmina em chapa aquecedora (70ºC) ou espiriteira por 8-15 segundos a fim de que permita a evaporação do excesso de corante e com isso melhore a visualização dos componentes celulares na lâmina. O processo de aquecimento das lâminas deve ser acompanhado com muita atenção, porque um excesso de aquecimento pode promover a abertura das tétrades, formação de micrósporos (Fig.4-S), o que inviabilizaria o teste. Ocorrendo sobreposição de células na tétrade ou excesso de corante, a lâmina com lamínula pode ser levemente pressionado com um papel absorvente, tomando o máximo cuidado para não quebrar a mesma.

6. ANÁLISE

As lâminas devem ser analisadas em microscopia óptica com objetiva de 40 X. Por lâmina, deve-se contar um total de 300 tétrades e a ocorrência de micronúcleo (Fig.4-P, Q e R) deve ser discriminada de acordo com o número total de MCN por tétrade (Fig.3). Para cada ponto de amostragem, deve ser analisado de 5-10 lâminas e o resultado expresso conforme a fórmula abaixo: onde "M" é o número de micronúcleos contados por lâmina do ponto e "n" é o número total de lâminas analisadas por ponto. O valor deve ser expresso como o número de micronúcleo por 100 tétrades contadas.

A grande maioria dos artigos científicos publica-

$$MCN_{Total} = \frac{\Sigma\ (M/3)}{n}$$

dos com tradescantia preconiza a utilização da análise de variância (ANOVA) associada a um teste não-paramétrico (Mann-Whitney, Tunkey ou Dunnet), estando a sua a escolha vinculada ao número de pontos e a forma como esses dados serão avaliados. Alguns artigos fazem uso da

análise de regressão linear com o propósito de associar a freqüência de micronúcleos à quantificação de determinados compostos presentes no ar (MP, CO, SO_2, O_3, outros) ou de determinadas condições ambientes (temperatura, umidade, outras) do local de estudo.

Considerações Finais

A ótima adaptação da planta ao clima brasileiro, a pouca complexidade do experimento e o baixo custo financeiro demonstram que este ensaio tem todo um potencial para se transformar numa valiosa ferramenta para fomentar o conhecimento científico, na área da genética, nas salas de aula de todo o Brasil. Também fortalece a ferramenta do biomonitoramento participativo, onde as comunidades locais podem ter acesso aos resultados de forma simples.

Figura 1. *Tradescantia pallida Purpurea: Inflorescência com flores (A), Inflorescência sem flor (B), vasos de T. pallida em ponto de exposição (C) e Flor (D).*

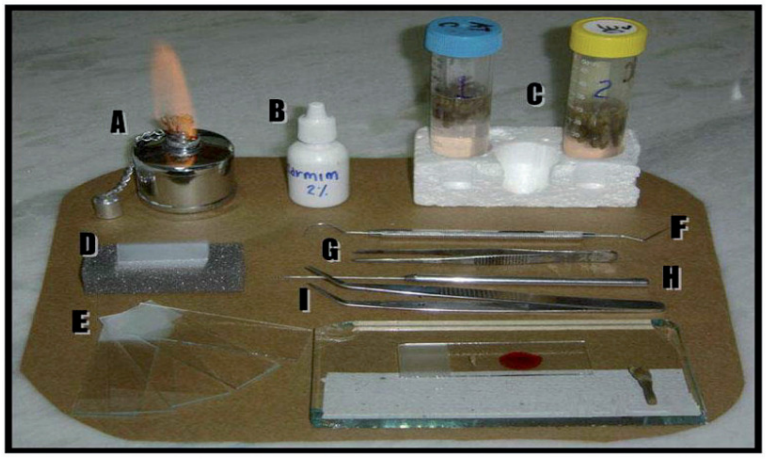


Figura 2. *Bancada de trabalho: Espiriteira (A), carmim acético 2% (B), Tubos com inflorescências fixadas e conservadas em álcool 70% (C), Lamínulas (D), Lâminas (E), Explorador dental (F), Pinça anatômica reta (G), Estilete histológico (H) e Pinça clínica (I).*

LABORATÓRIO DE MUTAGÊNESE AMBIENTAL

GRUPO EXPERIMENTAL	DATA COLETA	NUMERO DE MICRONUCLEOS POR TETRADE					TOTAL DE MICRONÚCLEOS (M)	M/3	ANORMALIDADE
		1	2	3	4	+			
A	B	C					D	E	F

Página: ( )

Figura 3. *Folha para coleta de dados no teste Trad-MCN: Inflorescência analisada em cada ponto (A), Data da coleta (B), Número de MCN encontrados por tétrade analisada (C), Total de MCN encontrados na inflorescência analisada (D), Total de MCN divididos por 3 (E) e Anormalidades encontradas na lâmina (F).*

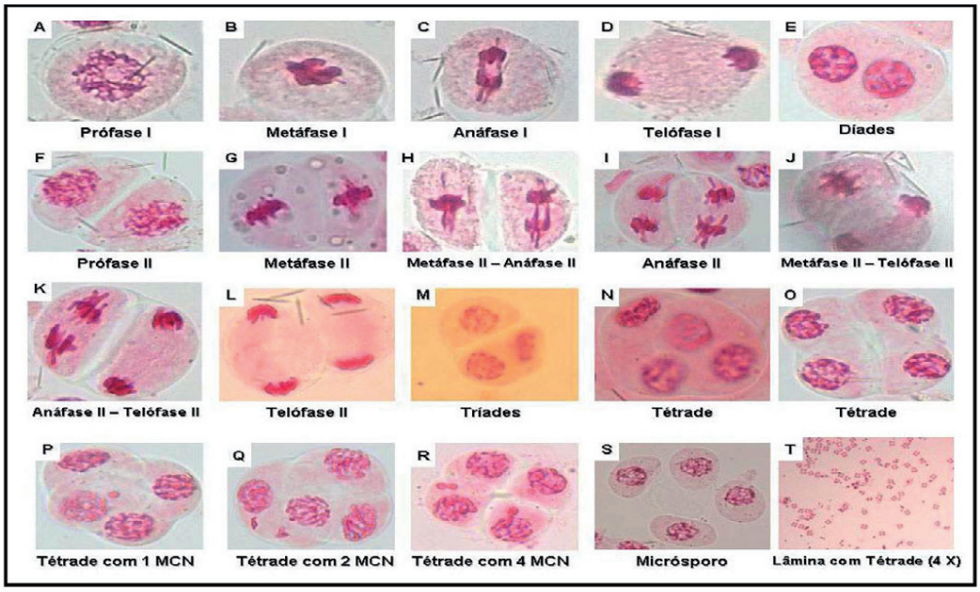


Figura 4. *Estágios celulares observados no Trad-MCN. Todas as lâminas foram coradas com carmim acético 2% e fotografadas em microscópio óptico. As lâminas de A até S foram fotografadas em aumento 40 X e a lâmina T em aumento 4 X. MCN = Micronúcleo.*

Referências

Alves ES, Giusti PM, Domingos M, Saldiva PHN, Guimarães ET, Lobo DJ (2001) Estudo anatômico foliar do clone híbrido 4430 de Tradescantia: alterações decorrentes da poluição aérea urbana. Rev Bras Bot 24: 597-576.

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

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

Cançado JE, Braga A, Pereira LA, Arbex MA, Saldiva PH, Santos UP (2006) Clinical repercussions of exposure to atmospheric pollution. J Bras Pneumol 32 (2): S5-S11.

Carmo CN, Hacon SS, Longo K, Freitas S, Ignotti E, Leon AP, Artaxo P (in press) Associação entre material particulado de queimadas e doenças respiratórias na região sul da Amazônia Brasileira. Rev Panam Salud Publica.

Chimpan C, Sipos M (2009). Anatomy of the vegetative organs of Tradescantia pallida Purpurea. Biharean Biologist 3: 1-4.

Guimaraes ET, Domingos M, Alves ES, Caldini N, Lobo DJA, Lichtenfels AJFC, Saldiva PHN (2000) Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brazil) with the Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) assay. Environ Exp Bot 44: 1-8.

Isidori M, Ferrara M, Lavorgna M, Nardelli A, Parrella A (2003) In situ monitoring of urban air in Southern Italy with the Tradescantia micronucleus bioassay and semipermeable membrane devices (SPMDs). Chemosphere 52: 121-126.

Ma TH, Cabrera GL, Chen R, Gill BS, Sandhu SS, Vandenberg AL, Salamone, MF (1994) Tradescantia micronucleus bioassay. Mutat Res 310: 221-230.

Ma TH, Harris MM, Anderson VA, Ahmed I, Mohammad K, Bare JL, Lin G (1984) Tradescantia-Micronucleus (Trad-MCN) tests on 140 health-related agents. Mutat Res 138: 157-167.

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

Machado ACFE (2008) Avaliação da viabilidade de utilização de Tradescantia pallida cv. Purpurea no biomonitoramento de fontes estacionárias de contaminação atmosférica. Instituto de Botânica. http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/teses_dissert/teses_dissert.htm.

Passarelli MM (2003) Toxicologia Ambiental. IN Oga S (ed.) Fundamentos de Toxicologia. 3nd edição. Editora Atheneu, São Paulo, capitulo 2.

Rodrigues GS, Ma TH, Pimentel D, Weinstein LH (1997) Tradescantia bioassays as monitoring systems for environmental mutagenesis: A review. Crit Rev Plant Sci 16: 325-359.

Savoia EJ, Domingos M, Guimaraes ET, Brumati F, Saldiva PH (2009) Biomonitoring genotoxic risks under the urban weather conditions and polluted atmosphere in Santo Andre, SP, Brazil, through Trad-MCN bioassay. Ecotoxicol Environ Saf 72: 255-260.

Sisenando *et al. Environmental Health* 2011, **10**:41
http://www.ehjournal.net/content/10/1/41

ENVIRONMENTAL HEALTH

RESEARCH Open Access

Genotoxic potential generated by biomass burning in the Brazilian Legal Amazon by Tradescantia micronucleus bioassay: a toxicity assessment study

Herbert A Sisenando[1,5*], Silvia R Batistuzzo de Medeiros[2], Paulo HN Saldiva[3], Paulo Artaxo[4] and Sandra S Hacon[1]

Abstract

Background: The Brazilian Amazon has suffered impacts from non-sustainable economic development, especially owing to the expansion of agricultural commodities into forest areas. The Tangará da Serra region, located in the southern of the Legal Amazon, is characterized by non-mechanized sugar cane production. In addition, it lies on the dispersion path of the pollution plume generated by biomass burning. The aim of this study was to assess the genotoxic potential of the atmosphere in the Tangará da Serra region, using *Tradescantia pallida* as *in situ* bioindicator.

Methods: The study was conducted during the dry and rainy seasons, where the plants were exposed to two types of exposure, active and passive.

Results: The results showed that in all the sampling seasons, irrespective of exposure type, there was an increase in micronucleus frequency, compared to control and that it was statistically significant in the dry season. A strong and significant relationship was also observed between the increase in micronucleus incidence and the rise in fine particulate matter, and hospital morbidity from respiratory diseases in children.

Conclusions: Based on the results, we demonstrated that pollutants generated by biomass burning in the Brazilian Amazon can induce genetic damage in test plants that was more prominent during dry season, and correlated with the level of particulates and elevated respiratory morbidity.

Background

The Amazon is located in the northern portion of South America and 85% of its area lies within Brazilian territory, where it is known as "Brazilian Amazon Region" and accounting for 61% of the country's area. The region has been negatively affected by advancing economic development, especially agribusiness and cattle raising. This has provoked changes in soil pattern use, resulting in increased deforestation and an increase in biomass burning in both native forest and pasture areas [1,2]. Sugar cane is an example of agribusiness that is in full expansion in the Amazon biome, driven by the political incentive to produce and consume biofuel both nationally and internationally. Brazil is one of the largest producers of biofuel worldwide, with most production concentrated in the Midwest region. Sugar cane straw burning at harvest time is widely used in Brazilian production to facilitate harvesting and increase the yield of manual cutting; however, this archaic procedure results in increased pollutant concentration in the atmosphere [3-6].

The Amazon accounts for 62% of the burnings that occur in Brazil during the dry and intermediate, dry and rain periods. The southern region of the Amazon had the largest number of biomass burning sites in the period from 2004 to 2007 [7]. Biomass burning is an organic matter combustion process, characterized by the release of different toxic compounds into the

* Correspondence: herbertsisenando@yahoo.com.br
[1]Escola Nacional de Saúde Pública - ENSP, Fiocruz, Rio de Janeiro, CEP: 21041-210, RJ, Brazil
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© 2011 Sisenando et al; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

atmosphere. These include carbon monoxide, nitrogen oxides, sulfur oxides, particulate matter and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), as well as the formation of ozone as a secondary pollutant [8-12].

In terms of the harm to human health associated with exposure to biomass burning pollutants, it is known that children, the elderly and individuals with previous cardiorespiratory diseases, including asthmatics, are the most susceptible to the effects of exposure to air pollution. Respiratory diseases are part of a group of more easily identified consequences; however, pollution may trigger cardiovascular diseases and other disorders, especially in children [13-17]. Studies have demonstrated that an increase in air pollution levels is associated to a rise in the number of hospitalizations for respiratory diseases [18-21].

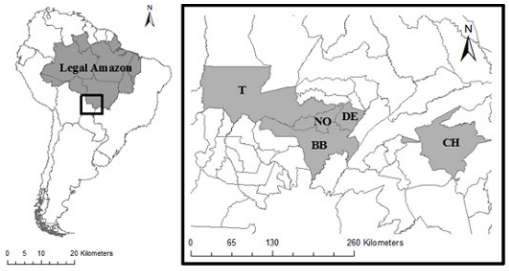
The presence of a determinate pollutant or of a complex mixture may have the capacity, at high concentrations or after long exposure, of inducing genotoxic effects not only in humans, but also in animals, plants and bacteria, possibly compromising the health of ecosystems [22]. Among the tests used to assess the mutagenic potential of air pollutants are micronucleus bioassays with plants. This type of assay was first used by Evans [23] in *in vitro* experiments with the *Vicia faba* root, and is now widely used in studies aimed at environmental monitoring through the use of other plant models such as *Allium cepa* and *Tradescantia sp* [24]. The micronucleus test in *Tradescantia pallida* (Trad-MCN) is considered a valuable tool by many researchers, due to the simplicity of the methodology and sensitivity of this plant to genotoxic agents [25]. Micronuclei are structures resulting from whole chromosomes or chromosomal fragments that are lost during cell division and, for this reason, are not included in the nucleus of daughter cells, remaining in the cytoplasm of interphase cells, allowing us to detect the action of clastogenic and aneugenic agents [26]. The relationship between exposure to air pollution and micronucleus synthesis was described by Souza-Lima et al. [27] in a study with ozone, by Alves et al. [28] in a study with PAH and by Carvalho-Oliveira et al. [29] in work involving $PM_{2.5}$.

The aim of this study was to assess the genotoxicity potential of biomass burning pollutants using *Tradescantia pallida* in two exposure models, associating micronucleus frequency with pollutant concentrations in the region and with the rate of hospitalization for respiratory diseases in children in 2008-2009.

Methods

Study region

The study was conducted in the Tangará da Serra microregion in a population of 152,422 inhabitants distributed over an area of 23,728,712 km^2, located in the southern of the Legal Amazon, encompassing the municipalities of Barra do Bugres (BB), Denise (DE), Nova Olímpia (NO) and Tangará da Serra (T-1 and T-2) (Figure 1). All cities received 1 monitoring station for the Tradescantia-micronucleus test except Tangará da Serra (T) that received 2 stations for being the main community in the microregion and shows the worst indicators of morbidity from respiratory diseases in the region [30,31]. The region is located in a transition area between the Amazon biome and the Cerrado, with typical cycles of drought and rain that alter air pollution levels, and lies in the dispersion path of the pollution plume resulting from burnings in the Legal Amazon and pollution emanating from neighboring countries [5,32,33]. The region is the largest sugar cane producer and contains the two largest plants in the southern of the Brazilian Amazon [34]. The municipality of Chapada dos Guimarães, Brazil (CH) was selected as control area in this study because of its better air quality. There is no industrial production or sugar cane burning and automobile traffic is light, compared to the other



Sites	Active exposure (A)		Passive exposure (P)	
	Longitude	Latitude	Longitude	Latitude
CH	15°28.112'S	055°45.074'O	15°27.438'S	055°44.839'O
BB	15°11.664'S	057°13.700'O	14°52.595'S	057°10.490'O
NO	14°46.999'S	057°17.301'O	14°46.310'S	057°17.246'O
DE	14° 43.676'S	57° 3.101'O	14°43.508'S	057°3.127'O
T-1	14°37.976'S	057°31.465'O	14°37.138'S	057°29.521'O
T-2	14°36.247'S	057°29.482'O	14°36.197'S	057°29.428'O

Data collected with GPS Garmin ©

Figure 1 Spatial distribution of the study site, delimiting the southern region of the Legal Amazon and the cities studied. Georeferencing of sampling stations for the Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) assay.

Table 1 Distribution of environmental and meteorological variables at all sampling stations.

Variables		CH	BB	NO	DE	T
PM $_{2.5}$ (μg/m^3)	D	9.9 (1.0)	20.9 (2.1)	20.8 (2.1)	19.3 (2.0)	20.9 (2.1)
	R	5.0 (1.0)	8.9 (1.8)	8.4 (1.7)	7.2 (1.4)	7.4 (1.5)
	Ratio D/R	2.0	2.4	2.4	2.7	2.8
Rainfall (mm/d)	D	1.1 (1.0)	1.0 (0.8)	1.1 (0.9)	0.9 (0.8)	0.9 (0.8)
	R	9.8 (1.0)	11.1 (1.1)	11.7 (1.2)	11.6 (1.2)	12 (1.2)
	Ratio R/D	8.9	11.1	10.6	12.9	13.3
Temperature (°C)	D	25.9 (1.0)	25.4 (1.0)	25.1 (1.0)	25.4 (1.0)	24.6 (0.9)
	R	25.4 (1.0)	25.2 (1.0)	24.8 (1.0)	25.0 (1.0)	24.4 (1.0)
	Ratio D/R	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Humidity (%)	D	51.2 (1.0)	55.7 (1.1)	56.3 (1.1)	55.3 (1.1)	57.4 (1.1)
	R	80.5 (1.0)	82.5 (1.0)	83.4 (1.0)	83.0 (1.0)	84.2 (1.0)
	Ratio R/D	1.6	1.5	1.5	1.5	1.5

D = data obtained in the dry season. R = data obtained in the rainy season. D/R = ratio between the dry and rainy season. R/D = ratio between the rainy and dry season. The data in parentheses represent the ratio between the data of each test site and the control site (CH).

municipalities involved. It was also chosen for the similarities in meteorological variables (rainfall, temperature and humidity) compared to other communities involved in this study (Table 1).

Tradescantia pallida micronucleus assay

In this study 2 types of assessment were used: Active and Passive. In active assessment, *T. pallida* were cultivated in vases (50 cm × 17 cm × 17 cm) containing organic soil, watered daily, as described by Meireles et al. [35] and Sisenando et al. [36]. After a plant adaptation period (3 months), the vases were placed in 6 sampling sites (Figure 1). Passive assessment was carried out at 6 points, using plants of the same species and that grew in public gardens in the cities evaluated in this work (Figure 1). The inclusion criteria for the passive assay points were the proximity to the points selected for active monitoring and the existence of cultivated plants for more than 1 year. Inflorescence collection was performed at the same time in the two assessment types, and during two different periods: the dry season (May/08 to October/08) and the rainy season (November/08 to April/09), in order to encompass the two climatic periods of the region. The inflorescences were fixed in ethanol-acetic acid solution (3:1) for 24 hours and transferred to a solution of 70% ethanol for storage [37]. The flower buds containing tetrads in their initial stages were dissected, mounted on slides and stained in 2% acetic-carmine, according to the protocol established by Ma et al. [37]. Analysis consisted of counting 300 cells in the tetrad stage per slide, totaling 3000 cells per sampling site, where mean micronucleus frequency (%MCN) was determined according to criteria adopted by Fenech [38].

Environmental and health data collection

Data on hospitalizations for respiratory diseases (Chapter X/ICD-10) in the study region and in the control area, during the dry and rainy season, were obtained from databanks for the period of May/08 to April/09, available by the Ministry of Health of Brazil in relation to Hospitalization Authorizations (HA) of the Department of Informatics (website: http://www.datasus.gov.br). The standardized rate was calculated (number of hospitalizations/1000 inhabitants) for children (age < 5 years), using population data from the Brazilian Institute of Geography and Statistics [31]. The children age group selected for this study is likely to be susceptible to the harmful effects of exposure to air pollution and less influenced by possible confounding factors (Ex.: alcohol and/or cigarette consumption) [39,40].

The daily means of air pollutant (fine particulate matter - $PM_{2.5}$) and of meteorological variables (rainfall, humidity and temperature) in the region under the direct influence of burnings and in the control area, during the rainy and dry seasons, were obtained from CATT-BRAMS (Coupled Aerosol and Tracer Transport model of the Brazilian Regional Atmospheric Modeling System) accessed through SISAM (System of Environmental Information Integrated to Environmental Health - 2009). CATT-BRAMS is a 3D Eulerian model that allows a simultaneous prognosis of the concentration of determinate air pollutants, consistent with the atmospheric state simulated by the BRAMS model (based on the RAMS model). A more detailed description of this model was presented by Freitas et al. [11,41,42].

Statistical analysis

To assess statistically significant differences among the different test points compared to the control point, during each period, the Kruskal-Wallis test was used followed by the Dunn multiple comparisons test. The statistically significant differences between the responses obtained in the dry and rainy seasons were analyzed using the Mann-Whitney test. This same test was also

used to assess the significance between the responses obtained in active and passive exposure at each sampling point and in both seasons.

Spearman's correlation was used to analyze the % MCN obtained in active and passive exposure, as well as environmental and health data in the study region. The data were tabulated and analyzed using Microsoft Office® 2007 and SPSS® 16.0.

Results

Figure 1 shows the southern region of the Legal Amazon and the municipalities involved in this study, in addition to the georeferencing of all the points sampled in the Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) assay under both exposure situations.

Table 1 shows the mean concentration of the environmental ($PM_{2.5}$) and meteorological (rainfall, temperature and humidity) variables modeled by CATT-BRAMS in all the municipalities studied. In relation to meteorological variables, we observed that the rainy season showed accumulated rainfall 10 times higher than that observed in the dry season. We observed no differences (ratio = 1) in air temperature between the dry and rainy seasons, but relative air humidity in the rainy period was on average 1.5 times higher. When we compared the temperature and humidity data of each season with those of the control, we observed that the ratios varied between 0.9 and 1.1, suggesting no difference between the data. With respect to environmental variable, we found that $PM_{2.5}$ demonstrated a profile in which the concentrations modeled in the dry season were about twice as high as the rainy season. When we compare the ratios obtained by dividing the data of each air pollutant exposure point by those obtained in the control, it can be observed that the exposure points were almost twice as large in the dry season and 1.5 times in the rainy season.

Mean micronucleus frequency (%MCN) in the active and passive exposures during the different periods is shown in Figures 2 and 3 respectively. The results of the two figures show that the %MCN obtained in the dry season were higher than those obtained in the rainy period. Statistically significant differences occurred in 58% of the sampling stations, especially the Denise and Tangará stations. A comparison between the micronucleus frequency of the test stations and the control station shows statistically significant differences in nearly all the comparisons during the dry season, unlike the rainy season, which exhibited no significant difference.

Figure 4 shows the distribution of %MCN in the municipalities and a comparison of the responses of the different types of exposure and periods sampled. No statistically significant difference was found between the two types of exposure, although we observed a greater response in terms of the increased number of micronuclei, in active exposure compared to passive, regardless of the period. When the two types of exposure are correlated using Spearman's method, a statistically significant positive correlation was observed ($r = 0.794$ $p = 0.006$).

Table 2 shows Spearman's correlation coefficient between the %MCN of each study area and their respective environmental and health data. Statistically significant positive correlations were detected between the %

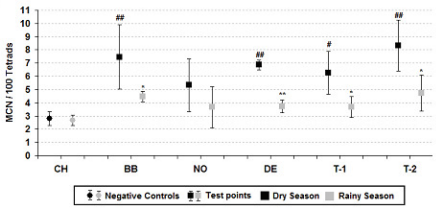


Figure 2 Active exposure, micronuclei frequency in *T. pallida* at the study sites. #$p < 0.05$ and ##$p < 0.01$ by Kruskal-Wallis. *$p < 0.05$ and **$p < 0.01$ by Mann-Whitney.

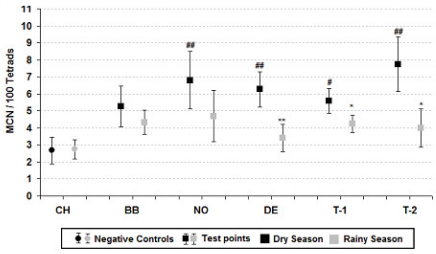


Figure 3 Passive exposure, micronuclei frequency in *T. pallida* at the study sites. #$p < 0.05$ and ##$p < 0.01$ by Kruskal-Wallis. *$p < 0.05$ and **$p < 0.01$ by Mann-Whitney.

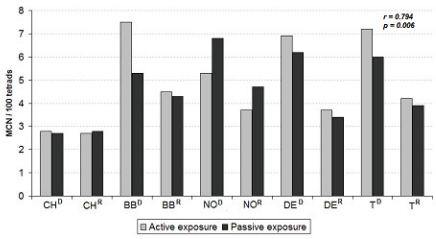


Figure 4 Micronucleus frequencies in *T. pallida* in active and passive monitoring. D = dry season. R = rainy season. Spearman's correlation coefficient (*r* and *p*) for the two types of exposure.

Table 2 Correlation coefficients (and corresponding significance level) between the average micronucleus frequency of the sampling stations and the corresponding environmental and health data.

Spearman's Correlation	MCN [a]	$PM_{2.5}$ (μg/m^3)	Rainfall (mm/d)	Temperature (°C)	Humidity (%)	RD-C [b]
MCN [a]	1.000	.818**	-.636*	-.030	-.297	.721*
	.	.004	.048	.934	.405	.019
$PM_{2.5}$ (μg/m^3)		1.000	-.806**	.176	-.612	.467
		.	.005	.627	.060	.174
Rainfall (mm/d)			1.000	-.418	.806**	-.152
			.	.229	.005	.676
Temperature (°C)				1.000	-.806**	-.467
				.	.005	.174
Humidity (%)					1.000	.236
					.	.511
RD-C [b]						1.000
						.

a = average micronuclei frequency under active exposure. b = adjusted rate of hospital morbidity from respiratory diseases in children (Chapter X/ICD-10). * Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed). ** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed). Data obtained in the dry and rainy period.

MCN and the means of the fine particulate matter - $PM_{2.5}$ (r = 0.818 p = 0.004) and the adjusted rate of hospital morbidity from respiratory diseases in children - RD-C (r = 0.721 p = 0.019). A substantial negative relationship was observed between micronucleus frequency and mean accumulated rainfall (r = -0.636 p = 0.048). No significant associations were found between micronucleus frequency and the other meteorological variables (temperature and humidity). An extremely significant correlation was observed between the means of fine particulate matter in relation to accumulated rainfall (r = -0.806 p = 0.005).

Discussion

The risk attributed to exposure to low levels of air pollution for human pathogenesis using only epidemiological tools requires long-term studies and the participation of a large number of individuals exposed to pollutants. This type of study has disadvantages such as the high operational cost and logistical complexity and because if the association is established, a considerable number of participants will already have developed the disease. Although plant mutagenesis and aggravated human health cannot be compared, the genotoxicity assay with *T. pallida* can be used as a screening tool to assess human risk under unfavorable environmental conditions [43].

With respect to environmental variables, studies by Alves et al. [28], Isidori et al. [22], Klumpp et al. [44] and Savóia et al. [45] show that air temperature may act as a possible confounding factor, promoting the increase in micronucleus frequency. In our study, this confounding factor was minimized by virtue of the climatological homogeneity of the points. This can be observed by the fact that the ratio between the temperature of each test station and that obtained in the control station ranged between 0.9 and 1.0. The micronucleus frequency found in the actively and passively exposed plants in the control area of Chapada dos Guimarães was similar to that observed in the control group of studies that also assessed the genotoxicity potential of compounds present in air pollution, conducted by Batalha et al. [46] and Guimarães et al. [25] in Brazil, Carreras et al. [43] in Argentina, and Prajapati & Tripathi [47] in India.

The comparative results between the environmental and meteorological variables (Tab. 1) at the different points and exposure periods corroborate those reported by Rosa et al. [33] about the delimitation of two well-defined climatic periods (dry and rainy). This fact interferes significantly in the number of biomass burning points and pollutant dispersion, given that the pollution generated by biomass burning in the Amazon reaches its peak during the dry season [7]. Studies conducted by Andrade Júnior et al. [48], Savóia et al. [45] and Souza Lima et al. [27] to assess the genotoxicity of pollutants present in the atmosphere, using the Trad-MCN test also adopted a similar exposure sampling period. Although the literature contains studies that were conducted with much shorter exposure periods, the results remained significant [43,47,49]. In relation to micronucleus frequency, the results show that the response obtained in the dry season was higher than those in the rainy season at 92% of the points and statistically significant at most of them, irrespective of exposure type. These findings may be explained by the fact that in the dry season there are a larger number of hotspots generated by biomass and sugar cane straw burning and thus higher levels of air pollutants, especially fine particulate matter. Regardless of the type of exposure, when we compare the results obtained at the test points compared to control, we

observe that, unlike the dry season, there are no significant differences in the rainy period. This may be owing to the lower number of burnings in this period [7], which generates a lower concentration of pollutants emitted into the troposphere and, associated to greater pollutant dispersion [50] during the rainy period, produced a reduction in %MCN at all the test points, in both exposures (active and passive).

When we analyze only %MCN of the dry season, we observe that stations DE, T-1 and T-2 showed the most important results, given that they were all statistically significant in both types of exposure. The response exhibited at station DE may be directly related to the proximity of the largest sugar cane plant of the region and to the fact that the municipality is the second largest sugar cane producer in the area, which contains large plantations surrounding the city limits where non-mechanized harvesting is still practiced [34]. The results of stations T (T-1 and T-2), both for micronuclei and pollutant levels, corroborate Ignotti et al. [30] and Rosa et al. [33], whose studies show that Tangará da Serra exhibits one of the worst indicators of morbidity and mortality from respiratory diseases in the southern region of Brazilian Amazon.

A comparison of %MCN obtained in the two types of exposure shows a very strong and statistically significant correlation (r = 0.794 p = 0.006), although there is an underestimation of passive compared to active response, in relation to the genotoxicity potential generated by air pollution. Other studies that used these two types of exposure simultaneously also obtained similar results when they evaluated the genotoxicity potential generated by pollutants emitted by the burning of fossil fuels in the cities of Feira de Santana/Brazil [35] and São Paulo/Brazil [25] using *T. pallida*. Meireles et al. [35] suggested that the difference between the two types of exposure may be due to an adaptation process of the plant, under passive exposure, to air pollutants at the exposure site. This likely adaptation of Tradescantia to air pollution was explained by Alves et al. [51], in a study conducted in São Paulo, Brazil, in which the reduction in stomata size on the abaxial surface of the leaves (region sensitive to air pollutants) after exposure to air pollutants, which provokes a reduction in gas exchange capacity and consequently in the possible effects that pollution has on the plant.

In terms of public health, the particulate matter is an important pollutant emitted into the atmosphere. Although the concentrations of fine particulate matter obtained in this study have been below the level suggested by the World Health Organization who is 25 μg/m^3/24 h, it is important to report that WHO in its Air Quality Guidelines show that the continuous exposure $PM_{2.5}$ concentrations even below the level suggested may increase the risks to the population exposed [52]. Studies conducted by Annesi-Maesano et al. [53] in France, Braga et al. [54] and Cançado et al. [20] in Brazil, Casas et al. [55] in Chile and Rojas-Martinez et al. [56] in México report a significant positive relationship between exposure to air pollutants and the increasing incidence of aggravated health in children. The main risk factor from this exposure is the capacity that these pollutants have to compromise pulmonary development [57], which causes impaired lung growth in children, increasing the risk of developing chronic obstructive pulmonary disease at adult age, as well as increased morbidity and mortality from cardiovascular diseases [56].

When we correlated the values of $PM_{2.5}$ during the entire period with the %MCN of active exposure, we observed a positive and extremely significant correlation (r = 0.818 p = 0.004), corroborating the results obtained by Batalha et al. [46], Carvalho-Oliveira et al. [29], Carreras et al. [43] and Prajapati & Tripathi [47]. All these results show the importance of this biomarker in the evaluating genotoxic damage caused by exposure to particulate matter generated by burning biomass. The fact that we observed no significant correlation between %MCN and air temperature (r = -0.30 p = 0.934), contrasts with work published by Isidori et al. [22], Klumpp et al.[44] and Savóia et al. [45]. This may be owing to the similarity in temperature data from all the points, regardless of the period, a situation that reduces the confounding factor. When we correlated rainfall with $PM_{2.5}$ data (r = -0.806 p = 0.005), we found a significant negative relationship, which shows that rain has a strong influence of biomass burning in the region. Indirectly, we observed that rainfall also has an important influence on micronucleus indices (r = -0.636 p = 0.048), since it reduces the number of burning points and pollutants emitted into the air.

The fact that we observed no statistically significant correlation between RD-C and the fine particulate matter (r = 0.467 p = 0.174) does not rule out the capacity of the latter to compromise the health of sensitive individuals. Mazzoli-Rocha et al. [58], in a study conducted with BALB/c mice exposed to particulate matter from sugar cane burning in Araraquara, Brazil, observed that the particulate matter collected in filters may induce alterations in the mechanics and pulmonary histology of the exposed mice, causing an increase in polymorphonuclear (PMN) cells and a reduction in mononuclear (MN) cells in the pulmonary parenchyma compared to the control.

A study carried out by Mariani et al. [49] in São José dos Campos, Brazil showed that micronucleus frequency in *T. pallida* exposed to air pollution was significantly associated to the mortality rate (deaths/10,000 inhabitants) adjusted for cardiovascular diseases (r = 0.841 p = 0.036) and cancer (r = 0.890 p = 0.018) in the general

population. The authors showed that there was a substantial relationship, albeit not significant, between micronucleus indices and mortality from chronic obstructive pulmonary disease (r = 0.640 p = 0.170). These data corroborate the result obtained for the relationship between the standardized rate (hospital morbidity/1000 inhabitants) in children (RD-C) and %MCN (r = 0.721 p = 0.019), showing a strong, statistically significant positive correlation between the two variables.

A factor that could be considered a limitation of this study was the number of vases with *T. pallida* at each point of the active exposure, which limited the number of inflorescences analyzed by point and that may have contributed to the large standard deviation in some stations. Another limitation was the analysis of all Chapter X/ICD-10 for construction of the adjusted morbidity rate in children since not all diseases in this chapter are related to exposure to air pollutants. However, this measure was necessary to minimize failures in the procedures for notification of diseases by the health system observed by Rosa et al. [33] in a study that analyzed the magnitude of the hospital admissions for respiratory diseases in the region. This study observed that the increase in notifications due to pneumonia can be explained by the higher financial remuneration of this type of procedure as compared with hospitalizations for asthma. Another important factor noted by Rosa et al. [33] and that influencing the clinical diagnosis of asthma in the region was the prejudice of the parents in accepting that the child has the disease.

Conclusions

The present work is a pioneer study on the assessment of genotoxic potential caused by biomass burning in the Legal Amazon region, Furthermore, it showed that in situ biomonitoring using a sensitive organism (*Tradescantia pallida* Purpurea) may be an important tool for monitoring air quality in regions that do not contain environmental monitoring stations. Considering that pollution generated by biomass burning is a complex mixture, it is difficult to attribute the increase in %MCN observed in our study to any toxic element integrated in the particular matters. However, the contribution of the present study lies the fact that we found significant relationship between the increase in micronucleus frequency and the increased exposure to fine particulate matter. It was also observed that this rise in micronucleus frequency was significantly correlated with the increase in the standardized rate of respiratory diseases in children, suggesting that research using *Tradescantia pallida* is an important biological indicator to be included in the assessment of human risk to exposure to toxic agents emitted by biomass burning.

List of Abbreviations

DNA: Deoxyribonucleic Acid; PAHs: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; Trad-MCN: Micronucleus Test in *Tradescantia pallida;* $PM_{2.5}$: Fine Particulate Matter; BB: Barra do Bugres, DE: Denise; NO: Nova Olímpia; T: Tangará da Serra; T1: Tangará da Serra - station 1; T2: Tangará da Serra - station 2; CH: Chapada dos Guimarães; %MCN: Mean Micronucleus Frequency; ICD-10: International Statistical Classification of Diseases - 10th Revision; HA: Hospitalization Authorizations; CATT-BRAMS: Coupled Aerosol and Tracer Transport Model of the Brazilian Regional Atmospheric Modeling System; SISAM: System of Environmental Information Integrated to Environmental Health; RD-C: Adjusted Rate of Hospital Morbidity from Respiratory Diseases in Children; PM: Particulate Matter; PMN: Polymorphonuclear; MN: Mononuclear Cells.

Acknowledgements

This study was made possible by a Grant provided by CNPq/INCT/MCT Nº: 573797/2008-CNPq/CT-18, and the logistical support of the Universidade do Estado do Mato Grosso (UNEMAT), the Laboratório de Mutagênese Ambiental (LAMA/UFRN) and the Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH/ENSP/FIOCRUZ). The authors are grateful to Eliane Ignotti, Rivanildo Dallacort, Maurecilne Lemes da Silva Carvalho and Evânia Leite de Oliveira for support in developing this project.

Author details

[1]Escola Nacional de Saúde Pública - ENSP, Fiocruz, Rio de Janeiro, CEP: 21041-210, RJ, Brazil. [2]Departamento de Biologia Celular e Genética, UFRN, Natal, CEP: 59072-970, RN, Brazil. [3]Departamento de Patologia, USP, São Paulo, CEP: 01246-903, SP, Brazil. [4]Departamento de Física Aplicada, USP, São Paulo, CEP: 05508-900, SP, Brazil. [5]Departamento de Patologia, UFF, Niterói, CEP: 24033-900, RJ, Brazil.

Authors' contributions

HAS participated in the study design, conducted the analyses, and drafted the manuscript; SRBM participated in the study design, guided the genotoxicity analyses, and reviewed the manuscript drafts; PHNS guided the *Tradescantia pallida* assay, and reviewed the manuscript drafts; PA was involved in revision and preparation of the manuscript for publication; SSH conceived of the study, participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Received: 13 January 2011 Accepted: 17 May 2011
Published: 17 May 2011

References

1. Artaxo P, Martins JV, Yamasoe MA, Procópio AS, Pauliquevis TM, Andreae MO, Guyon P, Gatti LV, Leal AMC: **Physical and chemical properties of aerosols in the wet and dry seasons in Rondônia, Amazonia.** *J Geophys Res* 2002, **107**:8.081-088.095.
2. Ferreira DAC, Nogueira SP, Carneiro-Filho A, Soares-Filho B: **Mato, grosso até quando?** *Cienc Hoje* 2008, **42**:26-31.
3. Magalhães D, Bruns RE, Vasconcellos PC: **Polycyclic aromatic hydrocarbons as sugarcane burning tracers: a statistical approach.** *Quim Nova* 2007, **30**:577-581.
4. Moraes MAFD: **O mercado de trabalho da agroindústria canavieira: desafios e oportunidades.** *Econ Apl* 2007, **11**:605-619.
5. Rosa AM, Ignotti E, Botelho C, Castro HA, Hacon SS: **Respiratory disease and climatic seasonality in children under 15 years old in a town in the Brazilian Amazon.** *J Pediatr* 2008, **84**:543-549.
6. **Yield of sugarcane.** [http://www.conab.gov.br/conabweb/].
7. **Vegetation fires: fire monitoring.** [http://www.dpi.inpe.br/proarco/bdqueimadas/].
8. Vasconcellos PC, Artaxo PE, Ciccioli P, Cecinato A, Brancaleoni E, Frattoni M: **Chemical composition of aerosol collected in the amazon forest.** *Quim Nova* 1998, **21**:385-393.
9. Arbex MA, Cancado JED, Pereira LAA, Braga ALF, Saldiva PHN: **Biomass burning and health effects.** *J Bras Pneumol* 2004, **30**:158-175.

10. Bernstein JA, Alexis N, Barnes C, Bernstein IL, Bernstein JA, Nel A, Peden D, Diaz-Sanchez D, Tarlo SM, Williams PB: **Health effects of air pollution.** *J Allergy Clin Immunol* 2004, **114**:1116-1123.
11. Freitas SR, Longo KM, Dias MAFS, Dias PLS: **Emissões de queimadas em ecossistemas da América do Sul.** *Estud Av* 2005, **19**:167-185.
12. Hogervorst JG, de Kok TM, Briede JJ, Wesseling G, Kleinjans JC, van Schayck CP: **Relationship between radical generation by urban ambient particulate matter and pulmonary function of school children.** *J Toxicol Environ Health A* 2006, **69**:245-262.
13. Woodruff TJ, Axelrad DA, Kyle AD, Nweke O, Miller GG, Hurley BJ: **Trends in environmentally related childhood illnesses.** *Pediatrics* 2004, **113**:1133-1140.
14. Mascarenhas MDM, Vieira LC, Lanzieri TM, Leal APPR, Duarte AF, Hatch DL: **Anthropogenic air pollution and respiratory disease-related emergency room visits in Rio Branco, Brazil - September, 2005.** *J Bras Pneumol* 2008, **34**:42-46.
15. PAHO: *Assessment of health effects of ambient air pollution in Latin America and the Caribbean* Washington DC: Pan American Health Organization; 2005.
16. Bateson TF, Schwartz J: **Children's response to air pollutants.** *J Toxicol Environ Health A* 2008, **71**:238-243.
17. Nastos PT, Paliatsos AG, Anthracopoulos MB, Roma ES, Priftis KN: **Outdoor particulate matter and childhood asthma admissions in Athens, Greece: a time-series study.** *Environ Health* 2010, **9**:45.
18. Braga AL, Saldiva PH, Pereira LA, Menezes JJ, Conceicao GM, Lin CA, Zanobetti A, Schwartz J, Dockery DW: **Health effects of air pollution exposure on children and adolescents in Sao Paulo, Brazil.** *Pediatr Pulmonol* 2001, **31**:106-113.
19. Farhat SC, Paulo RL, Shimoda TM, Conceicao GM, Lin CA, Braga AL, Warth MP, Saldiva PH: **Effect of air pollution on pediatric respiratory emergency room visits and hospital admissions.** *Braz J Med Biol Res* 2005, **38**:227-235.
20. Cançado JE, Saldiva PH, Pereira LA, Lara LB, Artaxo P, Martinelli LA, Arbex MA, Zanobetti A, Braga AL: **The impact of sugar cane-burning emissions on the respiratory system of children and the elderly.** *Environ Health Perspect* 2006, **114**:725-729.
21. Migliore E, Berti G, Galassi C, Pearce N, Forastiere F, Calabrese R, Armenio L, Biggeri A, Bisanti L, Bugiani M, Cadum E, Chellini E, Dell'orco V, Giannella G, Sestini P, Corbo G, Pistelli R, Viegi G, Ciccone G: **Respiratory symptoms in children living near busy roads and their relationship to vehicular traffic: results of an Italian multicenter study (SIDRIA 2).** *Environ Health* 2009, **8**:27-42.
22. Isidori M, Ferrara M, Lavorgna M, Nardelli A, Parrella A: **In situ monitoring of urban air in Southern Italy with the tradescantia micronucleus bioassay and semipermeable membrane devices (SPMDs).** *Chemosphere* 2003, **52**:121-126.
23. Evans HJ: **Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view.** *Mutat Res* 1997, **392**:5-10.
24. Marcato-Romain C-E, Guiresse M, Cecchi M, Cotelle S, Pinelli E: **New direct contact approach to evaluate soil genotoxicity using the *Vicia faba* micronucleus test.** *Chemosphere* 2009, **77**:345-350.
25. Guimaraes ET, Domingos M, Alves ES, Caldini N, Lobo DJ, Lichtenfels AJ, Saldiva PH: **Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of Sao Paulo (Brazil) with the Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) assay.** *Environ Exp Bot* 2000, **44**:1-8.
26. Lindberg HK, Wang X, Järventaus H, Falck GCM, Norppa H, Fenech M: **Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes.** *Mutat Res* 2007, **617**:33-45.
27. Souza Lima E, Souza SR, Domingos M: **Sensitivity of Tradescantia pallida (Rose) Hunt. 'Purpurea' Boom to genotoxicity induced by ozone.** *Mutat Res* 2009, **675**:41-45.
28. Alves ES, de Souza SR, Pedroso ANV, Domingos M: **Potential of the Trad-MCN assay applied with inflorescences of *Tradescantia pallida* 'Purpurea' for evaluating air contamination by naphthalene.** *Ecotoxicol Environ Saf* 2008, **71**:717-721.
29. Carvalho-Oliveira R, Pozo RM, Lobo DJ, Lichtenfels AJ, Martins-Junior HA, Bustilho JO, Saiki M, Sato IM, Saldiva PH: **Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in Sao Paulo, Brazil.** *Environ Res* 2005, **98**:1-7.
30. Ignotti E, Hacon SS, Silva AMC, Junger WL, CASTRO HA: **Effects of biomass burning in Amazon: method to select municipalities using health indicators.** *Rev Bras Epidemiol* 2007, **10**:453-464.
31. **Brazilian institute of geography and statistics - Cidades@.** [http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1].
32. Silva Dias MAF, Cohen JCP, Gandú AW: **Clouds, rain and biosphere interactions in Amazon.** *Acta Amazon* 2005, **35**:215-222.
33. Rosa AM, Ignotti E, Hacon SS, Castro HA: **Analysis of hospitalizations for respiratory diseases in Tangará da Serra, Brazil.** *J Bras Pneumol* 2008, **34**:575-582.
34. **Sugarcane crop mapping in Brazil by Earth observing satellite images.** [http://www.dsr.inpe.br/mapdsr/].
35. Meireles J, Rocha R, Neto AC, Cerqueira E: **Genotoxic effects of vehicle traffic pollution as evaluated by micronuclei test in tradescantia (Trad-MCN).** *Mutat Res* 2009, **675**:46-50.
36. Sisenando HA, Batistuzzo de Medeiros SR, Hacon SS: ***Tradescantia pallida*: mais do que uma linda flor, um importante bioindicador da qualidade ambiental.** *Genetic na Escola* 2009, **04**:9-13.
37. Ma TH, Cabrera GL, Chen R, Gill BS, Sandhu SS, Vandenberg AL, Salamone MF: **Tradescantia micronucleus bioassay.** *Mutat Res* 1994, **310**:221-230.
38. Fenech M: **The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations.** *Mutat Res* 1993, **285**:35-44.
39. Decordier I, De Bont K, De Bock K, Mateuca R, Roelants M, Ciardelli R, Haumont D, Knudsen LE, Kirsch-Volders M: **Genetic susceptibility of newborn daughters to oxidative stress.** *Toxicol Lett* 2007, **172**:68-84.
40. Neri M, Fucic A, Knudsen LE, Lando C, Merlo F, Bonassi S: **Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review.** *Mutat Res* 2003, **544**:243-254.
41. Freitas SR, Silva Dias MAF, Silva Dias PL, Longo KM, Artaxo P, Andreae MO, Fischer H: **A convective kinematic trajectory technique for low-resolution atmospheric models.** *J Geophys Res* 2000, **105**:375-386.
42. Freitas SR, Longo KM, Silva Dias MAF, Chatfield R, Silva Dias P, Artaxo P, Andreae MO, Grell G, Rodrigues LF, Fazenda A, Panetta J: **The Coupled Aerosol and Tracer Transport model to the Brazilian developments on the Regional Atmospheric Modeling System (CATT-BRAMS). Part 1: Model description and evaluation.** *Atmos Chem Phys* 2009, **9**:2843-2861.
43. Carreras HA, Pignata ML, Saldiva PHN: **In situ monitoring of urban air in Córdoba, Argentina using the Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) bioassay.** *Atmos Environ* 2006, **40**:7824-7830.
44. Klumpp A, Ansel W, Fomin A, Schnirring S, Pickl C: **Influence of climatic conditions on the mutations in pollen mother cells of Tradescantia clone 4430 and implications for the Trad-MCN bioassay protocol.** *Hereditas* 2004, **141**:142-148.
45. Savóia EJ, Domingos M, Guimaraes ET, Brumati F, Saldiva PHN: **Biomonitoring genotoxic risks under the urban weather conditions and polluted atmosphere in Santo Andre, SP, Brazil, through Trad-MCN bioassay.** *Ecotoxicol Environ Saf* 2009, **72**:255-260.
46. Batalha JRF, Guimarães ET, Lobo DJA, Lichtenfels AJFC, Deur T, Carvalho HA, Alves ES, Domingos M, Rodrigues GS, Saldiva PHN: **Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the Tradescantia micronuclei assay.** *Mutat Res* 1999, **426**:229-232.
47. Prajapati SK, Tripathi BD: **Assessing the genotoxicity of urban air pollutants in Varanasi City using Tradescantia micronucleus (Trad-MCN) bioassay.** *Environ Int* 2008, **34**:1092-1096.
48. Andrade Júnior SJ, Santos Júnior JCS, Oliveira JL, Cerqueira EMM, Meireles JRC: **Micronuclei in tetrads of *Tradescantia pallida* (Rose) Hunt. cv. purpurea Boom: genetic changes caused by urban air pollution.** *Acta Sci Biol Sci* 2008, **30**:295-301.
49. Mariani RL, Martins Jorge MP, Pereira SS, Melione LP, Carvalho-Oliveira R, Ma TH, Saldiva PHN: **Association between micronuclei frequency in pollen mother cells of Tradescantia and mortality due to cancer and cardiovascular diseases: A preliminary study in Sao Jose dos Campos, Brazil.** *Environ Pollut* 2009, **157**:1767-1770.
50. Ferreira MI, Rodrigues GS, Domingos M, Saldiva PHN: **In situ monitoring of mutagenicity of air pollutants in São Paulo City using Tradescantia-SHM bioassay.** *Braz Arch Biol Technol* 2003, **46**:253-258.
51. Alves ES, Giusti PM, Domingos M, Saldiva PHN, Guimarães ET, Lobo DJ: **Anatomic studies on Tradescantia hibrid clone 4430 leaves: changes caused by urban air pollution.** *Rev Bras Bot* 2001, **24**:597-576.
52. WHO: *Air Quality Guidelines: Global Update 2005. Particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide* Copenhagen: WHO Regional Office for Europe; 2005.

53. Annesi-Maesano I, Moreau D, Caillaud D, Lavaud F, Le Moullec Y, Taytard A, Pauli G, Charpin D: **Residential proximity fine particles related to allergic sensitisation and asthma in primary school children.** *Respir Med* 2007, **101**:1721-1729.
54. Braga AL, Pereira LA, Procopio M, Andre PA, Saldiva PHN: **Association between air pollution and respiratory and cardiovascular diseases in Itabira, Minas Gerais State, Brazil.** *Cad Saude Publica* 2007, **23**(Suppl 4): S570-S578.
55. Casas SB, Peña-Cortés F, Bustingorry SO: **Effect for particles material atmospheric pollution on acute respiratory diseases in under 5 years of age.** *Cienc enferm* 2004, **10**:21-29.
56. Rojas-Martinez R, Perez-Padilla R, Olaiz-Fernandez G, Mendoza-Alvarado L, Moreno-Macias H, Fortoul T, McDonnell W, Loomis D, Romieu I: **Lung function growth in children with long-term exposure to air pollutants in Mexico City.** *Am J Respir Crit Care Med* 2007, **176**:377-384.
57. Kajekar R: **Environmental factors and developmental outcomes in the lung.** *Pharmacol Ther* 2007, **114**:129-145.
58. Mazzoli-Rocha F, Magalhaes CB, Malm O, Saldiva PHN, Zin WA, Faffe DS: **Comparative respiratory toxicity of particles produced by traffic and sugar cane burning.** *Environ Res* 2008, **108**:35-41.

doi:10.1186/1476-069X-10-41
Cite this article as: Sisenando *et al.*: Genotoxic potential generated by biomass burning in the Brazilian Legal Amazon by Tradescantia micronucleus bioassay: a toxicity assessment study. *Environmental Health* 2011 **10**:41.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

Micronucleus frequency in children exposed to biomass burning in the Brazilian Legal Amazon region: a case control study.

Herbert Ary Sisenando[1,5]*, Silvia Regina Batistuzzo de Medeiros[2], Paulo Artaxo[3], Paulo H N Saldiva[4], Sandra de Souza Hacon[1]

[1]Escola Nacional de Saúde Pública - ENSP, Fiocruz, Rio de Janeiro, CEP: 21041-210, RJ, Brazil

[2]Departamento de Biologia Celular e Genética, UFRN, Natal, CEP: 59072-970, RN, Brazil

[3]Departamento de Física Aplicada, USP, São Paulo, CEP: 05508-900, SP, Brazil

[4]Departamento de Patologia, USP, São Paulo, CEP: 01246-903, SP, Brazil

[5]Departamento de Patologia, UFF, Niterói, CEP: 24033-900, RJ, Brazil

* Corresponding author

E-mail addresses:

HAS: herbertsisenando@yahoo.com.br

SRBM: sbatistu@cb.ufrn.br

PA: artaxo@if.usp.br

PHNS: pepino@usp.br

SSH: sandrahacon@gmail.com

Abstract:

Background: The Amazon represents an area of 61% of Brazilian territory and suffers great changes resulting from the economic development cluttered, especially with the advance of agribusiness. The composition of the atmosphere is controlled by several natural and anthropogenic processes, and emission from biomass burning is one with the great impact on human health. The aim of this study was to evaluate the genotoxic potential of the air pollutants generated by burning biomass by micronucleus assay in exfoliated buccal cells of schoolchildren in the Brazilian Amazon region.

Methods: The study was conducted during the dry seasons in two regions of the Brazilian Amazon. The assay was carried out on the buccal epithelial cells of 574 schoolchildren of 6-16 years old.

Results: The results show a significant difference between the micronucleus frequencies obtained in children exposed to biomass burning compared with those in a control area.

Conclusions: The present study showed that in situ biomonitoring using a sensitive and low cost assay (buccal micronucleus assay) may be an important tool for monitoring air quality in the remote regions. It is difficult to attribute the increase in micronuclei frequency observed in our study to any specific toxic element integrated in the particular matters. However, the contribution of the present study lies in the evidence that the increase of exposure to fine particulate matter generates an increased the micronuclei frequency in oral epithelial cells from schoolchildren.

Background:

The Amazon extends from the Atlantic Ocean to the eastern slopes of the Andes, with 61% of the area belonging to the Brazilian territory, where it is called the Brazilian Amazon. The region has been environmentally affected by advancing economic development, especially agribusiness and livestock. This has provoked changes in soil pattern use, resulting in increased deforestation and an increase in biomass burning in both native forest and pasture areas [1, 2]. Several studies show that pasture is the main land use in the newly deforested regions [3]. Sugar cane is an example of agribusiness that is in full expansion in the Amazon biome, driven by the political incentive to produce and consume biofuel both nationally and internationally. Brazil is one of the largest producers of biofuel worldwide, with most production concentrated in the Midwest region. Sugar cane straw burning at harvest time is widely used in Brazilian production to facilitate harvesting and increase the yield of manual cutting; however, this archaic procedure results in increased pollutant concentration in the atmosphere [4-7].

The biomass burning is a process of combustion of organic matter that is characterized by a multielemental composition and size distribution [8, 9], that represent a combined exposure to several pollutants and health effect associated with simultaneous exposure. The PM has the ability to adsorb many mutagenic compounds present in the environment and transport through the respiratory tree until the alveolar capillary basement membrane [10]. Fine and ultra fine particles are specially toxic to cells [11]. The presence of a complex mixture of air pollutants may have the ability at high concentrations or after long exposure, to induce genotoxic damage in human cells [12]. The main genotoxic damage generated by exposure to pollutants from the burning are the character of oxidative damage (e.g.: 8-oxodG) and the formation of DNA adducts, that if not repaired this damage can generates a mutation in the DNA [13-15].

Among the bioassays used to evaluate the impact of environmental, genetic and life-style factors on genomic stability in humans, the micronucleus assay (MN-assay) has been highlighted for its easy implementation, and by requiring lower capital investment associated with a precision obtained by scoring of larger numbers of cells [16]. The use of oral epithelial cells as bioindicator of genotoxic damage arising from exposure to environmental carcinogens via inhalation and digestive tract can be

105 explained by the ability of cells to metabolize carcinogens and for being the first
106 physical barrier of these tracts, resulting in greater incidence of human cancers in
107 epithelial cells [17]. Micronuclei (MN) are structures resulting from whole
108 chromosomes or chromosomal fragments that lag behind at anaphase during nuclear
109 division, allowing us to detect the action of clastogenic and aneugenic agents [17-19].
110 In terms of harm to human health associated with exposure to biomass burning
111 pollutants, it is known that children are more susceptible to the effects of exposure to air
112 pollution, especially respiratory diseases [20-23]. A study conducted by Huen et al. [24]
113 in children and adults through the oral micronucleus assay suggested greater
114 vulnerability to traffic-related air pollution in children. This sensitivity of children to air
115 pollution which can be explained for higher level of physical activity and spend more
116 time outside and therefore they are more exposed to outdoor air pollution [25], as well
117 so the immaturity of the lung and the immune system [26]. Biomonitoring studies in
118 children are affected to a lower extend by confounders like cigarette smoking and
119 alcoholic drinking habits, occupational exposure and life-style (e.g.: diet type), which
120 are factors of great concern in adults [16]. The relationship between exposure to air
121 pollutants and the formation of micronuclei in buccal cells of children was described by
122 Huen et al. [24] in United State of America, Iurchenko et al. [27] and Maimulov et al.
123 [28] in Russia, Sycheva et al. [29] in Vietnam and Lahiri et al. [30] in India.
124 The aim of this study was to assess the genotoxicity potential of biomass burning
125 pollutants by micronucleus assay in exfoliated buccal cells of schoolchildren in the
126 Brazilian Amazon region.
127
128 **Methods:**
129 **Site of study**
130 The study was conducted in two test areas (Tangará da Serra (TS) and Porto Velho
131 (PV)) and one control area (Chapada dos Guimarães (CH)). Tangará da Serra (TS) has a
132 population of 83,431 inhabitants distributed over an area of 11,391.314 km^2, located in
133 a transition area between the Amazon biome and the Cerrado and has the characteristics
134 of urban area in Amazon region; the region has the largest production of sugar cane and
135 contains the two largest factories in the southern Brazilian Amazon [31-33], even being
136 the urban area. Porto Velho (PV) has a population of 428,527 inhabitants distributed
137 over an area of 34,096.429 km^2, located in a rural district in the margin for Madeira

138 river a area of the Amazon biome; a population with characteristics typical of the
139 Amazonian riverines. [33]. The two test areas are inserted in a region with typical cycles
140 of drought and rain that alter air pollution levels, and lies in the dispersion path of the
141 pollution plume resulting from burnings in the Legal Amazon and pollution emanating
142 from neighboring countries, thus impacting on the respiratory health of the population
143 exposed, especially on morbidity in schoolchildren [6, 34, 35].

144 Chapada dos Guimarães (CH) has a population of 17,821 inhabitants distributed
145 over an area of 5,983.595 km^2, was selected as the control area due its better air quality.
146 There is no industrial production or sugar cane burning and automobile traffic is light,
147 compared to the other municipalities involved. It was also chosen for the similarities in
148 meteorological variables (rainfall, temperature and humidity) compared to other
149 municipalities involved in this study [6, 32, 33].

150 The latitude and longitude coordinates of all points collected in the study areas are
151 shown in Figure 1.

152 **Micronucleus assay in exfoliated buccal cells**

153 The MN-assay was carried out on the buccal epithelial cells of 574 children of 6-
154 16 years old (446 children directly exposed to burning of biomass and 128 children
155 living in control area). Buccal cell samples were collected during the burning season
156 (dry season) in the region, which occurs between the months from May to October. The
157 samples of TS and CH were collected in August 2008, and the samples of PV were
158 collected in August 2009. The samples were obtained by rubbing the inside of the
159 checks of study subjects with a cytobrush. The cells were collected in a sample bottles
160 containing 5 mL, of buffer solution (0.1M EDTA, 0.01 Tris–HCl and 0.02M NaCl, pH
161 7) and transported to the laboratory. The samples were processed according to the
162 protocol described by Heuser et al. [36], and the slides were evaluated according to
163 criteria established by Tolbert et al. [37]. A total of 2,000 cells/child were analyzed
164 using an optical microscopy at a magnification of 1000 X.

165 In order to reduce confounding factors, the study excluded smokers, alcoholics,
166 patients or individuals with some genetic malformations. The influence of economic
167 power as a confounding factor was assessed with the collection of buccal cells in public
168 and private schools when possible. Other factors such as age and gender were also
169 evaluated.

170 The study was approved by the Ethics Committee of the National School of
171 Public Health (ENSP) / Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) under number 038/2008.

All participants were informed about the purpose of study and signed a document of participation.

Environmental data collection

The daily means of fine particulate matter ($PM_{2.5}$) and of meteorological variables (humidity and temperature) in the region under the direct influence of burnings and in the control area, during the dry season, were obtained from CATT-BRAMS (Coupled Aerosol and Tracer Transport model of the Brazilian Regional Atmospheric Modeling System) accessed through of System of Environmental Information Integrated to Environmental Health (http://sisam.cptec.inpe.br/msaude/). A more detailed description of this model was presented by Freitas et al. [38].

Statistical analysis

The data of the micronuclei frequency (MN‰) were evaluated by analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's comparison test. The data of $PM_{2.5}$ were evaluated by Mann-Whitney's test. The significance was determined when compared with the data obtained in control area. All data were analyzed using the SPSS 16.0.

Results

Figure 1 shows the Legal Amazon region and the municipalities involved in this study, in addition to the georeferencing of all the points sampled in the oral micronucleus assay.

Table 1 shows the mean concentration of the environmental ($PM_{2.5}$) and meteorological (temperature and humidity) variables modeled by CATT-BRAMS in all the municipalities studied. In relation to meteorological variables, we observe that the profiles of temperature and humidity were very similar in the areas evaluated. The point PV showed higher humidity content (68 and 72%) in both periods modeled (2008 and 2009) compared to the other points (CH and TS). With regard to the environmental variable, we found that $PM_{2.5}$ showed a profile in which the modeled concentrations in the test areas were significantly higher (TS= 21 and 22 $\mu g/m^3$; PV=19 and 16 $\mu g/m^3$) than those found in the control area (10 and 12 $\mu g/m^3$), in both periods.

The results presented by Table 2 show a statistically significant difference between MN‰ obtained in the test areas (TS= 1.43 ± 0.84 and PV= 1.13 ± 0.63)

compared with the control area (CH= 0.29 ± 0.41). The results of TS and PV showed an accumulation of micronucleus frequency of 4.9 and 3.8 times higher than that observed in the control area, respectively. The study also assessed the influence of other parameters such as school type, gender and age (years) on the MN‰. The results show that the micronuclei frequency obtained in schoolchildren exposed to the biomass burning was significantly higher (TS= Private school: 1.30 ± 0.4 and Public school: 1.46 ± 0.9; PV= Public school: 1.13 ± 0.63) than that observed in the control area (CH= Private school: 0.27 ± 0.36 and Public school: 0.3 ± 0.44). Regarding the school type, the results showed no significant difference ($p>0.05$) between the results of public school in relation to private school. When compared the MN‰ obtained in public schools in TS and PV is possible to observe that the micronucleus frequency of the students of TS (1.46 ± 0.9) was slightly higher than in PV (1.13 ± 0.63), however was not significant. Regarding gender, no significant difference between the MN‰ of male students than female in all areas studied. At the age parameter, no difference was observed when comparing age within each site. In general, significant differences were observed when comparing the data obtained in sites TS and PV compared to CH in all parameters, except between the MN‰ in children under 07 years old of PV that was not significant in comparison the control ($p>0.05$).

Discussion

Among the few studies assessing the genetic damage in schoolchildren exposed to air pollution, none has assessed the damage generated by exposure to pollutants obtained by biomass burning in the Amazon region.

A study conducted by Sisenando et al. [6] in the same region of the Legal Amazon showed a delimitation of two well-defined climatic periods (dry and rainy). This fact influences the concentration and dispersion of pollutants, given that the pollution generated by biomass burning in the Amazon reaches its peak during the dry season (May-October). The results of $PM_{2.5}$ modeled in the study region show that TS and PV areas showed of particulate matter values much higher than the control area, this fact justifies the choice of CH as control in this study and corroborates with the toxicity evaluation study of Sisenando et al. [6] that also chose this same area as a control. With respect to meteorological variables, the results presented show no significant difference between the mean temperatures modeled among the areas. The higher humidity in Porto

Velho in comparison to other points is justified by the fact the area is part of Amazon biome and consequently suffers greater influence of humidity emanating from the Amazon forest [39, 40].

The baseline MN frequency obtained in CH (control area) is in agreement with values observed by Holland et al. [17] in the review article of the Human Micronucleus Project on Exfoliated Buccal Cells ($HUMN_{XL}$) in relation the baseline observed to the articles that evaluated environmental pollutants. The comparison between the exposed and not exposed areas to pollution showed that children exposed to pollution have a higher frequency of micronuclei. These results corroborate the studies by Maimulov et al. [28] in Russia, Lahiri et al. [30] India, Huen et al. [24] and Chen et al. [41] in the United States that evaluated the influence of air pollution in the formation of micronuclei in children. The highest MN‰ observed in TS in relation to PV although not significant confirms the results of modeled particulate material on that TS was the area most exposed in both periods analyzed. This difference in concentration of particulate matter observed in TS may be associated with the burning of sugar cane in the area. Sisenando et al. [6] and Alves et al. [9] showed the ability genotoxic of pollutants generated by burning sugar cane in the region of TS using the bioindicator *Tradescantia pallida* in a *in situ* and *ex situ* experiments. Alves et al. [9] also detected the presence of PAHs with high mutagenic potential (e.g.: benzo[e]pyrene) and n-alkanes in the material sampled through Teflon filters in the troposphere of Tangará da Serra during the dry season.

In Brazil, the consumption of vegetables, fruit and animal protein is associated cultural values, and the consumption of vitamin supplementation is expensive and restricted to individuals with greater financial strength. Bonassi et al. [42] in a review article of the $HUMN_{XL}$ project shows that factors related to lifestyle and diet may influence the frequency of micronuclei. In this study, the factor of alcohol and tobacco consumption was minimized at the time of collection and the cultural factor was minimized with choice of areas (test and control) with similar cultural values. Although in the study region there is a clear economic difference between users of the public and private schools, this fact did not provide significant difference between the two groups.

More recent publication $HUMN_{XL}$ project showed that people who eat fish regularly have a lower baseline MN frequency compared to non-consumers of fish [42]. When comparing household per capita consumption of fish between the two test areas, we found that fish consumption in PV was 2.31 times higher than in TS [43]. This may

help to explain the low frequency of micronuclei observed in the PV. Regarding gender, the results no showed significant difference between males and females. This result corroborate with the review articles of Neri et al. [16] and Bonassi et al. [42] and not corroborated with the study of Maimulov et al. [28] which showed that female children were more sensitive to environmental pollution in St. Petersburg. In relation to age, the results showed a slight increase no significant in the MN frequency in all areas. This observation is in accordance with Bonassi et al. [42] which showed that the frequency of micronuclei has constant increases with age. In general, significant differences were observed when comparing the data obtained in sites TS and PV compared to CH in all parameters, except between the MN‰ in children under 07 years old of PV that was not significant in comparison the control ($p>0.05$). This fact can be explained by the small sample size in this age group.

A fact that could be considered a limitation of this study was the small number of children who participate in the study in the public school of Chapada dos Guimarães and the inability to conduct the study in the private school of Porto Velho. However, this study is marked by the pioneering character in the assessment of genotoxicity in an area of difficult access and poor in environmental monitoring stations.

Conclusions

In conclusion, the present study showed that in situ biomonitoring using a sensitive and low cost assay (buccal MN-assay) may be an important tool for monitoring air quality in the remote regions or which is not possible to have an air quality monitoring station. Considering that pollution generated by biomass burning is a complex mixture, it is difficult to attribute the increase in MN‰ observed in our study to any specific toxic element integrated in the particular matters. However, the contribution of the present study lies the fact that we found significant evidence that increased of exposure to $PM_{2.5}$ generates an increased the micronuclei frequency in oral epithelial cells from schoolchildren.

List of abbreviations used

PM: Particulate Matter; PAHs: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; DNA: Deoxyribonucleic Acid; MCN-assay: Micronucleus Assay; MN: Micronuclei; TS: Tangará da Serra; PV: Porto Velho; CH: Chapada dos Guimarães; $PM_{2.5}$: Fine

Particulate Matter; CATT-BRAMS: Coupled Aerosol and Tracer Transport Model of the Brazilian Regional Atmospheric Modeling System; SISAM: System of Environmental Information Integrated to Environmental Health; SPSS: Statistical Package for the Social Sciences; ANOVA: Analysis of Variance; MN‰: Mean Micronucleus Frequency; $HUMN_{XL}$: Human Micronucleus Project on Exfoliated Buccal Cells; buccal MCN-assay: Buccal Micronucleus Assay.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

HAS participated in the study design, conducted the analyses, and drafted the manuscript; SRBM participated in the study design, guided the genotoxicity analyses, and reviewed the manuscript drafts; PA was involved in revision and preparation of the manuscript for publication; PHNS was involved in revision and preparation of the manuscript for publication; SSH conceived of the study, participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

[1]Escola Nacional de Saúde Pública, Fiocruz, 21041-210, Rio de Janeiro, Brazil. [2]Departamento de Biologia Celular e Genética, UFRN, 59072-970, Natal, Brazil. [3]Departamento de Física Aplicada, USP, 05508-900, São Paulo, Brazil. [4]Departamento de Patologia, USP, São Paulo, CEP: 01246-903, SP, Brazil. [5]Departamento de Patologia, UFF, 24033-900, Niterói, Brazil.

Acknowledgements

This work had financial support from Fiocruz and MCT-CNPq/CT-18, but also the logistical support of the UNEMAT and CESTEH/Fiocruz. The authors are grateful to researchers Eliane Ignotti, Maurecilne L. S. Carvalho, Ilio F. Carvalho and Dionei J. Silva; as well as the pupils Adrielle S. de Cruz, Suzan L. S. Perreira, Viviane L. Hunhoff and Ruth Ferreira for support in developing this project. The authors are

grateful for the logistical support from trainees and the Prof. Dr. Rivanildo Dallacort of the UNEMAT.

Reference

1. Ferreira DAC, Nogueira SP, Carneiro-Filho A, Soares-Filho B: **Mato, grosso até quando?** *Cienc Hoje* 2008, **42**:26-31.
2. Artaxo P, Martins JV, Yamasoe MA, Procópio AS, Pauliquevis TM, Andreae MO, Guyon P, Gatti LV, Leal AMC: **Physical and chemical properties of aerosols in the wet and dry seasons in Rondônia, Amazonia**. *J Geophys Res* 2002, **107**:8.081-088.095.
3. Cederberg C, Persson UM, Neovius K, Molander S, Clift R: **Including carbon emissions from deforestation in the carbon footprint of Brazilian beef**. *Environ Sci Technol* 2011, **45**(5):1773-1779.
4. Magalhães D, Bruns RE, Vasconcellos PC: **Polycyclic aromatic hydrocarbons as sugarcane burning tracers: a statistical approach**. *Quim Nova* 2007, **30**:577-581.
5. Moraes MAFD: **O mercado de trabalho da agroindústria canavieira: desafios e oportunidades**. *Econ Apl* 2007, **11**(4):605-619.
6. Sisenando HA, Batistuzzo de Medeiros SR, Saldiva PH, Artaxo P, Hacon SS: **Genotoxic potential generated by biomass burning in the Brazilian Legal Amazon by Tradescantia micronucleus bioassay: a toxicity assessment study**. *Environ Health* 2011, **10**:41.
7. **Yield of sugarcane** [http://www.conab.gov.br/conabweb/]
8. Hacon S, Artaxo P, Gerab F, Yamasoe MA, Campos RC, Conti LF, De Lacerda LD: **Atmospheric mercury and trace elements in the region of Alta Floresta in the Amazon Basin**. *Water, Air, & Soil Pollution* 1995, **80**(1):273-283.
9. Alves NO, Matos Loureiro AL, Dos Santos FC, Nascimento KH, Dallacort R, Castro Vasconcellos P, Hacon SS, Artaxo P, Batistuzzo de Medeiros SR: **Genotoxicity and composition of particulate matter from biomass burning in the eastern Brazilian Amazon region**. *Ecotoxicol Environ Saf* 2011, **74**(5):1427-1433.
10. Erdinger L, Durr M, Hopker KA: **Correlations between mutagenic activity of organic extracts of airborne particulate matter, NOx and sulphur dioxide in southern Germany: results of a two-year study**. *Environ Sci Pollut Res Int* 2005, **12**(1):10-20.
11. Grigg J, Kulkarni N, Pierse N, Rushton L, O'Callaghan C, Rutman A: **Black-pigmented material in airway macrophages from healthy children: association with lung function and modeled PM10**. *Res Rep Health Eff Inst* 2008(134):1-23; discussion 25-33.
12. Isidori M, Ferrara M, Lavorgna M, Nardelli A, Parrella A: **In situ monitoring of urban air in Southern Italy with the tradescantia micronucleus bioassay and semipermeable membrane devices (SPMDs)**. *Chemosphere* 2003, **52**(1):121-126.
13. Iarmarcovai G, Bonassi S, Botta A, Baan RA, Orsiere T: **Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature**. *Mutat Res* 2008, **658**(3):215-233.

14. Abbas I, Garcon G, Saint-Georges F, Andre V, Gosset P, Billet S, Goff JL, Verdin A, Mulliez P, Sichel F *et al*: **Polycyclic aromatic hydrocarbons within airborne particulate matter (PM(2.5)) produced DNA bulky stable adducts in a human lung cell coculture model**. *J Appl Toxicol* 2011.
15. Bornholdt J, Dybdahl M, Vogel U, Hansen M, Loft S, Wallin H: **Inhalation of ozone induces DNA strand breaks and inflammation in mice**. *Mutat Res* 2002, **520**(1-2):63-71.
16. Neri M, Fucic A, Knudsen LE, Lando C, Merlo F, Bonassi S: **Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review**. *Mutat Res* 2003, **544**(2-3):243-254.
17. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller S, Fenech M: **The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps**. *Mutat Res* 2008, **659**(1-2):93-108.
18. Lindberg HK, Wang X, Järventaus H, Falck GCM, Norppa H, Fenech M: **Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes**. *Mutat Res* 2007, **617**(1-2):33-45.
19. Fenech M, Holland N, Knasmueller S, Burgaz S, Bonassi S: **Report on the buccal micronucleus assay workshop organized by the International Human Micronucleus (HUMN) project--Antalya, Turkey 2007**. *Mutagenesis* 2009, **24**(2):199-201.
20. Woodruff TJ, Axelrad DA, Kyle AD, Nweke O, Miller GG, Hurley BJ: **Trends in environmentally related childhood illnesses**. *Pediatrics* 2004, **113**(4 Suppl):1133-1140.
21. PAHO: *Assessment of health effects of ambient air pollution in Latin America and the Caribbean*. Washington DC: Pan American Health Organization; 2005.
22. Bateson TF, Schwartz J: **Children's response to air pollutants**. *J Toxicol Environ Health A* 2008, **71**(3):238-243.
23. Nastos PT, Paliatsos AG, Anthracopoulos MB, Roma ES, Priftis KN: **Outdoor particulate matter and childhood asthma admissions in Athens, Greece: a time-series study**. *Environ Health* 2010, **9**:45.
24. Huen K, Gunn L, Duramad P, Jeng M, Scalf R, Holland N: **Application of a geographic information system to explore associations between air pollution and micronucleus frequencies in African American children and adults**. *Environ Mol Mutagen* 2006, **47**(4):236-246.
25. Pedersen M, Vinzents P, Petersen JH, Kleinjans JC, Plas G, Kirsch-Volders M, Dostal M, Rossner P, Beskid O, Sram RJ *et al*: **Cytogenetic effects in children and mothers exposed to air pollution assessed by the frequency of micronuclei and fluorescence in situ hybridization (FISH): a family pilot study in the Czech Republic**. *Mutat Res* 2006, **608**(2):112-120.
26. van Leeuwen DM, Pedersen M, Hendriksen PJ, Boorsma A, van Herwijnen MH, Gottschalk RW, Kirsch-Volders M, Knudsen LE, Sram RJ, Bajak E *et al*: **Genomic analysis suggests higher susceptibility of children to air pollution**. *Carcinogenesis* 2008, **29**(5):977-983.
27. Iurchenko VV, Krivtsova EK, Podol'naia MA, Beliaeva MA, Malysheva AG, Dmitrieva RA, Doskina TV, Ivanova LV: **Buccal epithelial micronuclear test in the comprehensive assessment of children's ecological well-being in Moscow**. *Gig Sanit* 2007(6):83-86.

28. Maimulov VG, Kitaeva LV, Vereshchagina TV, Mikheeva EA, Shelomova LF: **Cytogenetic aberrations in somatic cells of children living in areas with various levels of environmental pollution**. *Tsitologiia* 1998, **40**(7):686-689.
29. Sycheva LP, Mozhaeva TE, Umnova NV, Zhuchenko NA, Diep VH, Tuyet HA: **Cytogenetic and other cariological parameters of exfoliative buccal cells in Vietnamese children from areas where dioxin-containing herbicides were applied**. *Vestn Ross Akad Med Nauk* 2008(1):19-23.
30. Lahiri T, Roy S, Basu C, Ganguly S, Ray MR, Lahiri P: **Air pollution in Calcutta elicits adverse pulmonary reaction in children**. *Indian J Med Res* 2000, **112**:21-26.
31. Silva Dias MAF, Cohen JCP, Gandú AW: **Clouds, rain and biosphere interactions in Amazon** *Acta Amazon* 2005, **35**:215-222.
32. **Sugarcane crop mapping in Brazil by Earth observing satellite images.** [http://www.dsr.inpe.br/mapdsr/]
33. **Brazilian institute of geography and statistics - Cidades@** [http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1]
34. Rosa AM, Ignotti E, Hacon SS, Castro HA: **Analysis of hospitalizations for respiratory diseases in Tangará da Serra, Brazil**. *J Bras Pneumol* 2008, **34**:575-582.
35. Castro HA, Gonçalves KS, Hacon SS: **Trend of mortality from respiratory disease in elderly and the forest fires in the state of Rondônia/Brazil - period between 1998 and 2005**. *Ciênc Saúde Coletiva* 2009, **14**(6):2083-2090.
36. Heuser VD, Erdtmann B, Kvitko K, Rohr P, da Silva J: **Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility**. *Toxicology* 2007, **232**(3):235-247.
37. Tolbert PE, Shy CM, Allen JW: **Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development**. *Mutat Res* 1992, **271**(1):69-77.
38. Freitas SR, Longo KM, Silva Dias MAF, Chatfield R, Silva Dias P, Artaxo P, Andreae MO, Grell G, Rodrigues LF, Fazenda A *et al*: **The Coupled Aerosol and Tracer Transport model to the Brazilian developments on the Regional Atmospheric Modeling System (CATT-BRAMS). Part 1: Model description and evaluation**. *Atmos Chem Phys* 2009, **9**:2843-2861.
39. **Environmental Information System** [http://pussua.cptec.inpe.br/msaude/]
40. Ansari AS: **Influence of forests on environment**. In *XII World Forestry Congress*. Quebec city / Canada: FAO; 2003.
41. Chen C, Arjomandi M, Qin H, Balmes J, Tager I, Holland N: **Cytogenetic damage in buccal epithelia and peripheral lymphocytes of young healthy individuals exposed to ozone**. *Mutagenesis* 2006, **21**(2):131-137.
42. Bonassi S, Coskun E, Ceppi M, Lando C, Bolognesi C, Burgaz S, Holland N, Kirsh-Volders M, Knasmueller S, Zeiger E *et al*: **The HUman MicroNucleus project on eXfoLiated buccal cells (HUMN(XL)): The role of life-style, host factors, occupational exposures, health status, and assay protocol**. *Mutat Res* 2011.
43. **Brazilian institute of geography and statistics - Estados@** [http://www.ibge.gov.br/estadosat/]

Fig. 1. Geographical location of sites of study, delimiting the region of the Brazilian Amazon.

Table 1

Distribution of environmental and meteorological data of the study sites in the years 2008 and 2009.

Environmental data	Temperature (°C)		Humidity (%)		$PM_{2.5}$ ($\mu g/m^3$)	
	2008	2009	2008	2009	2008	2009
Chapada dos Guimarães (CH)	26	25	51	62	10	12
Tangará da Serra (TS)	25	24	57	68	21 ##	22##
Porto Velho (PV)	28	27	68	72	19 ##	16##

Data obtained in the dry season (May-October). ##$p<0.01$ by Mann-Whitney test.

562 **Table 2**

563 Micronucleus frequency of exfoliated buccal cells in children.

564

Micronucleus Frequency (MN‰)	Chapada dos Guimarães (CH)			Tangará da Serra (TS)			Porto Velho (PV)		
	N	Mean	SD	N	Mean	SD	N	Mean	SD
By site	128	0.29	± 0.41	245	1.43 **	± 0.84	201	1.13 **	± 0.63
Others parameters:									
Type of school									
Private school	57	0.27	± 0.36	42	1.30 **	± 0.40	-	-	-
Public school	71	0.30	± 0.44	203	1.46 **	± 0.90	201	1.13 **	± 0.63
Gender									
Male	54	0.27	± 0.36	110	1.50 **	± 0.82	108	1.08 **	± 0.61
Female	74	0.30	± 0.44	135	1.39 **	± 0.85	93	1.18 **	± 0.65
Age (years)									
≤ 7	18	0.19	± 0.31	46	1.20 **	± 0.83	14	0.89	± 0.56
8-9	28	0.29	± 0.46	55	1.33 **	± 0.87	27	1.06 *	± 0.54
10-11	28	0.27	± 0.40	59	1.57 **	± 0.83	32	1.11 **	± 0.74
12-13	27	0.31	± 0.40	57	1.54 **	± 0.92	49	1.10 **	± 0.69
≥ 14	27	0.35	± 0.43	28	1.54 **	± 0.51	79	1.22 **	± 0.58

565 *p<0.05 and **p<0.01 by Tukey's test. N= Number of children examined. SD= Standard Deviation.

566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585

Figure 1

Geographical Location of Schools		Chapada dos Guimarães	Tangará da Serra	Porto Velho
Public School	Latitude	15°27.672'S	14°37.979'S	8°51.841'S
	Longitude	55°45.012'O	57°31.404'O	64°3.658'O
Private School	Latitude	15°27.803'O	14°36.853'S	-
	Longitude	55°44.985'O	57°29.750'O	-

5.2. Artigo Submetido:

Evaluation of mutagenic potential of particulate matter derived from biomass burning in Legal Brazilian Amazon: an environmental assessment study

Herbert Ary Sisenando[1, 6]*; Nilmara de Oliveira Alves[2]; Jana Dara Freires de Queiroz[2]; Silvia Regina Batistuzzo de Medeiros[3]; Ana Lúcia Matos Loureiro[4]; Fernando Morais[4]; Rivanildo Dallacort[5]; Paulo Artaxo[4]; Sandra Souza Hacon[1]

[1]Escola Nacional de Saúde Pública - ENSP, Fiocruz, Rio de Janeiro, CEP: 21041-210, RJ, Brazil
[2]Departamento de Bioquímica, UFRN, Natal, CEP: 59072-970, RN, Brazil
[3]Departamento de Biologia Celular e Genética, UFRN, Natal, CEP: 59072-970, RN, Brazil
[4]Departamento de Física Aplicada, USP, São Paulo, CEP: 05508-900, SP, Brazil
[5]Universidade do Estado do Mato Grosso, UNEMAT, Tangará da Serra, CEP: 78300-000, MT, Brazil
[6]Departamento de Patologia, UFF, Niterói, CEP: 24033-900, RJ, Brazil

* Corresponding author

E-mail addresses:
HAS: herbertsisenando@yahoo.com.br
NOA: nilmara1@yahoo.com.br
JDFQ: jana_dara@hotmail.com
SRBM: sbatistu@cb.ufrn.br
ALML: ana@if.usp.br
FM: fmorais@if.usp.br
RD: rdallacort@gmail.com
PA: artaxo@if.usp.br
SSH: sandrahacon@gmail.com

Abstract:

Background: The Amazon suffers great changes resulting from the economic development cluttered, especially with the advance of agribusiness. The southern Legal Amazon is an area of cultivation of sugarcane for biofuel production and is inserted in the route of the plume dispersion of pollutants from the arc of deforestation. The aim of this study was to evaluate the mutagenic potential of organic extract of the particulate matter from the south of the Legal Amazon.

Methods: Increasing concentrations of organic extract of the particulate matter, obtained from the extraction of the Teflon filters exposed to biomass burning during the August-October/2008, it was analyzed in different systems: a cell free assay, a prokaryotic and eukaryotic assays.

Results: The results show that the extract concentrations tested were not cytotoxic and were unable to promote direct breaking in the plasmidial DNA. However, they were able to generate both gene and chromosomal mutations.

Conclusion:

Based on the results, this study shows that particulate matter generated by biomass burning induces genetic damage in bacterial strain and human lung cells.

Background:

The Amazon represents an area of 61% Brazilian territory, and it has been negatively affected by advancing economic development without sustainability, especially agribusiness and cattle raising. This has provoked changes in soil pattern use, resulting in increased deforestation and an increase in biomass burning in both native forest and pasture areas [1]. Tangará da Serra (TS) is the main city of a region located in the southern Brazilian Amazon affected by the pollution generated by burning sugarcane and the arc of deforestation. The burning of the straw sugarcane at the time of harvest is a method commonly used in Brazilian production to facilitate the harvest and increase the profitability of manual cutting, however, this procedure results in increased concentrations of pollutants in the atmosphere and direct health effects for the workers. [2, 3].

Studies conducted by Ignotti et al. [4] and Rosa et al. [5] showed that TS has the worst health indicators associated with respiratory diseases in the region. A study conducted by Sisenando et al. [6] in the same region showed a delimitation of two well-defined climatic periods (dry and rainy). This fact influences the concentration and dispersion of pollutants, given that the pollution generated by biomass burning in the Amazon reaches its peak during the dry season (May-October).

Biomass burning is a process of combustion of organic matter that is characterized by direct release into the atmosphere of a complex mixtures of toxic compounds, especially the particulate matter (PM), as also the formation of ozone and of the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) as secondary pollutants [7]. The PM is a complex mixture of extremely small particles, where the size of particles is directly linked to their potential to cause health problems. The Inhalable coarse particles (PM_{10}) are able to pass through the throat and nose and enter the lungs [8].

93 The toxicodynamics of the particulate matter is still poorly understood.
94 However, studies in cellular and animal models suggest possible mechanisms including
95 direct effects of particle components on the intracellular sources of reactive oxygen
96 species (ROS), indirect effects due the release of pro-inflammatory cytokines by
97 alveolar macrophages, and neural stimulation after particle deposition in the lungs [9,
98 10]. In addition to the inflammatory response, the PM also has the ability to adsorb
99 mutagenic compounds in the environment and transports them through the respiratory
100 tree to the alveoli [11].
101 The presence of a complex mixture of pollutants may have the ability at high
102 concentrations or after long exposure time, to induce genotoxic effects not only in
103 humans but also animals, plants and bacteria [12]. In a study by Abbas et al. [13] in
104 cells of Human alveolar macrophages exposed to particulates observed the formation of
105 DNA adducts associated with the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons
106 adsorbed on PM collected in the city of Dunkerque/France. Another genotoxic
107 mechanism of action associated with the particulate matter is the formation of oxidized
108 derivative of deoxyguanosine (8-oxo-dG). Prahalad et al. [14] in study *in vitro* with
109 Human airway epithelial cells showed the ability of the particulate to generate oxidative
110 DNA base damage after exposure to PM obtained from biomass burning.

111 Biomonitoring *in vitro* is an important tool in assessing the genotoxicity of
112 environmental areas of difficult access and an indicator of health problems. Micronuclei
113 (MN) are structures resulting from chromosomal fragments or whole chromosomes that
114 lag behind in anaphase during nuclear division [15, 16]. This chromosomal damage may
115 be related to the formation of 8-oxo-dG [17, 18] or adducts [17, 19] in the DNA
116 molecule. This characteristic justifies the use of MN as an important biomarkers used
117 successfully to genotoxic monitoring of areas affected by air pollutants. [6, 20]. Studies
118 by Alves et al. [20] with *Tradescantia pallida*, Wei et al. [21] with Human blood
119 lymphocytes and Poma et al. [22] with human fibroblast cells showed the good
120 correlation between exposure to particulate matter and formation of micronuclei.
121 The present study was undertaken to provide a basic set of data on the
122 cytotoxicity, genotoxicity, and mutagenicity of organic extract of particulate matter
123 obtained from biomass burning in Southern region of Legal Amazon, using prokaryotic
124 and eukaryotic systems.
125
126 **Methods:**
127 ***Study site***
128 The study was conducted in the city of Tangará da Serra (Latitude: 14°37'.10"S
129 and Longitude: 57°29'.09"W) that has a population of 83,431 inhabitants distributed
130 over an area of 11,391.314 km^2 and It's located in the southern Legal Amazon, in an
131 area with cycles of drought and rain typical that modify the levels of air pollution
132 (Figure 1) [6, 23]. Tangará da Serra (TS) is inserted in a region producing sugarcane
133 and that contain the two largest sugarcane processing plants of the southern Brazilian
134 Amazon [24]. The study site is located in a transition area between the Amazon biome
135 and the Cerrado and lies in the dispersion route of the pollution plume resulting from

136 fires in the Legal Amazon and pollution emanating from neighboring countries [25,
137 26], providing the worst indicators of respiratory morbidity in humans in the region [4].
138 Moreover, most of the forest fires occur in several and somewhat distant places;
139 however the smoke is transported far away. Indeed there are studies showing that
140 particulate matter found in Mato Grosso state, a Brazilian municipality, may come from
141 neighbor countries e.g. Bolivia or from others states of the Brazilian Amazon [27, 28].
142 The choice of the sampling period with Teflon filters had as criteria the highest
143 concentration of pollutants observed by Sisenando et al. [6] in the dry season, and
144 increased frequency of focuses fires reported by INPE [29] in months August-October.

145 ***Collection and extraction of the particulate matter***

146 The particulate matter was collected with Teflon filters (1 mm pore size, 47 mm
147 diameter) for 48 h, continuously. A total of 50 samples were collected on filters from
148 August-October/2008. The filters were extracted by ultrasonic method using
149 dichloromethane (DCM) in a 1:1 ratio between the solvent (mL) and PM_{10} (mg). The
150 volume of extract was reduced using the Rotavapor and dried with pure nitrogen. The
151 concentration of organic material extracted was determined and the sample was stored
152 at -20 °C in 5 mL of DCM. For the test, the sample was homogenized in DMSO to
153 obtain concentrations of 0.1, 0.5 and 1.0 mgL^{-1} of organic PM_{10}. The protocol for
154 sampling and weighing the Teflon filters, as well as organic extraction of PM_{10} was
155 described in more detail by Alves et al. [20].

156 ***Environmental data collection***

157 The environmental concentrations of PM, Ozone and Black Carbon (BC) in TS
158 were obtained from the monitoring station of air quality established at the Universidade
159 do Estado de Mato Grosso (campus of Tangará da Serra). This study is part of the
160 Program for Climate Change and Health coordinated by ENSP/ FIOCRUZ/ICICT, with

161 the global l coordination of INPE/CNPq/MCT. BC was determined using a light
162 reflectance technique (aethalometer), similar to that employed by Andreae et al. [30]
163 and Reid et al. [31]. The particulate matter was monitored in real time through the
164 equipment DATARAM (Thermo Electron Corporation). The ozone was monitored
165 through the ultraviolet photometric gas analyzer (Thermo 49), similar to that employed
166 by Moura et al. [32]. The data of the focuses fire (FF) were collected from the fire
167 monitoring system of INPE (http://sigma.cptec.inpe.br/queimadas/). The environmental
168 data of PM, Ozone and FF were monitored during the period August 13, 2008 to
169 January 13, 2009. The Black Carbon data were monitored during the period August 13,
170 2008 to December 12, 2008.

171 ***Plasmid, Bacterial strains and cell cultures***

172 The pBCKS plasmid was derived from the pBluescript® II phagemid. The
173 ampicillin-resistant gene has been replaced with the chloramphenicol-resistant gene.
174 The genotype of the CC104 *Escherichia coli* strain is ara, Δ*gtp-lac*5, *rps*L, [F´*lac*I378,
175 *lac*Z461, *pro*A^+B^+] str^r; CC104*mut*M*mut*Y is the same as CC104 with the addition of
176 resistance to kanamycin-tetracycline and mutations in the gene *mut*Y and *mut*M. The
177 mutant strain (CC104*mut*M*mut*Y) is deficient in two enzymes (Formamidopirimidina-
178 DNA-glicosilase and *mut*Y-glicolase) involved in the repair of oxidative damage [33].
179 The Human diploid fibroblast (MRC-5) is a type of cell culture derived from a male
180 fetal lung tissue obtained from a woman with a genetically normal family history and no
181 sign of neoplastic disease [34].

182 ***Analysis of break occurrences in plasmidial DNA***

183 One μg of pBCKS was treated for 1 h at 37° C with three concentration of
184 organic extract of PM_{10}. The assay included a negative control (plasmid treated with of
185 white filters) and a positive control (plasmid treated with Bam *HI* enzyme). The assay

186 followed the protocol described by Rolim et al. [35]. The breaks in plasmid DNA were
187 evaluated through the presence of linear form and circular form, since breaks in the
188 phosphodiester chains promote relaxation of the tension of supercoiled form. This test
189 was repeated three times.

190 ***Forward mutagenesis assay***

191 The assay is based on the binding capacity of the rifampicin to β subunit of the
192 RNA polymerase enzyme, inhibiting the transcription of genes important for encoding
193 proteins essential for bacterial survival. The mutational process responsible for the
194 growth of colonies in medium with rifampicin is the result of a mutation by substitution
195 of bases in the *rpo*β gene, which is responsible for encoding the β subunit of RNA
196 polymerase [36]. The test also allows evaluation of cytotoxicity through the analysis of
197 bacterial survival, and followed the protocol described by Sisenando et al. [37].

198 The growing cultures of the wild-type and repair-deficient strains were diluted in
199 Luria Broth (LB) medium together with the organic extracts assay concentration to 10^3
200 cells/mL, and incubated for 20-24 h with constant agitation (200 rpm) at 37 °C. After
201 incubation, the contents of tubes were divided into two series, the first used in the
202 mutagenesis analysis and the second in the cytotoxicity analysis. For the cytotoxicity
203 analysis, a new dilution to 10^3 cells/mL was made with LB medium, and 100 µL of this
204 new dilution was plated on LB agar supplemented with streptomycin (50 µg/µL) for
205 CC104 and tetracycline (50 µg/µL) and more kanamycin (50 µg/µL) for
206 CC104*mut*M*mut*Y. The plates were incubated for 18–20 h at 37 °C and colonies were
207 counted. Survival was calculated from the ratio between the number of colonies after
208 treatment and the number of colonies in the negative control. For mutagenesis analysis,
209 aliquots of 100 µL of treated cultures (without dilution) were plated on LB agar
210 supplemented with rifampicin (100 µg/µL) and incubated for 18-20 h at 37 ºC. The

211 colonies were counted and mutation rate established as the ratio between the number of
212 colonies in medium with and without rifampicin. The positive control used in the
213 experiment was ultraviolet light (30-W UV germicide lamp from the irradiated material
214 for 0 and 60 sec) and the extract of white filters was used as the negative control.

215 ***Cell viability assay***

216 Cell viability was measured by MTT assay and followed the protocol established by
217 Zhao et al. [38], with some modifications. 5×10^4 of human lung fibroblasts cells (MRC-
218 5) were seeded in 96-well culture plates. After 24 h, different concentrations of organic
219 extract were added and the period of exposition was 24 h. Each treatment was tested in
220 five individual wells. After exposition time, MTT solution (1 mg/mL) was added and
221 incubated for 4 h in the dark. DMSO was added as solubilization solution. The
222 absorbance was read in a wavelength of 550 nm using ELISA Microplate Reader. The
223 results were expressed as a percentage of the absorbance of control cells.

224 ***In vitro Cytokinesis-Block Micronucleus (CBMN) assay***

225 The mutagenic effects of organic PM_{10} was performed the CBMN assay using
226 the standard technique proposed by Fenech [38], with some modifications. Studies were
227 initiated by seeding 1.5×10^5 cells into six-well culture plates. The exposition to different
228 concentrations of organic extract of PM_{10} was done 24 h after the seeding and was
229 during 24 h. Cytochalasin B (Sigma) was added at a final concentration of 6 µg/mL
230 with the objective of accumulation of dividing cells at the binucleate stage, regardless of
231 their degree of synchrony. Negative control cells were exposed to Dulbecco's modified
232 Eagle's medium (DMEM) and DMSO 0.1%. Positive controls were treated with 10
233 ng/mL of a PAHs mixture. The cells were harvested, fixed with ice-cold fixative
234 solution (methanol–acetic acid 3:1), and stained with 10% Giemsa (stock solution
235 diluted 1:10 in PBS) for 7 minutes, rinsed in distilled water and air-dried. For each

236 treatment, the presence of MN was evaluated in 3000 cells in coded slides under a
237 magnification of 400X using an optical microscope, in accordance with Fenech et al
238 [39]. In addition to micronuclei frequency, the nuclear division index (NDI) was
239 calculated for each concentration as a parameter for cytotoxicity. The nuclear division
240 index was calculated using the formula: NDI = (M1 + 2M2 + 3M3 + 4M4)/N, where
241 M1–M4 represents the number of cells with 1–4 nuclei and N is the total number of
242 cells score, as recommended by Fenech [40].

243 ***Statistical analysis***

244 The data obtained in forward mutagenesis assay, CBMN and MTT assay were
245 evaluated by analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's comparison test.
246 The significance was determined when compared with the negative control. All data
247 were tabulated and analyzed using Microsoft Office 2007 and SPSS 16.0.

248

249 **Results**

250 Epidemiological studies carried out recently in the Brazilian Amazon have found
251 associations between exposure to air pollutants and respiratory endpoints. However, this
252 study is the first one to evaluate the mutagenic potential of organic extract of the
253 particulate matter from biomass burning in the Brazilian Amazon in human cells.

254 Figure 1 shows the Southern Amazon and the place where the filters were
255 exposed. The results presented in Figure 2 show that the highest concentrations of
256 particulate matter, ozone, focuses fire and black carbon were concentrated in the period
257 August to October. The results show that levels of particulate matter sampled in TS
258 exceeded 20 $\mu g/m^3$ across the dry period, where in 54% of the period the concentration
259 of PM_{10} was above the limit set by WHO is 50 $\mu g/m^3$[41]. Although it has not exceeded
260 the limit set by Air Quality Guidelines [41], ozone levels were above 20 ppb in 97% of

261 the dry period. When comparing the particulate material with black carbon, the study
262 corroborated with the literature in the profile of the two pollutants especially in the
263 period of highest concentration of focuses fire.

264 In order to determine whether organic extract was able to interact directly with
265 DNA generating breaks on the phosphodiester bond, a cell-free assay was performed
266 with the pBCKS plasmid. This plasmid was treated with different concentrations of
267 extract. The results showed that the treatment did not result in changes in plasmidial
268 DNA conformation (Figure 3). The non-existence of breaks on the phosphodiester bond
269 not excludes the possibility to have occurred other types of premutagenic damage to the
270 DNA molecule.

271 So, to analyze the mutagenic effect in live systems, the cytotoxicity of all
272 concentrations was done, in prokaryotic and eukaryotic assays. The Figure 4
273 demonstrated that the extract did not produce a significant decrease in bacterial survival,
274 suggesting that this organic extract has not a cytotoxic effect in the concentrations used.
275 In fact, an increase in cell growth was observed in the wild type strain, but it was not
276 statistically significant. For the eukaryotic system, the MTT was done to analyze the
277 cytotoxicity. Figure 5 shows that the organic extract was not able to generate
278 cytotoxicity in human lung cells (MRC-5).

279 Not being cytotoxic, the mutagenic assay could be done with the same extract
280 concentrations. Gene mutations were accessed in a prokaryotic system using *E. coli* CC
281 strains. Table 1 shows an increase in the mutant frequencies only in the deficient strain
282 at all doses tested when compared with the respective negative control, suggesting that
283 the extract was able to generate premutagenic oxidative lesions. Chromosomal
284 alteration was accessed by CBMN assay in MRC5 cells. Table 2 show a statistically
285 significant increase in micronucleus frequency in the highest concentration of extract

tested in comparison with the negative control. In the same Table, the NDI exhibited no significant difference between the concentrations and the negative control, confirming that the extract is not cytotoxic to human cells.

Discussion

The Southern Brazilian Amazon is a region impacted by the growth of agribusiness on native forests areas and by the sugarcane burning. This region has not a systematic air pollution monitoring program that allows a more complex assessment of the exposure toxicity.

The measurements of ozone, particulate matter and black carbon in TS showed a higher concentration of pollutants in the dry season, this profile reflects the fire incidences modeled by INPE [29] through satellites. The similarity between the profiles of black carbon and particulate matter in areas with intense biomass burning was also observed in Amazon regions by Artaxo et al. [42, 43] and Maenhaut et al. [44]. The results of PM10 may indicate that the results obtained by Rosa et al. [26] and Ignotti et al. [4] in Tangará da Serra may be related to high rates of morbidity from respiratory disease. However, some confounds variables have to be considered, such as the health quality services. The World Health Organization [41] shows that the long-term exposure to a concentration of 20 $\mu g/m^3$ of particle has the ability to raise the profile of morbidity and mortality in the population, especially from respiratory disease in susceptible individuals (seniors and children).

Although not observed peak concentrations above the limit set by WHO (50 ppb or 100 $\mu g/m^3$ by 8-hour mean), the long-term exposure to ozone is a risk to public health due to oxidant action in the cell [41, 45, 46]. Studies conducted by Gouveia et al. [47] in São Paulo/Brazil, Hernandez-Cadena et al. [48] in Juárez/Mexico, McConnell et al. [49]

311 in California/USA and Ostro et al. [50] in Santiago/Chile show a relationship between
312 ozone exposure and increased cases of respiratory problems in children.

313 The plasmidial DNA assay with agarose gel electrophoresis and test with *E. coli*
314 strains have been widely used by the scientific community to detect the genotoxicity of
315 chemical substances, especially natural products [35, 37]. Although simple, the assays
316 are important because they are the firsts of several other tests used to assess the toxic
317 potential of compounds that interact with humans. The organic extract was unable to
318 break directly the phosphodiester chain of DNA suggesting that organic material present
319 on PM needs a cell system, may be interacting with other molecules, to generate
320 oxidative species, able to interact with DNA as it was the case in both live systems
321 used. The cytotoxicity in human cells was also evaluated after treating of human lung
322 fibroblasts with organic extract, and as for prokaryotic cells, were not cytotoxic. A
323 study conducted by Roubicek et al. [51] did not observe decrease in viability cell after
324 treatment of human alveolar cells with 1.25, 1.65 and 2.5 m^3/ml of organic extract of
325 particulate matter collected in Mexico City.

326 In study conducted with the same concentrations of organic extract of PM used
327 in our study, Alves et al. [20] extracted and determined the N-alkanes and PAHs from
328 the organic extract by gas chromatography coupled to flame ionization detection (GC-
329 FID). As result of GC-FID and according to the International Agency for Research on
330 Cancer (IARC) [52], 05 mutagenic PAHs were detected: Phenanthrene (PHE),
331 Fluoranthene (FLT), Pyrene (PYR), Benzo[e]pyrene (BeP) and benzo[g,h,i]pyrene
332 (BgP); and also were detected 07 carcinogenic and mutagenic PAHs: Benz[a]anthracene
333 (BaA), Chrysene (CHR), Benzo[b]fluoranthene (BbF), Benzo[k]fluoranthene (BkF),
334 Benzo[a]pyrene (BaP), Indene[1,2,3-c,d]pyrene (IND) and Dibenz[a,h]anthracene
335 (DBA).

336 The genotoxicity of PM was assessed by the CBMN assay with human lung cells
337 exposed to different concentrations of the extract. The result showed a significant
338 increase in the frequency of micronuclei at the highest concentrations tested. Roubicek
339 et al. [51] working with another strain of human lung cells showed similar results after
340 treatment of cells with PM_{10} captured in Mexico City. The micronucleus frequency
341 observed in the CBMN assay confirms the results observed by Alves et al. [20] who
342 tested the same organic extract with *T. pallida* using hydroponics and noted an increase
343 in micronucleus frequency after treatment.

344 Another two genotoxicity studies were also developed in TS at the same period
345 and both corroborate with the data observed in our study. Sisenando et al. [6] observed
346 an increased micronucleus frequency in *T. pallida* after acute and chronic exposure to
347 atmosphere of the region during the dry season (May - October/2008). A study
348 conducted by Sisenando et al. with 574 schoolchildren observed a significant increase in
349 the MN frequency in exfoliated buccal cells after exposure to pollution during the dry
350 season [unpublished observations].

351 In terms of toxicodynamic mechanism, the formation of micronuclei may be
352 related to the oxidative stress generated by ROS. In fact, the influence of oxidative
353 stress generated by particulate matter was analyzed by forward mutagenesis assay using
354 CC104*mut*M*mut*Y that is deficient in two enzymes of oxidative repair. The increase in
355 the number of mutant colonies observed at all concentrations shows that the PM_{10}
356 caused oxidative stress able to generate gene mutation. Data provided by the US
357 Environmental Protection Agency (EPA) [53] show that some PAHs found in the PM of
358 Tangará da Serra (e.g.: benzo[a]pyrene, Phenanthrene and Benz[a]anthracene) are
359 capable of inducing gene mutation after exposure.

360 Study by Prahalad et al. [14] in USA also observed oxidative damage (8-oxo-
361 dG) in human airway epithelial cells after exposure to doses from 0.2 to 1.0 mg/ml of
362 particulate matter obtained from biomass burning. The correlation between oxidative
363 damage and chromosomal alteration (micronucleus) was observed by Chorvatovicova et
364 al. [18] in a study with rat alveolar type II cells.

365 Another important mechanism of formation of micronuclei related in scientific
366 literature is the formation of DNA adducts after exposure to PM. The presence of
367 benzopyrenes in the particulate matter observed by Alves et al. [20] suggests the
368 possible formation of DNA adducts after exposure to particulate sampled in TS. Studies
369 by Abbas et al. [13] in human lung macrophages and by Feldman et al. [54] in human
370 lung epithelial cells proved the ability of benzo[a]pyrene to generate DNA adducts.

371 All together, the results show that the concentrations tested of organic extract
372 extracted from PM of TS were not cytotoxic and are able to generate both gene
373 mutation and chromosomal alteration, probably by oxidative damage in a cell system.

374

375 ## Conclusion

376 Based on the results, this study showed that organic extracts of particulate matter
377 collected during the dry season in TS is capable of generating gene mutations and
378 chromosomal alteration. The study also noted a strong oxidative potential of the extract,
379 which may help to explain its mechanism of action.

380

381 **List of abbreviations used**

382 MTT: 3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; CBMN:
383 Cytokinesis-Block Micronucleus; TS: Tangará da Serra; PM: Particulate matter; PAHs:
384 Polycyclic Aromatic hydrocarbons; PM_{10}: Inhalable coarse particles; ROS: Reactive

385 oxygen species; DNA: Deoxyribonucleic acid; MN: Micronuclei; INPE: National
386 institute for space research; DCM: Dichloromethane; MRC5 cells: Human lung
387 fibroblasts; DMSO: Dimethyl sulfoxide; PBS: Phosphate buffered saline; BC: Black
388 carbon; FF: Focuses fire; pBCKS: pBCKS plasmid; *Fpg*: Formamidopyrimidine
389 glycoslyase enzyme; RNA: Ribonucleic acid; DMEM: Dulbecco's modified Eagle's
390 medium; ANOVA: Analysis of variance; WHO: World Health Organization; NDI:
391 Nuclear division index; GC-FID: Gas chromatography coupled to flame ionization
392 detection; IARC: International Agency for Research on Cancer EPA: US Environmental
393 Protection Agency.

394 **Competing interests**

395 The authors declare that they have no competing interests.

396 **Authors' contributions**

397 HAS participated in the study design, conducted the analyses, and drafted the
398 manuscript; NOA participated in the study design, conducted the analyses, and drafted
399 the manuscript; JDFQ participated in the conduct of mutagenic analysis of the
400 particulate material and drafted the manuscript; SRBM participated in the study design,
401 guided the genotoxicity analyses, and reviewed the manuscript drafts; ALML and FM
402 participated in conducting the physical analysis of the particulate material; RD
403 coordinated the sampling of particulate matter at the site of study; PA was involved in
404 revision and preparation of the manuscript for publication; SSH conceived of the study,
405 participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All
406 authors read and approved the final manuscript.

407

408 **Authors' information**

[1]Escola Nacional de Saúde Pública, Fiocruz, 21041-210, Rio de Janeiro, Brazil. [2]Departamento de Bioquímica, UFRN, 59072-970, Natal, Brazil. [3]Departamento de Biologia Celular e Genética, UFRN, 59072-970, Natal, Brazil. [4]Departamento de Física Aplicada, USP, 05508-900, São Paulo, Brazil. [5]Universidade do Estado de Mato Grosso, UNEMAT, 78300-000, Tangará da Serra, Brazil. [6]Departamento de Patologia, UFF, 24033-900, Niterói, Brazil.

Acknowledgements

This work had financial support from Fiocruz and MCT-CNPq/CT-18, but also the logistical support of the UNEMAT, Laboratório de Física Ambiental/USP and Laboratório de Mutagênese Ambiental/UFRN. The authors are grateful for the logistical support of the trainees of the UNEMAT and also of the LAMA/UFRN. All the authors acknowledge the intellectual support of the researchers Dennys de Souza Mourão/Fiocruz, Eliane Ignotti/UNEMAT and Viviane Souza do Amaral/UFRN.

Reference

1. Ferreira DAC, Nogueira SP, Carneiro-Filho A, Soares-Filho B: **Mato, grosso até quando?** *Cienc Hoje* 2008, **42:**26-31.
2. **Yield of sugarcane** [http://www.conab.gov.br/conabweb/]
3. Moraes MAFD: **O mercado de trabalho da agroindústria canavieira: desafios e oportunidades.** *Econ Apl* 2007, **11:**605-619.
4. Ignotti E, Hacon SS, Silva AMC, Junger WL, CASTRO HA: **Effects of biomass burning in Amazon: method to select municipalities using health indicators.** *Rev Bras Epidemiol* 2007, **10:**453-464.
5. Rosa AM, Ignotti E, Hacon SS, Castro HA: **Analysis of hospitalizations for respiratory diseases in Tangará da Serra, Brazil.** *J Bras Pneumol* 2008, **34:**575-582.
6. Sisenando HA, Batistuzzo de Medeiros SR, Saldiva PH, Artaxo P, Hacon SS: **Genotoxic potential generated by biomass burning in the Brazilian Legal Amazon by Tradescantia micronucleus bioassay: a toxicity assessment study.** *Environ Health* 2011, **10:**41.

443 7. Arbex MA, Cancado JED, Pereira LAA, Braga ALF, Saldiva PHN: **Biomass**
444 **burning and health effects.** *J Bras Pneumol* 2004, **30:**158-175.
445 8. **Particulate Matter** [http://www.epa.gov/]
446 9. Gonzalez-Flecha B: **Oxidant mechanisms in response to ambient air**
447 **particles.** *Mol Aspects Med* 2004, **25:**169-182.
448 10. Mutlu EA, Engen PA, Soberanes S, Urich D, Forsyth CB, Nigdelioglu R,
449 Chiarella SE, Radigan KA, Gonzalez A, Jakate S, et al: **Particulate matter air**
450 **pollution causes oxidant-mediated increase in gut permeability in mice.** *Part*
451 *Fibre Toxicol* 2011, **8:**19.
452 11. Erdinger L, Durr M, Hopker KA: **Correlations between mutagenic activity of**
453 **organic extracts of airborne particulate matter, NOx and sulphur dioxide in**
454 **southern Germany: results of a two-year study.** *Environ Sci Pollut Res Int*
455 2005, **12:**10-20.
456 12. Isidori M, Ferrara M, Lavorgna M, Nardelli A, Parrella A: **In situ monitoring**
457 **of urban air in Southern Italy with the tradescantia micronucleus bioassay**
458 **and semipermeable membrane devices (SPMDs).** *Chemosphere* 2003,
459 **52:**121-126.
460 13. Abbas I, Garcon G, Saint-Georges F, Andre V, Gosset P, Billet S, Goff JL,
461 Verdin A, Mulliez P, Sichel F, Shirali P: **Polycyclic aromatic hydrocarbons**
462 **within airborne particulate matter (PM(2.5)) produced DNA bulky stable**
463 **adducts in a human lung cell coculture model.** *J Appl Toxicol* 2011.
464 14. Prahalad AK, Inmon J, Dailey LA, Madden MC, Ghio AJ, Gallagher JE: **Air**
465 **pollution particles mediated oxidative DNA base damage in a cell free**
466 **system and in human airway epithelial cells in relation to particulate metal**
467 **content and bioreactivity.** *Chem Res Toxicol* 2001, **14:**879-887.
468 15. Holland N, Bolognesi C, Kirsch-Volders M, Bonassi S, Zeiger E, Knasmueller
469 S, Fenech M: **The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for**
470 **biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current**
471 **status and knowledge gaps.** *Mutat Res* 2008, **659:**93-108.
472 16. Fenech M, Holland N, Knasmueller S, Burgaz S, Bonassi S: **Report on the**
473 **buccal micronucleus assay workshop organized by the International**
474 **Human Micronucleus (HUMN) project--Antalya, Turkey 2007.** *Mutagenesis*
475 2009, **24:**199-201.
476 17. Iarmarcovai G, Bonassi S, Botta A, Baan RA, Orsiere T: **Genetic**
477 **polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature.**
478 *Mutat Res* 2008, **658:**215-233.
479 18. Chorvatovicova D, Hoet PH, Tatrai E, Kovacikova Z: **Ozone-induced**
480 **micronuclei frequency in rat alveolar Type II cells.** *Physiol Res* 2000,
481 **49:**733-736.
482 19. Von Tungeln LS, Churchwell MI, Doerge DR, Shaddock JG, McGarrity LJ,
483 Heflich RH, da Costa GG, Marques MM, Beland FA: **DNA adduct formation**
484 **and induction of micronuclei and mutations in B6C3F1/Tk mice treated**
485 **neonatally with acrylamide or glycidamide.** *Int J Cancer* 2009, **124:**2006-
486 2015.
487 20. Alves NO, Matos Loureiro AL, Dos Santos FC, Nascimento KH, Dallacort R,
488 Castro Vasconcellos P, Hacon SS, Artaxo P, Batistuzzo de Medeiros SR:
489 **Genotoxicity and composition of particulate matter from biomass burning**
490 **in the eastern Brazilian Amazon region.** *Ecotoxicol Environ Saf* 2011,
491 **74:**1427-1433.

21. Wei A, Meng Z: **Evaluation of micronucleus induction of sand dust storm fine particles (PM(2.5)) in human blood lymphocytes.** *Environ Toxicol Pharmacol* 2006, **22:**292-297.
22. Poma A, Arrizza L, Picozzi P, Spano L: **Monitoring urban air particulate matter (fractions PM 2.5 and PM 10) genotoxicity by plant systems and human cells in vitro: a comparative analysis.** *Teratog Carcinog Mutagen* 2002, **22:**271-284.
23. **Brazilian institute of geography and statistics - Cidades@** [http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1]
24. **Sugarcane crop mapping in Brazil by Earth observing satellite images.** [http://www.dsr.inpe.br/mapdsr/]
25. Silva Dias MAF, Cohen JCP, Gandú AW: **Clouds, rain and biosphere interactions in Amazon** *Acta Amazon* 2005, **35:**215-222.
26. Rosa AM, Ignotti E, Botelho C, Castro HA, Hacon SS: **Respiratory disease and climatic seasonality in children under 15 years old in a town in the Brazilian Amazon.** *J Pediatr* 2008, **84:**543-549.
27. Martin ST, Andreae MO, Artaxo P, Baumgardner D, Chen Q, Goldstein AH, Guenther A, Heald CL, Mayol-Bracero OL, McMurry PH, et al: **Sources and properties of Amazonian aerosol particles.** *Rev Geophys* 2010, **48:**RG2002.
28. Freitas SR, Longo KM, Dias MAFS, Dias PLS: **Emissões de queimadas em ecossistemas da América do Sul.** *Estud Av* 2005, **19:**167-185.
29. **Queimadas: Monitoramento de Foco**
30. Andreae MO, Andreae TW, Ferek RJ, Raemdonck H: **Long-range transport of soot carbon in the marine atmosphere.** *Sci Total Environ* 1984, **36:**73–80.
31. Reid JS, Hobbs PV, Liousse C, Martins JV, Weiss RE, Eck TF: **Comparisons of techniques for measuring shortwave absorption and black carbon content of aerosols from biomass burning of Brazil.** *J Geophys Res* 1998, **103:**32031–32040.
32. Moura MAL, Meixner FX, Trebs I, Lyra RFdF, Andreae MO, Nascimento Filho MFd: **Evidencia observacional das brisas do lago de Balbina (Amazonas) e seus efeitos sobre a concentração do ozônio.** *Acta Amazonica* 2004, **34:**605-611.
33. Michaels ML, Cruz C, Grollman AP, Miller JH: **Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1992, **89:**7022-7025.
34. Jacobs JP, Jones CM, Baille JP: **Characteristics of a human diploid cell designated MRC-5.** *Nature* 1970, **227:**168-170.
35. Rolim LA, Macedo MF, Sisenando HA, Napoleao TH, Felzenszwalb I, Aiub CA, Coelho LC, Medeiros SR, Paiva PM: **Genotoxicity evaluation of Moringa oleifera seed extract and lectin.** *J Food Sci* 2011, **76:**T53-58.
36. Miller JH: *A short course in bacterial genetics.* New York: Cold spring Harbor Laboratory Press; 1992.
37. Sisenando HA, Macedo MF, Saturnino AC, Coelho LC, de Medeiros SR: **Evaluation of the genotoxic potential of Bauhinia monandra leaf lectin (BmoLL).** *Food Chem Toxicol* 2009, **47:**303-308.
38. Fenech M: **The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations.** *Mutat Res* 1993, **285:**35-44.
39. Fenech M, Chang WP, Kirsch-Volders M, Holland N, Bonassi S, Zeiger E: **HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the**

542 **cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte**
543 **cultures.** *Mutat Res* 2003, **534:**65-75.
544 40. Fenech M: **Cytokinesis-block micronucleus cytome assay.** *Nat Protoc* 2007,
545 **2:**1084-1104.
546 41. WHO: *Air Quality Guidelines: Global Update 2005. Particulate matter, ozone,*
547 *nitrogen dioxide and sulfur dioxide.* Copenhagen: WHO Regional Office for
548 Europe; 2005.
549 42. Artaxo P, Martins JV, Yamasoe MA, Procópio AS, Pauliquevis TM, Andreae
550 MO, Guyon P, Gatti LV, Leal AMC: **Physical and chemical properties of**
551 **aerosols in the wet and dry seasons in Rondônia, Amazonia.** *J Geophys Res*
552 2002, **107:**8.081-088.095.
553 43. Artaxo P, Calixto de Campos R, Fernandes ET, V. Martins J, Xiao Z, Lindqvist
554 O, FernÃ¡ndez-JimÃ©nez MT, Maenhaut W: **Large scale mercury and trace**
555 **element measurements in the Amazon basin.** *Atmospheric Environment* 2000,
556 **34:**4085-4096.
557 44. Maenhaut W, FernÃ¡ndez-JimÃ©nez M-T, Rajta I, Artaxo P: **Two-year study**
558 **of atmospheric aerosols in Alta Floresta, Brazil: Multielemental**
559 **composition and source apportionment.** *Nuclear Instruments and Methods in*
560 *Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms* 2002,
561 **189:**243-248.
562 45. Rivas-Arancibia S, Guevara-Guzman R, Lopez-Vidal Y, Rodriguez-Martinez E,
563 Zanardo-Gomes M, Angoa-Perez M, Raisman-Vozari R: **Oxidative stress**
564 **caused by ozone exposure induces loss of brain repair in the hippocampus**
565 **of adult rats.** *Toxicol Sci*, **113:**187-197.
566 46. Baier M, Kandlbinder A, Golldack D, Dietz K-J: **Oxidative stress and ozone:**
567 **perception, signalling and response.** *Plant, Cell & Environment* 2005,
568 **28:**1012-1020.
569 47. Gouveia N, Fletcher T: **Respiratory diseases in children and outdoor air**
570 **pollution in Sao Paulo, Brazil: a time series analysis.** *Occup Environ Med*
571 2000, **57:**477-483.
572 48. Hernandez-Cadena L, Tellez-Rojo MM, Sanin-Aguirre LH, Lacasana-Navarro
573 M, Campos A, Romieu I: **Relationship between emergency consultations for**
574 **respiratory diseases and air pollution in Juarez City, Chihuahua.** *Salud*
575 *Publica Mex* 2000, **42:**288-297.
576 49. McConnell R, Berhane K, Gilliland F, London SJ, Islam T, Gauderman WJ,
577 Avol E, Margolis HG, Peters JM: **Asthma in exercising children exposed to**
578 **ozone: a cohort study.** *Lancet* 2002, **359:**386-391.
579 50. Ostro BD, Eskeland GS, Sanchez JM, Feyzioglu T: **Air pollution and health**
580 **effects: A study of medical visits among children in Santiago, Chile.** *Environ*
581 *Health Perspect* 1999, **107:**69-73.
582 51. Roubicek DA, Gutiérrez-Castillo ME, Sordo M, Cebrián-García ME, Ostrosky-
583 Wegman P: **Micronuclei induced by airborne particulate matter from**
584 **Mexico City.** *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental*
585 *Mutagenesis* 2007, **631:**9-15.
586 52. IARC: *Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some*
587 *Related Exposures* Internation Agency for Research on Cancer edn. Lyon:
588 Internation Agency for Research on Cancer; 2010.
589 53. **Integrated Risk Information System** [http://www.epa.gov/iris/index.html]

54. Feldman G, Remsen J, Shinohara K, Cerutti P: **Excisability and persistence of benzo(a)pyrene DNA adducts in epithelioid human lung cells.** *Nature* 1978, **274:**796-798.

Table 1 - Mutant frequency in wild-type and *mut*M- and *mut*Y- deficient *E.coli* strains treated with organic extract of PM_{10}.

PM_{10} (mgL^{-1})	CC104 (x 10^{-8})	CC104*mut*M*mut*Y (x 10^{-6})
NC	0.22 ± 0.38	0.28 ± 0.13
0.1	0.10 ± 0.18	0.96 ± 0.26$^{\#\#}$
0.5	0.09 ± 0.15	1.07 ± 0.17$^{\#\#}$
1	0.62 ± 0.29	0.93 ± 0.20$^{\#}$
PC 0"	0.14 ± 0.25	1.60 ± 0.23$^{\#\#}$
PC 60"	26.53 ± 7.98$^{\#\#}$	3.17 ± 0.08$^{\#\#}$

NC= negative control (extract of white filters). PC 0"= positive control (irradiated for 0 second). PC 60"= positive control (irradiated for 60 second). $^{\#}$ $p<0.05$ and $^{\#\#}$ $p< 0.01$ when compared with negative control.

Table 2 - Micronuclei frequency and NDI in MRC5 cells treated with organic extract of PM_{10}.

PM_{10} (mgL^{-1})	MN‰ ± SD			NDI
NC_1	6.00 ± 1.00			1.54
NC_2	8.66 ± 1.52			1.53
0.1	9.33 ± 1.52			1.52
0.5	10.66 ± 1.52	*		1.54
1	15.66 ± 2.51	**	##	1.51
PC	21.66 ± 1.52	**	##	1.59

NC_1= negative control with DMEM. **NC_2**= negative control with DMSO 0.1%. PC= positive control with PAHs mixture. MN‰= micronuclei frequency/1000 cells. SD= standard deviation. NDI= nuclear division index. *$p<0.05$ and **$p< 0.01$ when compared with **NC_1**. $^{\#}p<0.05$ and $^{\#\#}p< 0.01$ when compared with **NC_2**.

Figure 1 - Geographic location of the study site.

Figure 2 - Distribution of environmental variables in the study site.

Figure 3 - Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA. NC= Negative control. PC= Positive control.

Figure 4 - Analysis of the cytotoxicity induced by PM_{10} in CC104 strains. NC= Negative control.

Figure 5 - Cell viability of human lung fibroblast treated with PM_{10} extract by MTT assay. DMSO= DMSO control. PC= Positive control.

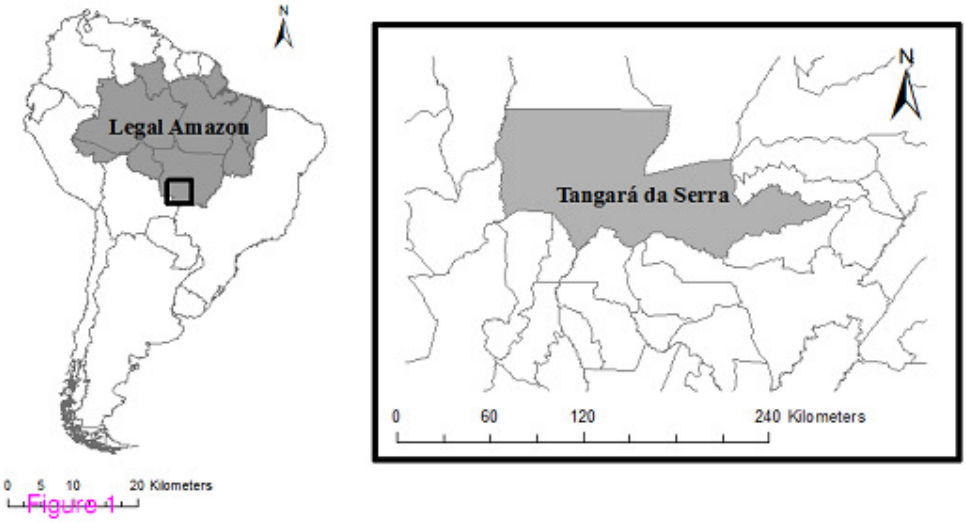

N
Legal Amazon
0 5 10 20 Kilometers
N
Tangará da Serra
0 60 120 240 Kilometers

Figure 1

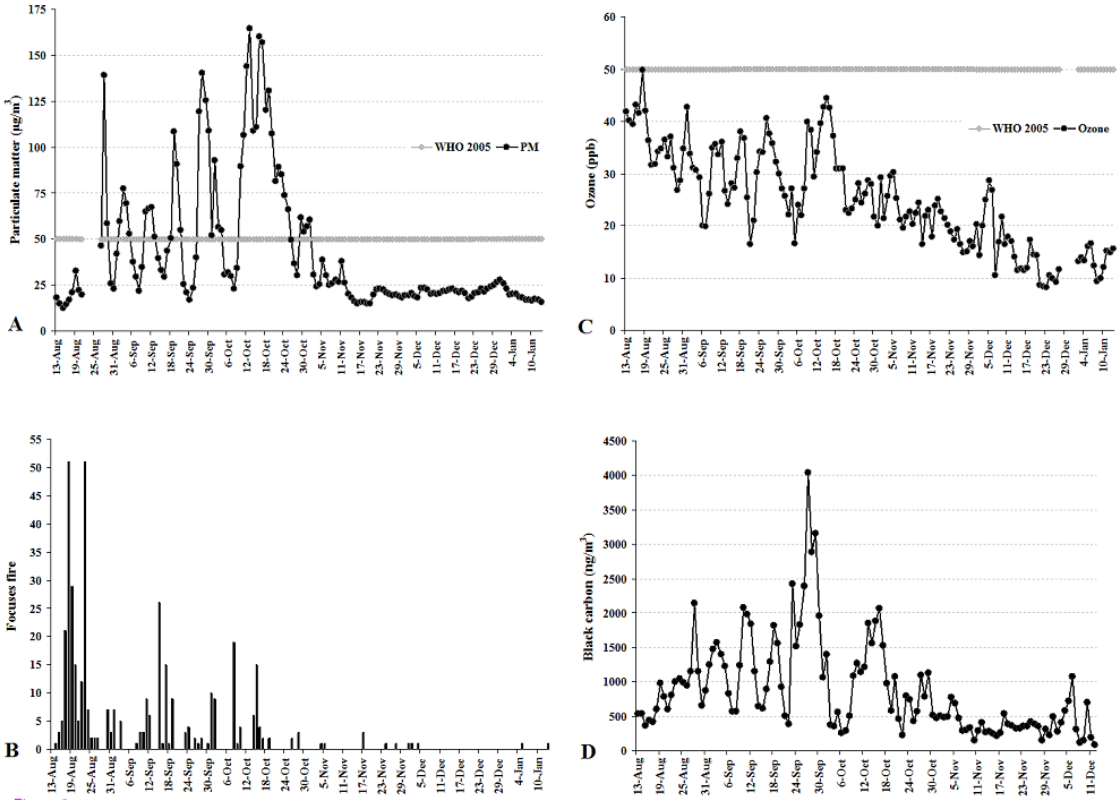

A
Particulate matter (µg/m³)
WHO 2005
PM
B
Focuses fire
C
Ozone (ppb)
WHO 2005
Ozone
D
Black carbon (ng/m³)

Figure 2

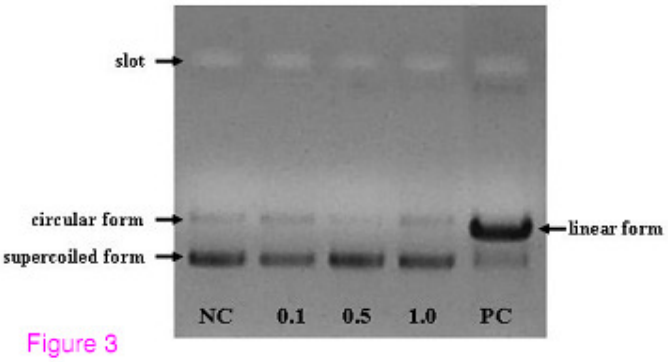

slot
circular form
supercoiled form
linear form
NC
0.1
0.5
1.0
PC

Figure 3

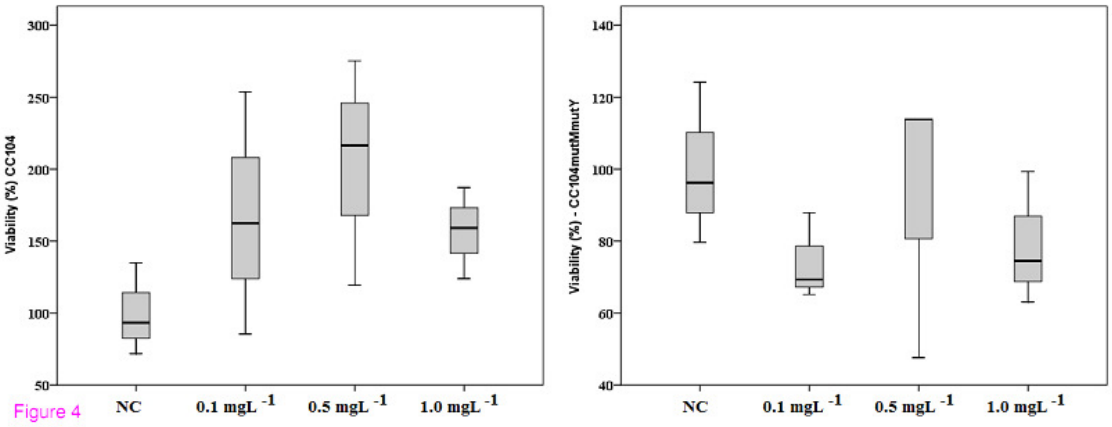

Viability (%) CC104
300
250
200
150
100
50
NC
0.1 mgL -1
0.5 mgL -1
1.0 mgL -1
Viability (%) - CC104mutMmutY
140
120
100
80
60
40
NC
0.1 mgL -1
0.5 mgL -1
1.0 mgL -1

Figure 4

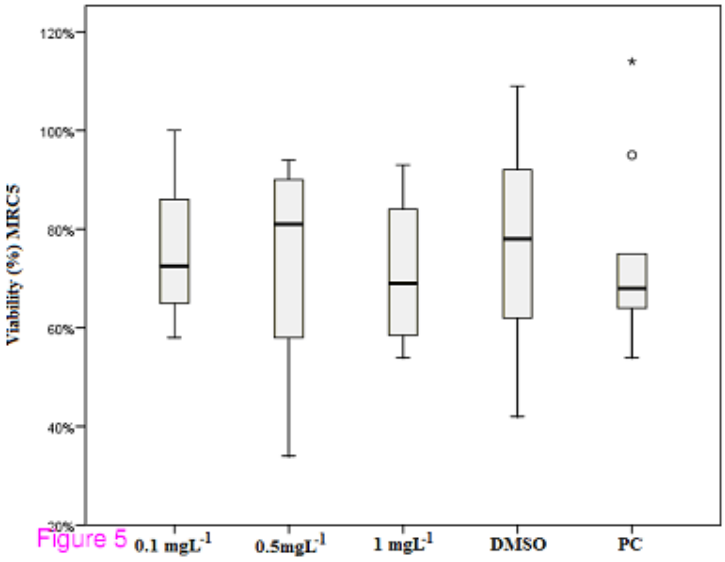

Viability (%) MRC5
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0.1 mgL-1
0.5mgL-1
1 mgL-1
DMSO
PC

Figure 5

6. CONCLUSÃO

- O presente trabalho foi marcado pelo pioneirismo científico no tocante à avaliação do potencial genotóxico gerado pela queima de biomassa na Amazônia Legal brasileira.
- O estudo evidenciou que a maior concentração de material particulado na região foi observada durante o período seco, que ocorre entre os meses de maio-outubro e coincide com período de colheita da cana-de-açúcar.
- O estudo observou uma correlação positiva entre a exposição ao material particulado e o aumento na frequência de micronúcleos tanto células de *T. pallida* quanto de crianças em idade escolar.
- No estudo da toxicidade do material particulado amostrado durante o período seco na região, ficou evidenciada a capacidade deste particulado em gerar micronúcleos numa linhagem de Fibroblastos de pulmão humano.
- Os resultados dos testes com *E. coli* mostraram um provável mecanismo de ação do particulado associado à formação de estresse oxidativo.
- No estudo com bioindicadores, os resultados demonstraram uma correlação significante entre o aumento do dano genotóxico em células de *Tradescantia* e a taxa de hospitalização por doenças respiratórias em crianças da região.
    - Este fato sugere o uso do biomonitoramento *in situ* utilizando organismo sensível (*Tradescantia pallida* purpurea) como uma importante ferramenta para o monitoramento da qualidade do ar em regiões carentes de infraestrutura e remotas.

7. APÊNDICE

7.1. Certificado de honra ao mérito por trabalho premiado em Congresso/Simpósio:

Congresso Brasileiro da SBMCTA

Resgatando a história da mutagênese ambiental no Brasil

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado **AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE GENÉTICA ASSOCIADA AO MATERIAL PARTICULADO EMITIDO PELA QUEIMA DE BIOMASSA EM TANGARÁ DA SERRA-MT** de autoria de **Alves, N.O.; Loureiro, A.L.M.; Sisenando, H.A.; Cabral, TM.; Artaxo, P.; Hacon, S.S.; Batistuzzo de Medeiros, S.R.**, foi apresentado em sessão de pôster, sendo classificado como o melhor trabalho da **ÁREA I - Estresse oxidativo, mutagênese e antimutagênese** apresentado no IX Congresso da Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, no período de 11 a 14 de novembro no Centro de Artes e Convenções da Universidade Federal de Ouro Preto-MG.

Ouro Preto, 14 de novembro de 2009

Elza T. Sakamoto Hojo
Presidente

Eliana A. Varanda
Secretária

Biocasy Biomolecular

SBMCTA

20 anos SBMCTA

7.2. Resumos publicados em anais de Congressos/Simpósios:

Congresso Brasileiro de Toxicologia 2011 (Ribeirão Preto/Brasil):

- Freqüência de micronúcleos em crianças expostas a poluição gerada pela queima de biomassa na Amazônia Legal Brasileira.
- Avaliação do potencial mutagênico gerado pela queima de cana-de-açúcar na Amazônia Brasileira através do ensaio de micronúcleos em *Tradescantia pallida*.

Congresso Brasileiro de Toxicologia 2009 (Belo Horizonte/Brasil):

- Avaliação do potencial de genotoxicidade do material particulado emitido pela queima de biomassa na Amazônia brasileira.

Congresso Brasileiro de Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese Ambiental 2009 (Ouro Preto/Brasil):

- Avaliação da toxicidade genética associada ao material particulado emitido pela queima de biomassa em Tangará da Serra-MT.
- Evaluation of mutagenic potential of particulate matter (PM) derived from biomass burning by Salmonella microsuspension mutagenicity assay.
- Mutagenicidade do material particulado oriundo da queima de biomassa na Amazônia legal através do ensaio de mutagênese direta.
- *Tradescantia pallida* como indicador sentinela de danos genotóxicos produzidos pela queima de biomassa na Amazônia legal.

10th International Conference on Environmental Mutagens 2009 (Florença/Itália):

- Nuclear impact generated by elements derived from biomass burning in two Brazilian regions.

8. ANEXOS

8.1. Parceria com a Universidade do Estado do Mato Grosso – UNEMAT para difusão do uso da *T. pallida* como indicador de dano ambiental na Amazônia:

8.1.1 Artigo Publicado:

- Teste de micronúcleo com *Tradescantia pallida* e de viabilidade polínica aplicado ao biomonitoramento da qualidade do ar no município de Tangará da Serra-MT. ***Revista Uniciência***, 2011.

UNICiências, v.15, n.1, 2011

TESTE DE MICRONÚCLEO COM *TRADESCANTIA PALLIDA* E DE VIABILIDADE POLÍNICA APLICADO AO BIOMONITORAMENTO DA QUALIDADE DO AR NO MUNICÍPIO DE TANGARÁ DA SERRA-MT

Nayara Niele Sacoman[1]
Maurecilne Lemes da Silva[2]
Gizelly Mendes da Silva[3]
Suzam Lenni da Silva Pereira[4]
Ilio Feallho de Carvalho[5]
Herbert Ary Sisenando[6]
Viviane Luiza Hunhoff[7]

RESUMO

O município de Tangará da Serra/MT, localizado numa região de transição entre o bioma Amazônico e o Cerrado, está inserido na área de dispersão dos poluentes atmosféricos gerados pelo arco do desmatamento e pelas queimadas de cana de açúcar que são processadas em três usinas de açúcar e álcool na região. Os poluentes atmosféricos emitidos podem ser avaliados por meio do biomonitoramento, utilizando-se de plantas consideradas indicadoras da qualidade do ar. O trabalho objetivou a realização do bioensaio de mutagenicidade Trad-MCN e da viabilidade polínica através da exposição espontânea de Tradescantia pallida var. purpurea ao ar atmosférico em áreas urbanas da cidade de Tangará da Serra/MT, em três períodos sazonais entre a estação das chuvas e a seca. O estudo foi desenvolvido em 2009 com coletas realizadas nos meses de março (período chuvoso), junho (período entre chuvas e seca) e agosto (período da seca). Foram demarcados seis pontos de monitoramento utilizando-se de T. pallida em canteiros públicos sendo: Ponto 01 - Centro; Pon-

to 02 – Unic Sul; Ponto 03 – Dona Julia; Ponto 04 – Cohab Tarumã; Ponto 05 – Unic Norte; Ponto 06 – Testemunha. As inflorescências foram fixadas em etanol e ácido acético na proporção de 3:1 nos locais de coleta, e armazenadas em etanol a 70%. Os botões florais foram macerados sob lâminas e corados com carmim acético a 5%. Quantificou-se em cada lâmina o total de tétrades, observando a presença ou a ausência de micronúcleos. A frequência de micronúcleos foi expressa em porcentagem, sendo, o número total de micronúcleos em 100 tétrades. Os mesmos procedimentos foram utilizados para a análise da viabilidade polínica. Os resultados mostraram que nos períodos de chuvas intensas e moderadas (março e junho) ocorreu baixo índice de micronúcleos nas células em fase de tétrades, não apresentando diferenças significativas entre os períodos de coleta e os pontos. No período de seca no mês de agosto foram encontrados altos índices de micronúcleos em tétrades, especialmente nos pontos do Centro com 12,44%, Unic Norte 10,55% e Cohab Tarumã 7,77%. Resultados similares foram encontrados nas análises de viabilidade polínica em relação aos observados nas análises de Trad-MCN no mês de agosto. O Centro com 81,13% e a Cohab Tarumã com 81,29% foram os que apresentaram as menores taxas de viabilidade polínica no período da seca e o ponto Unic Sul apresentou a maior taxa com 88,59%. O alto índice de efeitos genotóxicos encontrados nas células mães do grão de pólen de T. pallida e da inviabilidade do grão de pólen alerta para a má qualidade do ar no município de Tangará da Serra/MT.

PALAVRAS-CHAVE

genotoxidade, poluição aérea, inflorescência

MICRONUCLEUS AND POLLEN VIABILITY ASSAYS IN *TRADESCANTIA PALLIDA* APPLIED TO THE BIOMONITORING TO AIR QUALITY IN TANGARÁ DA SERRA, MATO GROSSO.

ABSTRACT

The municipality of Tangará da Serra/MT, situated on a transitional region between Amazon Forest and Savannah biomes, is inserted on the aerial pollutants dispersion area generated by the deforestation arc and by the burning of sugar cane which are processed into three sugar mills and alcohol in the region. The atmospheric pollutants issued can

be evaluated by biomonitoring, using plants considered air quality indicators. The research aimed the realization of the bioassay of mutagenicity Trad-MCN and of the pollinic viability through the espontaneous exposition of Tradescantia pallida var. purpurea to the atmospheric air into urban areas of the Tangará da Serra/MT city, into three seasonal periods, between rain period and drought. The research was developed in 2009 with samples collects on march (rainy period) june (period between rain and droughts) and august (dry period). Were demarcated Six monitoring sample points using T. pallida in publicflowerbeds being: Sample Point 01 - Downtown; Sample Point 02 – Sulth Unic University; Sample Point 03 – Dona Julia District; Sample Point 04 – Cohab Tarumã District; Sample Point 05 – North Unic University; Sample Point 06 – White. The inflorescencs were fixated on ethanol and acetic acid in 3:1 proportion in the sample place, and stored in ethanol 70%. The flower buttons were macerated under blade and coloured with Carmine acetic 5%. It was quantified on each blade the total of tetrads, observating the presence or the absence of micronucleous. The frequency of the micronucleous was expressed in percentage, being the total number of micronucleous on 100 tetrads. The same procedure was used for the polinic viability. The results shown that in the intense and moderated rain periods (march and june) occurs low index of micronucleous on the cells in tetrads phase, not showing significant difference between the period of collects and sample points. In the dry period on august month, it were found high index of micronucleous into the tetrads, mainly in the sample point, downtown with 12,44%, North Unic University 10,55% and Cohab Tarumã district 7,77%. Similar results were found on the polinic viability analysis in relation to the observed in the analysis of Trad-MCN on August month. The Downtown with 81,13% and Cohab Tarumã district with 81,29% were those which shown the lower rates of polinic viability during dry period and Sulth Unic University sample point shown rates with 88,59%. The high index of the genotoxic effects found in the mather cells of the grain pollen of T. pallida and of the infeasibility of the pollen grain, alert for the poor quality of the air in the Tangará da Serra/MT municiallity.

KEYWORDS

genotoxicity, air polluent, inflorescence

Introdução

Um dos principais fatores agravantes gerados pelo desenvolvimento humano ao meio ambiente é a poluição aérea (Savóia et al., 2008), causada principalmente pela densidade e aglomeração da população urbana e consequentemente o aumento da frota de carros. Neste contexto o Estado de Mato Grosso, tem apresentado avanço no crescimento econômico, especialmente pelos avanços da agricultura e pecuária, o que promove o aumento da poluição aérea, principalmente pelas queimadas e desmatamento.

O município de Tangará da Serra/MT, localizado numa região de transição entre o bioma Amazônico e o Cerrado, está inserido na área de dispersão dos poluentes atmosféricos gerados pelo arco do desmatamento e pelas queimadas (Ignotti et al., 2007; Rosa et al., 2008). Dentre os poluentes emitidos pela queima de biomassa, pode-se destacar a presença do material particulado, ozônio e dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, compostos cujas propriedades genotóxicas já estão bem relatadas na literatura (Gábelová et al., 2004; Rosa et al., 2008; Meireles et al., 2009; Cabral, 2010).

Altos níveis de poluição urbana têm causado consideráveis efeitos nas condições ambientais e na saúde humana (Who, 2005). Misturas complexas de substâncias orgânicas e inorgânicas presentes na atmosfera em áreas urbanas podem conter substâncias carcinogênicas como o benzeno, material particulado, metais pesados como níquel, cromo e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Skov et al., 2001; Gábelová et al., 2004)

Os poluentes atmosféricos emitidos podem ser avaliados por meio do biomonitoramento, utilizando-se de plantas consideradas indicadoras do mecanismo de formação do grão de pólen (Ma et al., 1994; Klumpp et al., 2006; Misík et al., 2007; Meireles et al., 2009). São espécies de fácil manuseio, baixo custo de cultivo e cuidados, de fácil avaliação e respondem de forma conservativa aos danos causados em seu material genético (Ma et al. 1994; Oliveira et al., 2007; Savóia et al., 2008).

Espécies do gênero *Tradescantia* respondem sensivelmente a bioensaios por apresentarem um grande potencial e capacida-

de de monitoramento dos efeitos mutagênicos.

A espécie *Tradescantia pallida* (Rose) D.R. Hunt var. *purpurea* Boom amplamente utilizada para a ornamentação de jardins urbanos possui alto grau de sensibilidade no seu material genético, tanto quanto os clones do gênero produzidos particularmente para teste genotóxico (Guimarães, 2000). Nos bioensaios de micronúcleos (Trad-MCN) são utilizadas as células mãe do grão de pólen, que tem capacidade de detectar o potencial mutagênico de substâncias químicas e de poluentes aéreos em níveis baixos na atmosfera (Oliveira et Al., 2007; Cabral, 2010).

No bioensaio de micronúcleos os poluentes têm uma ação nas células do botão floral jovem que estão em divisão meiótica. A ação dos poluentes sobre a divisão meiótica resulta na quebra dos cromossomos, que no processo de reparação são considerados partes isoladas, assim, o material que foi segregado é expulso do núcleo celular formando um micronúcleo (Savóia et al., 2008). Outro teste complementar aos de micronúcleo é o de viabilidade polínica que também é considerado efetivo na indicação de genotoxidade, pois, os grãos de pólen permitem que toda mutação letal se manifeste afetando o seu desenvolvimento principalmente pela alteração do tamanho, da forma e da capacidade de coloração (Misík, et al., 2006; 2007).

Tendo em vista a atual situação sócio-ambiental e das perspectivas de crescimento do agronegócio para a região do médio norte do estado e da confiabilidade dos testes Trad-MCN e de viabilidade polínica, o trabalho objetivou a realização do bioensaio de mutagenicidade através da exposição espontânea de *Tradescantia pallida* var. *purpurea* ao ar atmosférico em áreas urbanas da cidade de Tangará da Serra/MT, em três períodos sazonais entre a estação das chuvas e a seca.

Material e métodos

A área de estudo localiza-se na cidade de Tangará da Serra/MT médio norte do Estado de Mato Grosso. Foram demarcados cinco pontos de monitoramento utilizando-se de *Tradescantia pallida* var. *purpurea* em canteiros públicos, e um ponto para a

testemunha, sendo: Ponto 01 – Centro; Ponto 02 – Unic Sul; Ponto 03 – Dona Julia; Ponto 04 – Cohab Tarumã; Ponto 05 – Unic Norte; Ponto 06 – Testemunha (Figura 1).

Foram realizadas três coletas de inflorescências jovens em pré-antese (Figura 2) de *T. pallida* nos meses de março, junho e agosto de 2009 para o teste Trad-MCN. As coletas foram subdivididas de acordo com a sazonalidade ocorrida neste ano, sendo a primeira realizada na estação chuvosa no mês de março, a segunda em período intermediário entre o final da estação chuvosa e o início da seca no mês de junho e a última no período de seca intensa no mês de agosto.

Figura 1 – Localização dos pontos de monitoramento de *Tradescantia pallida* em canteiros públicos da cidade de Tangará da Serra.

Figura 2 – Fases dos botões florais de *Tradescantia pallida*. (A) Inflorescência jovem em condição ideal para realização do teste Trad-MCN. (B) Botão floral em fase de antese utilizado para o teste de viabilidade polínica.

As inflorescências jovens (Figura 2A) em diferentes fases de desenvolvimento foram coletadas num total de aproximadamente vinte hastes, e foram fixadas em etanol:ácido acético na proporção de 3:1 nos locais de coleta, e armazenadas em etanol a 70 % (MA et al. 1994). Os botões florais foram macerados sob lâminas, corados com carmim acético a 5 % e aquecidos por cinco segundos. As lâminas foram observadas em microscópio Coleman® (40x) e os registros fotográficos em uma câmera digital Sony DSC-W110. A análise foi realizada utilizando cinco lâminas por ponto de coleta, num total de 15 lâminas para as três coletas, nos diferentes pontos.

Quantificou-se em cada lâmina o total de tétrades, observando a presença ou a ausência de micronúcleos. A frequência de micronúcleos foi expressa em porcentagem, sendo, o número total de micronúcleos em 100 tétrades. As análises foram realizadas no Laboratório de Genética, localizado no Centro de Pesquisa, Estudos e Desenvolvimento Agro-Ambientais (CPEDA), Campus de Tangará da Serra na Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT).

O delineamento experimental adotado para o teste Trad-MCN foi o inteiramente casualizado (DIC), com análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias, utilizando o teste Tukey ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas pelo programa estatístico Sisvar 4.6. (FERREIRA, 2003), com fatorial 3x6, sendo três estações para seis pontos de monitoramento, com 5 repetições. De cada lâmina foi contado o total de micronúcleos nas células em fase de tétrade.

O teste de viabilidade polínica foi realizado por meio de três coletas de botões florais em pré antese (Figura 2B) de *T. pallida* nos meses de março, junho e agosto de 2009, visando à comparação entre esses três períodos. De cada ponto de monitoramento foram escolhidas 10 plantas ao acaso e coletado um botão floral de cada. Estes foram fixados e preservados conforme o protocolo estabelecido por MA et al. (1994).

As anteras foram maceradas e os grãos de pólen foram expostos e corados com carmim acético a 5% sob lâmina e em seguida observados em microscópio óptico na objetiva de 40X. As

características que foram avaliadas no bioensaio da viabilidade polínica, através do abortamento de grão de pólen foram à forma e a capacidade de coloração Misík et al. (2007).

O delineamento experimental foi o inteiramente casualizado com fatorial 3x6, sendo três estações para seis pontos de monitoramento, com 10 repetições. De cada lâmina foi contado o total de grãos de pólen viáveis e inviáveis. Com os dados obtidos de cada população, calculou-se a percentagem de polens viáveis.

Os dados foram submetidos á análise de variância (ANOVA). Para a comparação entre as médias foi realizado o teste de Tukey ($p < 0,05$) no programa Sisvar 4.6.

Resultados e discussão

As análises de micronúcleos em *T. pallida* realizadas na época da estação chuvosa no mês de março demonstraram um baixo índice de mutagenicidade nas células mães do grão de pólen em fase de tétrade (Figura 3A e B), não apresentando diferenças significativas quanto à presença de micronúcleos nos pontos de coleta (Tabela 1). O baixo índice de eventos mutagênicos encontrados pode ser explicado pelo índice pluviométrico de 465,80 mm ocorrido no mês de março, que lavou a superfície das inflorescências imaturas analisadas (Figura 4).

Nos trabalhos realizados com *T. pallida* por Savóia et al. (2008), observam que os fatores meteorológicos, como as precipitações, devem ser considerados em biomonitoramentos, pois as chuvas diminuem a ação dos agentes genotóxicos nas plantas. Assim, os danos causados a esta espécie não podem ser previstos apenas por traços dos poluentes do ar.

Nas análises realizadas no mês de junho, considerada a fase intermediária entre as estações das chuvas e da seca, não foram observadas diferenças significativas em relação ao mês de março quanto à frequência de micronúcleos.

No entanto, na terceira coleta dos botões florais imaturos de *T. pallida*, no mês de agosto, ao qual na região representa a estação da seca, verificou-se diferenças significativas entre os

pontos de coleta e os períodos, quanto a presença de eventos mutagênicos, sendo os maiores índices de células com a presença de micronúcleos encontrados nos pontos do Centro do município com 12,44%, Unic Norte 10,55% e Cohab Tarumã (7,77%). Observou-se que neste período os efeitos da poluição aérea foram intensos, pois, ocorreu a presença de células mães do grão de pólen com oito micronúcleos, ou seja, com um alto índice de eventos mutagênicos, em que as células perdem o DNA (Figura 3C).

Tabela 1 – Comparação das médias de micronúcleos (%) entre os pontos, por período de coleta, e entre os períodos de coleta por ponto.

Pontos de coleta	Frequência de micronúcleos (%)		
	Períodos de coleta		
	Março	Junho	Agosto
Centro	1,30 aA	2,26 aA	12,44 cB
Unic sul	1,19 aA	1,08 aA	2,30 aA
Dona Julia	0,98 aA	0,75 aA	2,80 abA
Cohab Tarumã	1,10 aA	0,97 aA	7,77 bcB
Unic Norte	1,13 aA	1,64 aA	10,55 cB
Testemunha	0,97 aA	1,17 aA	1,48 aA
Média geral	1,11a	1,31a	6,22b

*Médias seguidas com mesma letra, nas colunas e nas linhas, não diferem entre si, pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$).

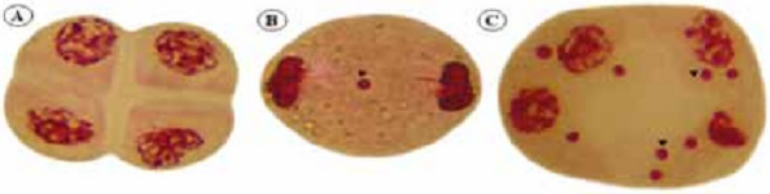


Figura 3 – Células-mãe de grãos de pólen de *Tradescantia pallida* var. purpurea. (A) Célula-mãe em fase de tétrade com ausência de micronúcleo. B) Tétrade apresentando um evento mutacional; (C) Célula mãe do grão de pólen apresentando oito micronúcleos, caracterizando alto índice de eventos mutacionais coletada no ponto Centro da cidade de Tangará da Serra/MT.

Cabe salientar que estes índices de mutações são prejudiciais a saúde da população do município, pois indicam a má qualidade do ar atmosférico neste período de seca, que comumente ocorre no mês de agosto. No entanto, no decorrer deste mês a precipitação foi de 65,40 mm, maior que a observada no mês de junho de 34.40 mm. Assim, pode-se inferir que o acúmulo de material particulado principalmente pelas queimas de biomassa intensificou os eventos mutacionais e consequentemente a quebra de regiões do DNA nas células mães do grão de pólen em *T. pallida*. A queima de cana de açúcar no período da seca é uma prática que contribui no aumento das concentrações de gases e partículas de aerossol na atmosfera da região (Rosa et al., 2008).

A alta frequência de micronúcleos no mês de agosto nos três pontos, que se diferenciaram significativamente dos demais, pode ser explicada basicamente por dois fatores, a proximidade do ponto ao intenso tráfego de veículos e a ocorrência de queimadas, que com a emissão de poluentes intensificou o acúmulo de material particulado nas inflorescências jovens. Ferreira et al., (2003) realizaram testes de genotoxidade em diferentes períodos sazonais, com *T. pallida* na cidade de São Paulo e observaram que na estação de seca, as taxas de eventos mutacionais elevaram-se com diferença significativa em relação aos demais períodos.

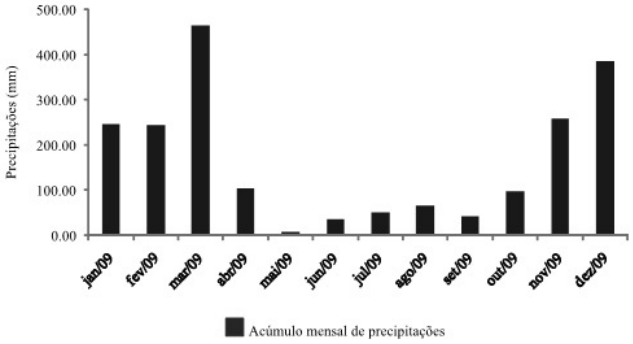


Figura 4 – Índice de precipitação pluviométrica (mm) ocorrido na região de Tangará da Serra/MT no ano de 2009. Fonte: Estação metereológica de Tangará da Serra/MT. Identificador 52, código 01457001.

Vários estudos de mutagenicidade, em áreas urbanas, confirmam a sensibilidade da *T. pallida* para monitoramento de poluentes emitidos por veículos (Carreras et al. 2006; Ferreira et al., 2003; Savóia et al. 2008; Meireles et al., 2009). Os eventos mutacionais foram analisados e quantificados somente nas tétrades, mas foi possível constatar a perda de material genético em outras fases (Figura 3B). Ma et al. (1994) relataram que a partir do momento que ocorre a quebra do material genético é possível a visualização do micronúcleo, independente da fase, mas sugere realizar as análises na fase tétrade (Figura 3A), por ser mais fácil à identificação dos micronúcleos.

Os grãos de pólen de *T. pallida* viáveis constituem-se de células tipicamente embriogênicas, com citoplasma denso e com coloração avermelhada (Figura 5A). O corante carmim acético possui a característica de impregnar parede, citoplasma e o núcleo de células com potencial embriogênico. De acordo com Twell (1995) os grãos de pólen considerados viáveis são os que não possuem alterações estruturais, apresentam citoplasma totalmente corado e distribuído homogeneamente.

Foram encontrados grãos de pólen inviáveis (Figuras 5B e C). Os grãos de pólen considerados inviáveis são os que apresentaram ausência ou redução do citoplasma, coloração fraca ou ausente e estrutura anormal. Sendo que, nesta análise houve interação significativa ao nível de 5% entre as coletas e os pontos de monitoramento.

O resultado obtido das coletas realizadas em março e junho para o teste de viabilidade polínica não apresentaram diferenças significativas entre os pontos de monitoramento (Tabela 2). No mês de agosto (estação de seca), nas análises realizadas, constataram-se diferenças significativas entre os pontos de coleta, mostrando um aumento do índice de pólen inviável e demonstrando os efeitos da poluição aérea na viabilidade polínica de *T. pallida* (Tabela 2). Sendo assim, podemos inferir que a poluição causada pelo trafego de veículos e a queima de biomassa, principalmente da cana de açúcar está afetando a fertilidade da espécie em estudo.

Figura 5 – Morfologias dos grãos de pólen viáveis e inviáveis de *T. pallida*. (A) Grão de pólen viável com o citoplasma corado homogeneamente e ausência de alterações estruturais; (B) Grão de pólen inviável com ausência da coloração do citoplasma e alterações na sua morfologia; (C) Grão de pólen inviável com resquícios de citoplasma corado e alterações estruturais.

Tabela 2 – Comparação das médias de viabilidade polínica (%) entre os pontos, por período de coleta, e entre os períodos de coleta por ponto.

Pontos de coleta	Viabilidade polínica (%)		
	Períodos de coleta		
	Março	Junho	Agosto
Centro	95,42 aA	96,34 aA	81,13 aB
Unic sul	96,91 aA	97,66 aA	88,59 bB
Dona Julia	96,72 aA	97,14 aA	84,87 abB
Cohab Tarumã	94,90 aA	95,00 aA	81,29 aB
Unic Norte	98,41 aA	96,08 aA	86,19 bB
Testemunha	97,88 aA	97,38 aA	93,20 cB
Média geral	96,71a	96,60a	85,88b

*Médias seguidas com mesma letra, nas colunas e nas linhas, não diferem entre si, pelo teste Tukey ($P \leq 0,05$)

As médias gerais de viabilidade polínica obtidas na estação chuvosa e na intermediária nos meses de março e junho foram de 96,71% e 96,60%, respectivamente. Sendo assim, infere-se que apesar da *T. pallida* estar sendo afetada pela poluição aérea nestes períodos, as taxas de viabilidade polínica ainda são consideradas altas (Domingues et al.; 1999; Souza et al., 2002). Na espécie *P. venusta* a alta viabilidade polínica indica o alto poten-

cial de fertilidade dos gametas masculinos (Biondo et al., 2001), o que garante a disponibilidade de grãos de pólen por um longo período de tempo para a polinização da espécie.

O ponto Centro com viabilidade polínica de 81,13%, e o Cohab Tarumã com 81,29% apresentaram as menores taxas de viabilidade polínica no período da seca e o ponto Unic Sul com a maior taxa com 88,59%, desconsiderando a testemunha. As análises do mês de agosto apresentaram diferenças significativas entre os pontos de biomonitoramento. Sendo assim, pode-se inferir que os pontos que apresentaram menor taxa de viabilidade polínica sofreram influência da falta de chuvas, que corroboraram para maior tempo de exposição das plantas ao material particulado emitido por automóveis. A interferência dos agentes genotóxicos e dos fatores climáticos na viabilidade dos grãos de pólen foi observada em espécies silvestres, utilizadas para avaliar áreas industriais e de alto tráfego de veículos em Bratislava, Eslováquia (Misík et al., 2006).

Sendo assim, a diminuição da viabilidade polínica em *T. pallida* pode ser explicada pela baixa incidência das chuvas neste período que colaborou para o acúmulo de material particulado na atmosfera e consequentemente nas plantas *T. pallida*, além da emissão de substâncias complexas orgânicas e inorgânicas, substâncias tóxicas como o benzeno, metais pesados como o níquel, o cromo e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos como observado por Gábelová et al., (2004).

Conclusão

Os resultados mostraram que nos períodos de chuvas intensas e moderadas (março e junho) ocorreu baixo índice de micronúcleos nas células em fase de tétrades, não apresentando diferenças significativas entre os períodos de coleta e os pontos.

No período de seca no mês de agosto foram encontrados altos índices de micronúcleos em tétrades, especialmente nos pontos do Centro com 12,44%, Unic Norte 10,55% e Cohab Tarumã 7,77%.

O resultado obtido para o teste de viabilidade polínica não apresentou diferenças significativas entre os pontos de monitoramento nos meses de março e junho. No mês de agosto constataram-se diferenças significativas entre os pontos de coleta, mostrando o aumento do índice de pólen inviável principalmente no ponto Centro com 81,13 % e demonstrando os efeitos da poluição aérea na viabilidade polínica de *T. pallida*.

Os altos índices encontrados de células com efeitos genotóxicos no mês de agosto são indicativos da má qualidade do ar atmosférico que é prejudicial à saúde da população da cidade de Tangará da Serra/MT.

Referências bibliográficas

BIONDO, A. & BATTISTIN, A. Comparação da eficiência de diferentes corantes na estimativa da viabilidade de grãos de pólen em espécies dos gêneros *Eriosema* (DC.) G. Don e *Rhynchosia* Lour. (Leguminosae – Faboideae) nativas na Região Sul do Brasil. *Bioikos*. vol. 15, n.1, p. 39-44, 2001.

CABRAL T.M. Avaliação dos constituintes e do potencial mutagênico do material particulado oriundo do beneficiamento artesanal da castanha do caju. Tese de Doutorado, Universidade do Estado de São Paulo, USP – São Paulo, Faculdade de Medicina (FM), 2010.

CARRERAS, H. A.; PIGNATAB, M.L.; SALDIVA P.H.N. In situ monitoring of urban air in Córdoba, Argentina using the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) bioassay. *Atmospheric Environmental*, vol. 40, n. 40, p. 7824-7830, 2006.

DOMINGUES, E. T.; TULMANN, N. A. & TEÓFILO, J. S. Viabilidade do pólen em cultivares de laranja doce. *Scientia Agrícola*. São Paulo, vol. 56, n. 2, p. 265-272, 1999.

FERREIRA, D.F. *SISVAR 4. 6 Sistema de Análises Estatísticas*. Lavras: UFLA, 2003.

Ferreira M. I.; Rodrigues G. S.; Domingos M. & Saldiva, P. H. N. *In Situ* Monitoring of Mutagenicity of Air Pollutants in São Paulo City Using *Tradescantia*-SHM Bioassay. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. São Paulo, vol. 46, n. 2, p. 253-258, 2003.

GÁBELOVÁ, A.; VALOVICOVÁ, Z.; HORVÁTHOVÁ, E.; SLAMENOVÁ, D.; BINKOVÁ, B.; SRÁM, R.J. & FARMER, P.B. Genotoxicity of environmental air pollution in three European cities: Prague, Kosice and Sofia. *Mutation Research*, v. 563, p. 49-59, 2004.

GUIMARÃES, E.T.; DOMINGOS, M.; ALVES, E.S.; CALDINI JR.N.; LOBO D.J.A., LICHTENFELS, A.J.F.C. & SALDIVA, P.H.N. Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of Sao Paulo (Brazil) with the Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) bassay. *Environmental and Experimental Botany*, v. 44, n. 1, p. 1-8, 2000.

IGNOTTI, E.; HACON, S.S.; SILVA, A. M. C.; JUNGER, W. L. & IGNOTTI, H. C. Efeitos das queimadas na Amazônia: método dos municípios segundo indicadores de saúde. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. São Paulo, vol. 10, n. 4, p. 453-464, 2007.

KLUMPP, A.; ANSEL, W.; KLUMPP, G.; CALATAYUD, V.; GARREC, J. P.; HE, S.; PEÑUELAS, J.; RIBAS, A.; RO-POULSEN, H.; RASMUSSEN, S. & SANZ, M. J.; VERGNE, F. *Tradescantia* micronucleus test indicates genotoxic potential of traffic emissions in European cities. *Environmental Pollution*. Europa, vol. 139, n. 3, p. 515-522, 2006.

MA, T.; CABRERA, G. L.; CHEN, R.; GILL, B. S., SANDHU, S. S.; VANDENBERG, A. L. & SALAMONE, M. F. *Tradescantia* micronucleus bioassay. *Mutation Research*, vol. 310, n.2, p. 221-230, 1994.

MEIRELES, J.; ROCHA, RO. NETO, A. C. & CERQUEIRA, E. Genotoxic effects of vehicle traffic pollution as evaluated by micronuclei test in tradescantia (Trad-MCN). *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis,* vol. 675, n. 1-2, p. 46-50, 2009.

MISÍK, M.; MICIETA, K.; SOLENSKÁ, M.; MISÍKOVÁ, K.; PISARCÍKOVÁ, H. & KNASMÜLLER, S. In situ monitoring of clastogenicity of ambient air in Bratislava, Slovakia using the *Tradescantia* micronucleus assay and pollen abortion assays. *Mutation Research*. Bratislava, vol. 60, n. 52, p. 1-6, 2006.

MISÍK, M.; MICIETA, K.; SOLENSKÁ, M.; MISÍKOVÁ, K.; PISARCÍKOVÁ, H. & KNASMÜLLER, S. In situ biomonitoring of the genotoxic effects of mixed industrial emissions using the *Tradescantia* micronucleus and pollen abortion tests with wild life plants: Demonstration

of the efficacy of emission controls in an eastern European city. *Environmental Pollution*. Europa, vol. 145, n. 2, p. 459-466, 2007.

OLIVEIRA, D. S.; CRNKOVIC, P. M.; VIANA, V. G. F.; SALDIVA, P. H. N.; DOMINGOS, M. & PAGLIUSO, J. D. Biomonitoramento indoor do potencial mutagênico dos gases provenientes da queima de incenso por meio da avaliação de pêlos estaminais de *Tradescantia*. *Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology*, Brasilia, vol. 2, n. 2, p.173-178, 2007.

ROSA, A. M.; IGNOTTI, E.; HACON, S. S. & CASTRO, H. A. Análise das internações por doenças respiratórias em Tangará da Serra - Amazônia Brasileira. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. São Paulo, vol. 34, n. 8, 575-582, 2008.

SAVÓIA, E. J. L.; DOMINGOS, M.; GUIMARÃES, E. T.; BRUMATI, F. & SALDIVA, P. H. N. Biomonitoring genotoxic risks under the urban weather conditions and polluted atmosphere in Santo André, SP, Brazil, through Trad-MCN bioassay. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. Santo André, vol. 72, n. 1, p. 255-260, 2008.

SOLENSKÁ, M.; MICIETA, K. & MISÍK, M. Plant bioassays for an in situ monitoring of air near an industrial area and a municipal solid waste – Zilina (Slovakia). *Environmental Monitoring and Assessment*. Bratislava, vol. 115, n. 3, p. 499-508, 2008.

SOUZA, M. M.; PEREIRA, T. N. S. & MARTINS, E. R. Microsporogênese e microgametogênese associadas ao tamanho do botão floral e da antera e viabilidade polínica em maracujazeiro-amarelo (P*assiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Degener). *Ciência e Agrotecnologia*. Lavras, vol 26, n. 6, p. 1209-1217, 2002.

SKOV, H.; HANSEN, A.B.; LORENZEN, G.; ANDERSEN, H.V.; LOFSTROM, P. & CHRISTENSEN, C.S. Benzene exposure and the effect of traffic pollution in Copenhagen, Denmark. *Atmospheric Environment*, vol. 35, p. 2463-2471, 2001.

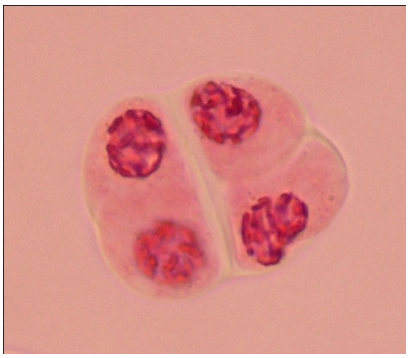
TWELL, D. Diphtheria toxin-mediated cell ablation in developing pollen: vegetative cell ablation blocks generative cell migration. *Protoplasma*, Leicester, vol. 187, n. 4, p. 144-154, 1995.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2005. The effects of air pollution on children's health and development: a review of the evidence. WHO Regional Office for Europe, 185 pp., download from http://www.euro.who.int/airo.

8.2. Prancha de imagens citogenéticas

Células em estágio de tétrade de *Tradescantia pallida*:

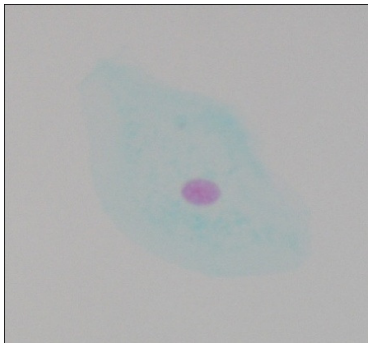
Sem micronúcleo



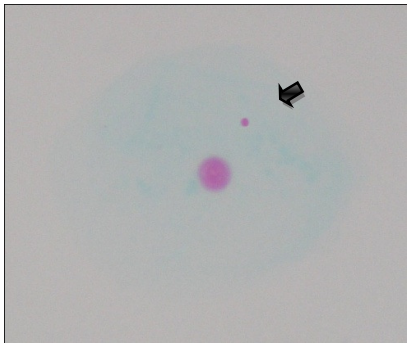
Com micronúcleo

Células esfoliadas de mucosa oral de criança humana:

Sem micronúcleo

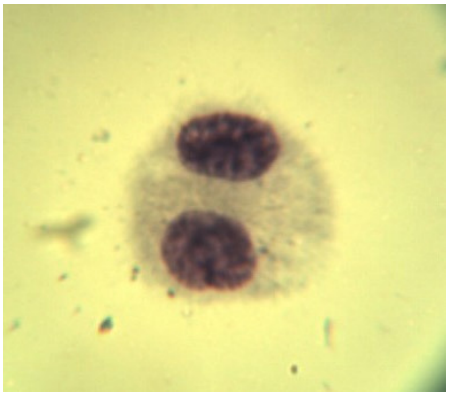


Com micronúcleo

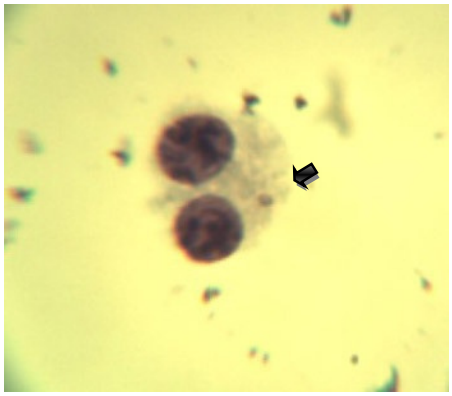


Células binucleadas de fibroblastos de pulmão fetal humano:

Sem micronúcleo



Com micronúcleo



9. REFERENCIAS

1. ARTAXO, P. et al. Physical and chemical properties of aerosols in the wet and dry seasons in Rondônia, Amazonia. J. Geophys. Res., v. 107, p. 8.081-8.095, 2002.

2. FERREIRA, D. A. C.; NOGUEIRA, S. P.; CARNEIRO-FILHO, A.; SOARES-FILHO, B. Mato, grosso até quando? Cienc. Hoje, v. 42, p. 26-31, 2008.

3. MAGALHÃES, D.; BRUNS, R. E.; VASCONCELLOS, P. C. Polycyclic aromatic hydrocarbons as sugarcane burning tracers: a statistical approach. Quim. Nova, v. 30, p. 577-581, 2007.

4. MORAES, M. A. F. D. O mercado de trabalho da agroindústria canavieira: desafios e oportunidades. Econ. Apl., v. 11, n. 4, p. 605-619, 2007.

5. ROSA, A. M.; IGNOTTI, E.; BOTELHO, C.; CASTRO, H. A.; HACON, S. S. Respiratory disease and climatic seasonality in children under 15 years old in a town in the Brazilian Amazon. J. Pediatr., v. 84, p. 543-549, 2008.

6. CONAB. Yield of sugarcane. 2009. Disponível em: < http://www.conab.gov.br/conabweb/ >. Acesso em: 25/06/2009.

7. VASCONCELLOS, P. C. et al. Chemical composition of aerosol collected in the amazon forest. Quim. Nova, v. 21, n. 4, p. 385-393, 1998.

8. ARBEX, M. A.; CANCADO, J. E. D.; PEREIRA, L. A. A.; BRAGA, A. L. F.; SALDIVA, P. H. N. Biomass burning and health effects. J. Bras. Pneumol., v. 30, n. 2, p. 158-175, 2004.

9. BERNSTEIN, J. A. et al. Health effects of air pollution. J. Allergy Clin. Immunol., v. 114, n. 5, p. 1116-1123, 2004.

10. FREITAS, S. R.; LONGO, K. M.; DIAS, M. A. F. S.; DIAS, P. L. S. Emissões de queimadas em ecossistemas da América do Sul. Estud Av, v. 19, n. 53, p. 167-185, 2005.

11. SALDIVA, P. H. et al. Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo, Brazil: a preliminary report. Environ. Res. , v. 50, n. 2, p. 218-225, 1994.

12. BRAGA, A. L. et al. Health effects of air pollution exposure on children and adolescents in Sao Paulo, Brazil. Pediatr. Pulmonol., v. 31, n. 2, p. 106-113, 2001.

13. FARHAT, S. C. et al. Effect of air pollution on pediatric respiratory emergency room visits and hospital admissions. Braz. J. Med. Biol. Res., v. 38, n. 2, p. 227-235, 2005.

14. CANÇADO, J. E. et al. The impact of sugar cane-burning emissions on the respiratory system of children and the elderly. Environ. Health Perspect., v. 114, n. 5, p. 725-729, 2006.

15. ISIDORI, M.; FERRARA, M.; LAVORGNA, M.; NARDELLI, A.; PARRELLA, A. In situ monitoring of urban air in Southern Italy with the tradescantia micronucleus bioassay and semipermeable membrane devices (SPMDs). Chemosphere, v. 52, n. 1, p. 121-126, 2003.

16. MA, T. H. et al. Tradescantia-Micronucleus (Trad-MCN) tests on 140 health-related agents. Mutat. Res., v. 138, n. 2-3, p. 157-167, 1984.

17. CLAXTON, L. D.; MATTHEWS, P. P.; WARREN, S. H. The genotoxicity of ambient outdoor air, a review: Salmonella mutagenicity. Mutat. Res., v. 567, n. 2-3, p. 347-399, 2004.

18. ELASSOULI, S. M.; ALQAHTANI, M. H.; MILAAT, W. Genotoxicity of air borne particulates assessed by comet and the Salmonella mutagenicity test in Jeddah, Saudi Arabia. Int. J. Environ. Res. Public Health, v. 4, n. 3, p. 216-233, 2007.

19. CORONAS, M. V.; HORN, R. C.; DUCATTI, A.; ROCHA, J. V.; VARGAS, V. M. Mutagenic activity of airborne particulate matter in a petrochemical industrial area. Mutat. Res., v. 650, n. 2, p. 196-201, 2008.

20. 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. Environ. Mol. Mutagen., v. 49, n. 4, p. 249-255, 2008.

21. MENG, Z.; ZHANG, Q. Damage effects of dust storm PM2.5 on DNA in alveolar macrophages and lung cells of rats. Food Chem Toxicol, v. 45, n. 8, p. 1368-74, 2007.

22. ZHAO, X. H.; WANG, X. L.; LI, X. Y. Automobile exhaust particle-induced apoptosis and necrosis in MRC-5 cells. Toxicol. Lett., v. 122, n. 1, p. 103-110, 2001.

23. SUDAM. Lei 1.806/1953 - Criação da Amazônia Legal. Brasilia: Brasil 1953.

24. SUDAM. Amazônia Legal. Brasilia, 2008. Disponível em: < http://www.ada.gov.br/ >. Acesso em: 01/06/2008.

25. INPE. Queimadas: Monitoramento de Foco. 2009. Disponível em: < http://sigma.cptec.inpe.br/queimadas/ >. Acesso em: 23/08/2009.

26. BRASIL. Departamento de cana de açúcar e agroenergia. 2008. Disponível em: < http://www.agricultura.gov.br/ >. Acesso em: 01/09/2008

27. FIESP. Balanço Nacional da Cana de açúcar e da energia. 2008. Disponível em: < http://www.fiesp.com.br >. Acesso em: 01/09/2008.

28. PREFEITURA. A cidade. Tangará da Serra/MT, 2008. Disponível em: < http://www.tangaradaserra.mt.gov.br/ >. Acesso em: 01/09/2008.

29. CANASAT. Sugarcane crop mapping in Brazil by Earth observing satellite images., 2009. Disponível em: < http://www.dsr.inpe.br/mapdsr/ >. Acesso em: 01/08/2009.

30. JÚNIOR, R. P. S. Embrapa estuda comportamento ambiental de agrotóxicos em áreas com cana-de-açúcar. Dourados/MS, 2009. Disponível em: < www.agrosoft.org.br/agropag/212703.htm >. Acesso em: 28/02/2012.

31. DELMAS, R.; LACAUX, J. P.; BROCARD, D. Determination of biomass burning emission factors: methods and results. Environ Monit Assess v. 38, p. 181-204, 1995.

32. BREYSSE, P. A. Health hazards of smoke. Journ of Forestry**,** v. 82 p. 89, 1984.

33. ARTAXO, P.; LARA, L. B. L. S.; PAULIQUEVIS, T. M. Dry and wet deposition in Amazonia: from natural biogenic aerosols to biomass burning impacts. IGAC Newsletter**,** v. 27, p. 12-16, 2003.

34. CORMIER, S. A.; LOMNICKI, S.; BACKES, W.; DELLINGER, B. Origin and health impacts of emissions of toxic by-products and fine particles from combustion and thermal treatment of hazardous wastes and materials. Environ Health Perspect**,** v. 114, n. 6, p. 810-7, 2006.

35. DONALDSON, K.; STONE, V.; SEATON, A.; MACNEE, W. Ambient particle inhalation and the cardiovascular system: potential mechanisms. Environ Health Perspect**,** v. 109 Suppl 4, p. 523-7, 2001.

36. SEATON, A.; MACNEE, W.; DONALDSON, K.; GODDEN, D. Particulate air pollution and acute health effects. Lancet**,** v. 345, n. 8943, p. 176-8, 1995.

37. POPE, C. A., 3RD. Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: biologic mechanisms and who's at risk? Environ Health Perspect**,** v. 108 Suppl 4, p. 713-23, 2000.

38. EPA, U. Particulate Matter Research Needs for Human Health Risk Assessment to Support Future Reviews of the National Ambient Air Quality Standards for Particulate matter. 1998. Disponível em: < http://www.epa.gov/ >. Acesso em: 02/06/2008.

39. GRAUER, A.; PUGLIELLI, A. T. Relatório da qualidade do ar na região metropolitana de Curitiba. PARANÁ, I. A. D.: Curitiba**:** 63 p. 2003.

40. EPA. Particulate Matter. 2011. Disponível em: < http://www.epa.gov/ >. Acesso em: 12/12/2011.

41. ALVES, N. O. Genotoxicidade e composição do material particulado emitido pela queima de biomassa: Um estudo de caso em Tangará da Serra, região da Amazônia brasileira. 2010. 76 doctoral dissertation Biochemistry Department, UFRN, Nata/Brazil.

42. ELDER, A.; VIDYASAGAR, S.; DELOUISE, L. Physicochemical factors that affect metal and metal oxide nanoparticle passage across epithelial barriers. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**,** v. 1, n. 4, p. 434-450, 2009.

43. BRUCE, N.; PEREZ-PADILLA, R.; ALBALAK, R. Indoor air pollution in developing countries: a major environmental and public health challenge. Bull. World. Health. Organ.**,** v. 78, n. 9, p. 1078-1092, 2000.

44. GONZALEZ-FLECHA, B. Oxidant mechanisms in response to ambient air particles. Mol Aspects Med**,** v. 25, n. 1-2, p. 169-82, 2004.

45. LANGOWSKI, E. Queima da cana de açúcar - Prática usada e abusada. 2007. Disponível em: < http://www.apromac.org.br/ >. Acesso em: 24/08/2008.

46. SZMRECSATYI, T. Tecnologia e degradação ambiental: o caso da agroindústria canavieira no Estado de São Paulo. Revista Informações Econômicas**,** v. 24, n. 10, p. 73-82, 1994.

47. IARMARCOVAI, G.; BONASSI, S.; BOTTA, A.; BAAN, R. A.; ORSIERE, T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: a review of the literature. Mutat Res**,** v. 658, n. 3, p. 215-33, 2008.

48. CHORVATOVICOVA, D.; HOET, P. H.; TATRAI, E.; KOVACIKOVA, Z. Ozone-induced micronuclei frequency in rat alveolar Type II cells. Physiol Res**,** v. 49, n. 6, p. 733-6, 2000.

49. ABBAS, I. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons within airborne particulate matter (PM(2.5)) produced DNA bulky stable adducts in a human lung cell coculture model. J Appl Toxicol, 2011.

50. PAHO. Assessment of health effects of ambient air pollution in Latin America and the Caribbean. Washington DC: Pan American Health Organization, 2005. 70 Disponível em: < http://www.bvsde.paho.org/bvsea/fulltext/contaminacion/indice.pdf >. Acesso em: 01/09/2009.

51. ANDERSON, H. R.; PONCE DE LEON, A.; BLAND, J. M.; BOWER, J. S.; STRACHAN, D. P. Air pollution and daily mortality in London: 1987-92. BMJ**,** v. 312, n. 7032, p. 665-669, 1996.

52. RUMEL, D.; RIEDEL, L. F.; LATORRE MDO, R.; DUNCAN, B. B. Myocardial infarct and cerebral vascular disorders associated with high temperature and carbon monoxide in a metropolitan area of southeastern Brazil. Rev. Saude Publica**,** v. 27, n. 1, p. 15-22, 1993.

53. POPE, C. A.; DOCKERY, D. W.; SPENGLER, J. D.; RAIZENNE, M. E. Respiratory health and PM10 pollution. A daily time series analysis. Am Rev Respir Dis**,** v. 144, n. 3 Pt 1, p. 668-74, 1991.

54. WOODRUFF, T. J. et al. Trends in environmentally related childhood illnesses. Pediatrics**,** v. 113, n. 4 Suppl, p. 1133-40, 2004.

55. MASCARENHAS, M. D. M. et al. Anthropogenic air pollution and respiratory disease-related emergency room visits in Rio Branco, Brazil - September, 2005. J. Bras. Pneumol.**,** v. 34, p. 42-46, 2008.

56. KAMPA, M.; CASTANAS, E. Human health effects of air pollution. Environ Pollut**,** v. 151, n. 2, p. 362-7, 2008.

57. SALDIVA, P. H. et al. Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in Sao Paulo, Brazil. Arch. Environ. Health**,** v. 50, n. 2, p. 159-163, 1995.

58. BRAGA, A. L.; PEREIRA, L. A.; PROCOPIO, M.; ANDRE, P. A.; SALDIVA, P. H. N. Association between air pollution and respiratory and cardiovascular diseases in Itabira, Minas Gerais State, Brazil. Cad. Saude Publica**,** v. 23 Suppl 4, p. S570-S578, 2007.

59. CANÇADO, J. E. et al. Clinical repercussions of exposure to atmospheric pollution. J Bras Pneumol**,** v. 32 Suppl 2, p. S5-11, 2006.

60. RIBEIRO, H. Queima de cana-de-açúcar no Brasil: efeitos à saúde respiratória. Rev. Saúde Pública**,** v. 42, n. 2, p. 370-376, 2008.

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

62. ARBEX, M. A. et al. Air pollution from biomass burning and asthma hospital admissions in a sugar cane plantation area in Brazil. J. Epidemiol. Community Health**,** v. 61, n. 5, p. 395-400, 2007.

63. EVANS, H. J.; NEARY, G. J.; WILLIAMSON, F. S. The relative biological efficiency of single doses of fast neutrons and gamma-rays on Vicia faba roots and the effect of oxygen. Part II. Chromosone damage: the production of micronuclei. Int. J. Radiat. Biol.**,** v. 1, p. 216-229, 1959.

64. MAJER, B. J.; LAKY, B.; KNASMULLER, S.; KASSIE, F. Use of the micronucleus assay with exfoliated epithelial cells as a biomarker for monitoring individuals at elevated risk of genetic damage and in chemoprevention trials. Mutat Res**,** v. 489, n. 2-3, p. 147-172, 2001.

65. BATALHA, J. R. F. et al. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the Tradescantia micronuclei assay. Mutat Res**,** v. 426, n. 2, p. 229-232, 1999.

66. GUIMARAES, E. T. et al. Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of Sao Paulo (Brazil) with the Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) assay. Environ. Exp. Bot.**,** v. 44, n. 1, p. 1-8, 2000.

67. HEDDLE, J. A. et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutat. Res., v. 123, n. 1, p. 61-118, 1983.

68. EVANS, H. J. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. Mutat. Res., v. 392, n. 1-2, p. 5-10, 1997.

69. FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. Mutat Res, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

70. UNDERBRINK, A. G.; SCHAIRER, L. A.; SPARROW, A. H. The biophysical properties of 3.9-GeV nitrogen ions. V. Determinations of the relative biological effectiveness for somatic mutations in Tradescantia. Radiat. Res., v. 55, n. 3, p. 437-446, 1973.

71. SPARROW, A. H.; SCHWEMMER, S. S.; THOMPSON, K. H. Radiosensitivity studies with woody plants. III. Predictions of limits of probable acute and chronic LD50 values from lognormal distributions of interphase chromosome volumes in gymnosperms. Radiat. Res., v. 65, n. 2, p. 315-326, 1976.

72. SCHAIRER, L. A.; VAN'T HOF, J.; HAYES, C. G.; BURTON, R. M.; DE SERRES, F. J. Exploratory monitoring of air pollutants for mutagenicity activity with the Tradescantia stamen hair system. Environ. Health. Perspect., v. 27, p. 51-60, 1978.

73. VAN'T HOF, J.; SCHAIRER, L. A. Tradescantia assay system for gaseous mutagens. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. Mutat. Res., v. 99, n. 3, p. 303-15, 1982.

74. GUIMARAES, E. T.; MACCHIONE, M.; LOBO, D. J.; DOMINGOS, M.; SALDIVA, P. H. Evaluation of the mutagenic potential of urban air pollution in Sao Paulo, Southeastern Brazil, using the Tradescantia stamen-hair assay. Environ. Toxicol., v. 19, n. 6, p. 578-584, 2004.

75. CARVALHO-OLIVEIRA, R. et al. Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in Sao Paulo, Brazil. Environ. Res., v. 98, n. 1, p. 1-7, 2005.

76. KLUMPP, A. et al. Tradescantia micronucleus test indicates genotoxic potential of traffic emissions in European cities. Environ. Pollut., v. 139, n. 3, p. 515-522, 2006.

77. LUIZ, E. J. Biomonitoramento da qualidade do ar em Santo André. LAVENDOWSKI, I. M. F.;OLIVEIRA, G. P., *et al*. Santo André/SP: SEMASA 2008.

78. SILVA, M. D. Delimitação do potencial de plantas de *Tradescantia pallida* cv. Pupurea cultivadas na cidade de São Paulo par indicadores de riscos clastogênicos impostos pela poluição aérea. 2005. 69 Tese de doutorado Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo - USP, São Paulo.

79. CARRERAS, H. A.; PIGNATA, M. L.; SALDIVA, P. H. N. In situ monitoring of urban air in Córdoba, Argentina using the Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) bioassay. Atmos Environ**,** v. 40, n. 40, p. 7824-7830, 2006.

80. SAVÓIA, E. J.; DOMINGOS, M.; GUIMARAES, E. T.; BRUMATI, F.; SALDIVA, P. H. N. Biomonitoring genotoxic risks under the urban weather conditions and polluted atmosphere in Santo Andre, SP, Brazil, through Trad-MCN bioassay. Ecotoxicol. Environ. Saf.**,** v. 72, n. 1, p. 255-260, 2009.

81. RUIZ, E. F.; RABAGO, V. M.; LECONA, S. U.; PEREZ, A. B.; MA, T. H. Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) bioassay on clastogenicity of wastewater and in situ monitoring. Mutat. Res.**,** v. 270, n. 1, p. 45-51, 1992.

82. KIM, J. K.; SHIN, H. S.; LEE, J. H.; LEE, J. J.; LEE, J. H. Genotoxic effects of volatile organic compounds in a chemical factory as evaluated by the Tradescantia micronucleus assay and by chemical analysis. Mutat Res**,** v. 541, n. 1-2, p. 55-61, 2003.

83. SANTOS, I. T. Q. P. Avaliacão da atividade clastogênica do resíduo catalítico industrial, por meio do bioensaio de micronúcleo com *Tradescantia pallida* cv. Purpurea. 2004. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo - USP, São Paulo.

84. MISIK, M. et al. In situ biomonitoring of the genotoxic effects of mixed industrial emissions using the Tradescantia micronucleus and pollen abortion tests with wild life plants: demonstration of the efficacy of emission controls in an eastern European city. Environ. Pollut.**,** v. 145, n. 2, p. 459-466, 2007.

85. FOMIN, A.; HAFNER, C. Evaluation of genotoxicity of emissions from municipal waste incinerators with Tradescantia mocronucleus bioassay (Trad-MCN). Mutat. Res.**,** v. 414, p. 139-148, 1998.

86. ALVES, E. S.; PEDROSO, A. N. V.; DOMINGOS, M.; GUIMARÃES, E. T.; SALDIVA, P. H. N. Biomonitoramento indoor do potencial mutagênico do ar em laboratórios e herbário do Instituto de Botânica por meio do bioensaio Trad-MCN. Hoehnea.**,** v. 30, n. 2, p. 89-94, 2003.

87. ALVES, E. S.; DE SOUZA, S. R.; PEDROSO, A. N. V.; DOMINGOS, M. Potential of the Trad-MCN assay applied with inflorescences of *Tradescantia pallida* 'Purpurea' for evaluating air contamination by naphthalene. Ecotoxicol. Environ. Saf.**,** v. 71, n. 3, p. 717-721, 2008.

88. SUYAMA, F. et al. Pollen mother cells of Tradescantia clone 4430 and Tradescantia pallida var. purpurea are equally sensitive to the clastogenic effects of X-rays. Braz J Med Biol Res**,** v. 35, n. 1, p. 127-9, 2002.

89. MINOUFLETA, M.; AYRAULTB, S.; BADOTC, P. M.; COTELLEA, S.; FERARD, J. F. Assessment of the genotoxicity of 137Cs radiation using Vicia-micronucleus, Tradescantia-micronucleus and Tradescantia-stamen-hair mutation bioassays. J. Environ. Radioactivity**,** v. 81, p. 143-153, 2005.

90. RODRIGUES, G. S.; MADKOURS, S. A.; WEINSTEIN, L. H. Genotoxic activity of ozone in Tradescantia. Environmental and Experimental Botany**,** v. 36, n. 1, p. 45-50, 1996.

91. GONG, P.; KUPERMAN, R. G.; SUNAHARA, G. I. Genotoxicity of 2,4- and 2,6-dinitrotoluene as measured by the Tradescantia micronucleus (Trad-MCN) bioassay. Mutat Res**,** v. 538, n. 1-2, p. 13-8, 2003.

92. LAH, B. et al. Genotoxicity evaluation of water soil leachates by Ames test, comet assay, and preliminary Tradescantia micronucleus assay. Environ Monit Assess**,** v. 139, n. 1-3, p. 107-18, 2008.

93. MOHAMMED, K. B.; MA, T. H. Tradescantia-micronucleus and -stamen hair mutation assays on genotoxicity of the gaseous and liquid forms of pesticides. Mutat. Res.**,** v. 426, n. 2, p. 193-199, 1999.

94. HOLLAND, N. et al. The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: the HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. Mutat Res**,** v. 659, n. 1-2, p. 93-108, 2008.

95. NERI, M. et al. Micronuclei frequency in children exposed to environmental mutagens: a review. Mutat Res**,** v. 544, n. 2-3, p. 243-254, 2003.

96. DECORDIER, I. et al. Genetic susceptibility of newborn daughters to oxidative stress. Toxicol. Lett.**,** v. 172, n. 1-2, p. 68-84, 2007.

97. SAILAJA, N. et al. Genotoxic evaluation of workers employed in pesticide production. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**,** v. 609, n. 1, p. 74-80, 2006.

98. PASTOR, S.; GUTIÉRREZ, S.; CREUS, A.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; MARCOS, R. Micronuclei in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of Polish farmers exposed to pesticides. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**,** v. 495, n. 1-2, p. 147-156, 2001.

99. GÓMEZ-ARROYO, S.; DÍAZ-SÁNCHEZ, Y.; MENESES-PÉREZ, M. A.; VILLALOBOS-PIETRINI, R.; DE LEÓN-RODRÍGUEZ, J. Cytogenetic biomonitoring in a Mexican floriculture worker group exposed to pesticides. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**,** v. 466, n. 1, p. 117-124, 2000.

100. LUCERO, L. et al. Cytogenetic biomonitoring of Spanish greenhouse workers exposed to pesticides: micronuclei analysis in peripheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**,** v. 464, n. 2, p. 255-262, 2000.

101. GOUD, K. I.; HASAN, Q.; BALAKRISHNA, N.; RAO, K. P.; AHUJA, Y. R. Genotoxicity evaluation of individuals working with photocopying machines. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**,** v. 563, n. 2, p. 151-158, 2004.

102. CARVALHO, H. A. A Tradescantia como bioindicador vegetal na monitoração dos efeitos clastogênicos das radiações ionizantes. Radiol. Bras. **,** v. 38, n. 6, p. 459-462, 2005.

103. HEUSER, V. D.; ERDTMANN, B.; KVITKO, K.; ROHR, P.; DA SILVA, J. Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. Toxicology**,** v. 232, n. 3, p. 235-247, 2007.

104. TORRES-BUGARÍN, O. et al. Determination of diesel genotoxicity in firebreathers by micronuclei and nuclear abnormalities in buccal mucosa. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**,** v. 413, n. 3, p. 277-281, 1998.

105. KARAHALIL, B.; KARAKAYA, A. E.; BURGAZ, S. The micronucleus assay in exfoliated buccal cells: application to occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**,** v. 442, n. 1, p. 29-35, 1999.

106. SURRALLES, J. et al. Molecular cytogenetic analysis of buccal cells and lymphocytes from benzene-exposed workers. Carcinogenesis**,** v. 18, n. 4, p. 817-23, 1997.

107. CELIK, A.; CAVAS, T.; ERGENE-GOZUKARA, S. Cytogenetic biomonitoring in petrol station attendants: micronucleus test in exfoliated buccal cells. Mutagenesis**,** v. 18, n. 5, p. 417-21, 2003.

108. SPEIT, G.; SCHMID, O. Local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by the micronucleus test with exfoliated epithelial cells. Mutation Research/Reviews in Mutation Research**,** v. 613, n. 1, p. 1-9, 2006.

109. SPEIT, G.; SCHMID, O.; FRÖHLER-KELLER, M.; LANG, I.; TRIEBIG, G. Assessment of local genotoxic effects of formaldehyde in humans measured by the micronucleus test with exfoliated buccal mucosa cells. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**,** v. 627, n. 2, p. 129-135, 2007.

110. YADAV, A. S.; SHARMA, M. K. Increased frequency of micronucleated exfoliated cells among humans exposed in vivo to mobile telephone radiations. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**,** v. 650, n. 2, p. 175-180, 2008.

111. SUHAS, S.; GANAPATHY, K. S.; GAYATRIDEVI; RAMESH, C. Application of the micronucleus test to exfoliated epithelial cells from the oral cavity of beedi smokers, a high-risk group for oral cancer. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**,** v. 561, n. 1-2, p. 15-21, 2004.

112. WU, P.-A. et al. Clastogenic effect for cigarette smoking but not areca quid chewing as measured by micronuclei in exfoliated buccal mucosal cells. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**,** v. 562, n. 1-2, p. 27-38, 2004.

113. BLOCHING, M.; HOFMANN, A.; LAUTENSCHLÄGER, C.; BERGHAUS, A.; GRUMMT, T. Exfoliative cytology of normal buccal mucosa to predict the relative risk of cancer in the upper aerodigestive tract using the MN-assay. Oral Oncology**,** v. 36, n. 6, p. 550-555, 2000.

114. REIS, S. R.; DO ESPIRITO SANTO, A. R.; ANDRADE, M. G.; SADIGURSKY, M. Cytologic alterations in the oral mucosa after chronic exposure to ethanol. Braz Oral Res**,** v. 20, n. 2, p. 97-102, 2006.

115. BLOCHING, M.; REICH, W.; SCHUBERT, J.; GRUMMT, T.; SANDNER, A. Micronucleus rate of buccal mucosal epithelial cells in relation to oral hygiene and dental factors. Oral Oncology**,** v. 44, n. 3, p. 220-226, 2008.

116. TORRES-BUGARÍN, O. et al. Evaluation of cisplatin + 5-FU, carboplatin + 5-FU, and ifosfamide + epirubicine regimens using the micronuclei test and nuclear abnormalities in the buccal mucosa. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**,** v. 565, n. 1, p. 91-101, 2004.

117. TITENKO-HOLLAND, N.; JACOB, R. A.; SHANG, N.; BALARAMAN, A.; SMITH, M. T. Micronuclei in lymphocytes and exfoliated buccal cells of postmenopausal women with dietary changes in folate. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**,** v. 417, n. 2-3, p. 101-114, 1998.

118. CHEN, C. et al. Cytogenetic damage in buccal epithelia and peripheral lymphocytes of young healthy individuals exposed to ozone. Mutagenesis**,** v. 21, n. 2, p. 131-137, 2006.

119. REVAZOVA, J. et al. Cytogenetic investigation of women exposed to different levels of dioxins in Chapaevsk town. Chemosphere**,** v. 43, n. 4-7, p. 999-1004, 2001.

120. BASU, A. et al. Enhanced frequency of micronuclei in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. Mutat Res**,** v. 516, n. 1-2, p. 29-40, 2002.

121. MARTÍNEZ, V. et al. Micronuclei assessment in buccal cells of people environmentally exposed to arsenic in northern Chile. Toxicology Letters**,** v. 155, n. 2, p. 319-327, 2005.

122. MONTERO, R. et al. Metabolic polymorphisms and the micronucleus frequency in buccal epithelium of adolescents living in an urban environment. Environ Mol Mutagen**,** v. 42, n. 3, p. 216-22, 2003.

123. IURCHENKO, V. V. et al. Buccal epithelial micronuclear test in the comprehensive assessment of children's ecological well-being in Moscow. Gig Sanit, n. 6, p. 83-6, 2007.

124. ZÚÑIGA-GONZÁLEZ, G. M. et al. Micronuclei in diabetes: Folate supplementation diminishes micronuclei in diabetic patients but not in an animal model. Mutation

Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**,** v. 634, n. 1-2, p. 126-134, 2007.

125. THOMAS, P.; HARVEY, S.; GRUNER, T.; FENECH, M. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. Mutat Res**,** v. 638, n. 1-2, p. 37-47, 2008.

126. ÜNAL, M. et al. Cytogenetic biomonitoring in children with chronic tonsillitis: Micronucleus frequency in exfoliated buccal epithelium cells. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**,** v. 69, n. 11, p. 1483-1488, 2005.

127. CARVALHO, M. C.; BARCA, F. N.; AGNEZ-LIMA, L. F.; BATISTUZZO DE MEDEIROS, S. R. Evaluation of mutagenic activity in an extract of pepper tree stem bark (*Schinus terebinthifolius* Raddi). Environ. Mol. Mutagen.**,** v. 42, n. 3, p. 185-191, 2003.

128. VARELA-BARCA, F. N.; AGNEZ-LIMA, L. F.; BATISTUZZO DE MEDEIROS, S. R. Base excision repair pathway is involved in the repair of lesions generated by flavonoid-enriched fractions of pepper tree (*Schinus terebinthifolius*, Raddi) stem bark. Environ. Mol. Mutagen.**,** v. 48, n. 8, p. 672-681, 2007.

129. CUPPLES, C. G.; MILLER, J. H. A set of lacZ mutations in *Escherichia coli* that allow rapid detection of each of the six base substitutions. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**,** v. 86, n. 14, p. 5345-5349, 1989.

130. MILLER, J. H. A short course in bacterial genetics. New York: Cold spring Harbor Laboratory Press, 1992.

131. FRIEDBERG, E. C.; WALTER, G. C.; SIEDE, W. Feeding of potato tomato and eggplant alkaloids effects food consumption and body and liver weights in mice. J. Nutr.**,** v. 126, p. 989-999, 1995.

132. MICHAELS , M. L.; CRUZ, C.; GROLLMAN, A. P.; MILLER, J. H. Evidence that MutY and MutM combine to prevent mutations by an oxidatively damaged form of guanine in DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**,** v. 89, p. 7022-7025, 1992.

133. PETTA, T. B.; BATISTUZZO DE MEDEIROS, S. R.; EGITO, E. S.; AGNEZ-LIMA, L. F. Genotoxicity induced by saponified coconut oil surfactant in prokaryote systems. Mutagenesis**,** v. 19, n. 6, p. 441-444, 2004.

134. SANTOS, F. V.; COLUS, I. M.; SILVA, M. A.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Assessment of DNA damage by extracts and fractions of *Strychnos pseudoquina*, a Brazilian medicinal plant with antiulcerogenic activity. Food Chem. Toxicol.**,** v. 44, n. 9, p. 1585-1589, 2006.

135. SISENANDO, H. A.; MACEDO, M. F.; SATURNINO, A. C.; COELHO, L. C.; DE MEDEIROS, S. R. Evaluation of the genotoxic potential of Bauhinia monandra leaf lectin (BmoLL). Food Chem Toxicol**,** v. 47, n. 2, p. 303-8, 2009.

136. INMET. Instituto Nacional de Metrologia. 2008. Disponível em: < http://www.inmet.gov.br/ >. Acesso em: 01/11/2008.

137. IBGE. Brazilian institute of geography and statistics - Cidades@. 2009. Disponível em: < http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1 >. Acesso em: 01/06/2009.

138. ROSA, A. M.; IGNOTTI, E.; HACON, S. S.; CASTRO, H. A. Analysis of hospitalizations for respiratory diseases in Tangará da Serra, Brazil. J. Bras. Pneumol., v. 34, p. 575-582, 2008.

139. PREFEITURA. Cidade. Tangará da Serra/MT, 2007. Disponível em: < http://www.tangaradaserra.mt.gov.br/ >. Acesso em: 01/02/2008.

140. SISAM. Environmental Information System. 2009. Disponível em: < http://pussua.cptec.inpe.br/msaude/ >. Acesso em: 02/11/2009.

141. FREITAS, S. R. et al. The Coupled Aerosol and Tracer Transport model to the Brazilian developments on the Regional Atmospheric Modeling System (CATT-BRAMS). Part 1: Model description and evaluation. Atmos Chem Phys, v. 9, p. 2843-2861, 2009.

142. FREITAS, S. R. et al. A convective kinematic trajectory technique for low-resolution atmospheric models. J Geophys Res, v. 105, p. 375-386, 2000.

143. ROLIM, L. A. et al. Genotoxicity evaluation of Moringa oleifera seed extract and lectin. J Food Sci, v. 76, n. 2, p. T53-8, 2011.

144. EASTMOND, D. A.; TUCKER, J. D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis-blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. Environ Mol Mutagen, v. 13, n. 1, p. 34-43, 1989.

145. MA, T. H. et al. Tradescantia micronucleus bioassay. Mutat. Res., v. 310, n. 2, p. 221-230, 1994.

146. FENECH, M. The cytokinesis-block micronucleus technique: a detailed description of the method and its application to genotoxicity studies in human populations. Mutat. Res., v. 285, n. 1, p. 35-44, 1993.

147. STICH, H. F.; CURTIS, J. R.; PARIDA, B. B. Application of the micronucleus test to exfoliated cells of high cancer risk groups: tobacco chewers. Int. J. Cancer, v. 30, n. 5, p. 553-9, 1982.

148. FEULGEN, R.; RESSENBERCK, H. Mikroskopisch chemischer nachweis einer nucleinsaure von typus der thymonucleinsaure und die darauf bertehende elective farbung von zellhernen in ikroskopischen praparate. . Z. Physiol. Chem., v. 135, p. 230-248, 1924.

149. TOLBERT, P. E.; SHY, C. M.; ALLEN, J. W. Micronuclei and other nuclear anomalies in buccal smears: methods development. Mutat. Res., v. 271, n. 1, p. 69-77, 1992.