



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Impacto da queima de biomassa na concentração de compostos policíclicos aromáticos e na toxicidade *in vitro* do material particulado atmosférico de Ribeirão Preto-SP”**

Caroline Scaramboni

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2023



Universidade de São Paulo  
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
Departamento de Química  
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Impacto da queima de biomassa na concentração de compostos policíclicos aromáticos  
e na toxicidade *in vitro* do material particulado atmosférico de Ribeirão Preto-SP”**

**Versão corrigida**

Caroline Scaramboni

Orientadora: Maria Lúcia Arruda de Moura Campos

Coorientador: Daniel Junqueira Dorta

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São  
Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título  
de Doutora em Ciências, Área: **Química**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

## FICHA CATALOGRÁFICA

Scaramboni, Caroline

Impacto da queima de biomassa na concentração de compostos policíclicos aromáticos e na toxicidade *in vitro* do material particulado atmosférico de Ribeirão Preto-SP. Ribeirão Preto, 2023.  
172 p. : il. ; 30cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química. Versão corrigida.

Orientadora: Campos, Maria Lúcia Arruda de Moura.

Coorientador: Dorta, Daniel Junqueira

1. HPA. 2. Reteno. 3. Levoglucosano. 4. Células HepG2.
5. Genotoxicidade. 6. Poluição do ar.

Nome: SCARAMBONI, Caroline

Título: Impacto da queima de biomassa na concentração de compostos policíclicos aromáticos e na toxicidade *in vitro* do material particulado atmosférico de Ribeirão Preto-SP

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,  
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São  
Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título  
de Doutora em Ciências, Área: **Química**

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_



## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho especialmente à minha orientadora Lúcia, aquela que acreditou em mim desde o começo, e que nesses onze anos juntas me ensinou muito!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças e iluminar o meu caminho, estando sempre ao meu lado.

A minha família pelo amor, paciência e confiança que me ofereceram durante toda a minha vida. Ao meu futuro esposo, Éric, amor da minha vida, obrigada por todo carinho, suporte e incentivo durante esses anos.

Neste trabalho tive vários orientadores, pessoas incríveis que não só transferiram conhecimento para mim, mas criaram possibilidades para que eu andasse com as minhas próprias pernas e produzisse esta tese. Assim agradeço a cada um deles:

À Professora Lúcia, minha orientadora principal e minha amiga, por compartilhar suas ideias, sugestões e apoio incondicional.

Ao Professor Daniel Dorta, meu coorientador, por ter acreditado em nosso projeto e aberto as portas de seu laboratório para mim, para que eu desenvolvesse o trabalho com as células.

À Professora Roberta Urban, por abrir as portas de seu laboratório e permitir que eu desenvolvesse a parte analítica do meu trabalho, e por abrir as portas da sua própria casa para me hospedar quando eu estava em São Carlos. Obrigada pela sua amizade!

À Professora Danielle Palma de Oliveira, por permitir que eu frequentasse seu laboratório para fazer alguns experimentos e também por suas ótimas contribuições no meu exame de qualificação e no artigo que publicamos juntas.

To Dr. Kristian Dreij, thank you for the opportunity to work with you and learn under your guidance. You are such a great leader and an inspiration to me.

Ao Dr. Felipe Galvão, serei eternamente grata por ter aberto o caminho para que eu realizasse o meu estágio de doutorado sanduíche em Estocolmo e por ter te conhecido.

To Ioannis, I am grateful for all that you have taught me, even amidst the challenges of mastering the orbitrap. My time at Stockholm University was a continuous journey of learning.

I am deeply grateful for the friendships I have made at Karolinska Institutet. To Qianyu, Sarah, Andrea, Srikanth, Gildácio, Jana, Ingrid, Rodrigo, Rossella, and Giulia, your presence has truly enriched my days in Stockholm. Thank you for making this chapter of my life the absolute best.

Agradeço a todos os meus amigos de laboratórios (no plural mesmo!) durante o doutorado: Dayane, Jacques, Pedro, Bianca, André, Raphael, Yuri (em memória), Jonatas, Rita, Natasha, Jordan. Um agradecimento especial ao Raul e ao Daniel Chiclete, por terem compartilhado as angústias e as alegrias do trabalho com as células.

Ao Guilherme e ao Cláudio, técnicos dos laboratórios da Professora Lúcia e da Professora Roberta, por estarem sempre prontos para auxiliar.

Ao Junior, técnico do laboratório da Professora Elza Tiemi, por me salvar no teste do micronúcleo com suas dicas.

Ao Professor Thiago Nogueira, que participou do meu exame de qualificação e enriqueceu muito a discussão sobre o meu trabalho.

À Lâmia, ao Fernando, e aos demais funcionários da secretaria do departamento de Química. À Fabiana, à Rossana e ao César, pelo trabalho desempenhado na seção de pós-graduação.

A todos os docentes, técnicos e funcionários que tornaram possível a realização deste trabalho.

Ao CNPq, pela bolsa concedida no início do doutorado.

À FAPESP pelo auxílio financeiro proporcionado pela bolsa de doutorado (processo nº 2018/17931-0).

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradeço pela bolsa de doutorado sanduíche (88887.642068/2021-00).

Este trabalho jamais teria sido possível sem a participação de todas as pessoas e instituições aqui citadas. Ofereço toda a minha gratidão!

“Não vês que somos viajantes?

E tu me perguntas:

Que é viajar?

Eu respondo com uma palavra: é avançar!

Experimentais isto em ti

Que nunca te satisfaças com aquilo que és

Para que sejas um dia aquilo que ainda não és.

Avança sempre! Não fiques parado no caminho.”

Santo Agostinho

## RESUMO

SCARAMBONI, C. **Impacto da queima de biomassa na concentração de compostos policíclicos aromáticos e na toxicidade *in vitro* do material particulado atmosférico de Ribeirão Preto-SP.** 2023. 172 p. Tese (Doutorado em Ciências, Área: Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

O material particulado (MP) atmosférico representa um risco à saúde humana por estar associado a doenças respiratórias, cardiovasculares e ao câncer. Dentre os compostos orgânicos presentes no MP, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e seus derivados oxi e nitrogenados têm recebido atenção especial devido seu elevado potencial mutagênico e carcinogênico. Neste trabalho, o MP foi coletado na cidade de Ribeirão Preto-SP (Brasil), localizada numa região canavieira que ainda é particularmente afetada pela queima de biomassa, mesmo com a eliminação da prática da queima da palha da cana-de-açúcar antes da colheita manual. Dada a elevada frequência de incêndios e a elevada densidade populacional da região, o impacto da queima de biomassa na emissão de HPA e derivados e na toxicidade *in vitro* do MP precisa ser melhor investigado. Para isso, amostras de MP fracionado por tamanho foram coletadas nas estações seca e úmida nos anos de 2020 e 2021. Os anidroaçúcares levoglucosano, manosano e galactosano foram utilizados como marcadores de queima de biomassa. A determinação simultânea de HPA, oxi-HPA, nitro-HPA e dos anidroaçúcares foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, após a extração orgânica do MP com acetonitrila por meio de sonicação. O método de extração foi previamente otimizado e satisfatoriamente validado, resultando em um método relativamente simples, que faz uso de pequenas quantidades de solvente orgânico quando comparado a diversos métodos da literatura, e que permitiu a análise das amostras coletadas com amostrador de pequeno volume. A mediana da concentração total dos 15 HPA determinados foi de  $2,3 \pm 1,8 \text{ ng m}^{-3}$  ( $n = 19$ ), das quais 63% estavam presentes no MP  $< 1,0 \mu\text{m}$  (MP<sub>1,0</sub>). As concentrações de oxi-HPA e nitro-HPA foram cerca de uma ordem de magnitude inferiores. O MP  $< 2,5 \mu\text{m}$  (MP<sub>2,5</sub>) coletado na estação seca, quando ocorre a maior parte dos incêndios, apresentou concentrações totais de HPA e oxi-HPA três vezes maiores do que na estação úmida, e tiveram correlações positivas com o número de focos de incêndio e concentração dos anidroaçúcares. Esses resultados, somados ao fato de que a queima de biomassa explicou 65% da variância dos dados (análise de fatores principais - PCA), evidenciaram a importância desta prática como fonte de HPA e oxi-HPA para a atmosfera da região. Por outro lado, os resultados indicaram que os nitro-HPA foram emitidos principalmente por veículos movidos a diesel. A concentração equivalente de benzo[a]pireno foi 4 vezes maior na estação seca do que na estação úmida, e aumentou cerca de 23 vezes durante um incêndio local. A citotoxicidade e a genotoxicidade dos extratos orgânicos do MP<sub>1,0</sub> foram avaliadas por meio de testes *in vitro* com células HepG2 de fígado humano. Para ambos os tipos de testes, foi observada toxicidade significativa apenas para amostras coletadas durante a estação seca. Também foram observados danos persistentes no DNA que podem ter prejudicado o sistema de reparo do DNA. Além de trabalhar com o extrato de MP, neste trabalho, os efeitos citotóxicos e genotóxicos do HPA retido em particular, foram investigados utilizando células HepG2. Os dados mostraram que o retido teve efeito mínimo na viabilidade celular, mas induziu quebras na cadeia de DNA, formação de micronúcleos e formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) de maneira

dependente da concentração e do tempo. O reteno ativou a fosforilação da quinase checkpoint 1 (Chk1), um indicador de estresse replicativo e instabilidade cromossômica, corroborando com o aumento da formação de micronúcleos. Foi observado um efeito protetor do antioxidante N-acetilcisteína (NAC) na geração de ERO e na sinalização de danos no DNA, sugerindo o estresse oxidativo como um mecanismo chave dos efeitos genotóxicos observados do reteno nas células HepG2. Conclui-se que os resultados deste trabalho contribuem para uma melhor compreensão dos desafios ambientais e de saúde apresentados pela queima de biomassa e a urgência de abordar essa questão no contexto das mudanças climáticas globais atuais.

**Palavras-chave:** HPA. Reteno. Levoglucosano. Células HepG2. Genotoxicidade. Poluição do ar.

## ABSTRACT

SCARAMBONI, C. **Impact of biomass burning on the concentration of polycyclic aromatic compounds and *in vitro* toxicity of atmospheric particulate matter from Ribeirão Preto-SP.** 2023. 172 p. Tese (Doutorado em Ciências, Área: Química) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Particulate Matter (PM) in the atmosphere poses a risk to human health as it was associated with respiratory, cardiovascular, and cancer-related diseases. Among the organic compounds present in PM, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their oxygenated and nitrogenated derivatives have received special attention due to their high mutagenic and carcinogenic potential. In this study, PM was collected in the city of Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil, which is located in a sugarcane-producing region that is still affected by biomass burning, despite the discontinuation of sugarcane leaves burning before manual harvesting. Given the high frequency of fires and the dense population in the region, the impact of biomass burning on the emission of PAHs and derivatives and the *in vitro* toxicity of PM needs to be further investigated. For this purpose, size-fractionated PM samples were collected in the dry and wet seasons of the years 2020 and 2021. Anhydrosugars levoglucosan, mannosan, and galactosan were used as markers of biomass burning. Simultaneous determination of PAHs, oxy-PAHs, nitro-PAHs, and anhydrosugars was performed using gas chromatography-mass spectrometry after organic extraction of PM with acetonitrile via sonication. The extraction method was previously optimized and satisfactorily validated, resulting in a relatively simple method that uses small amounts of organic solvent when compared to various methods in the literature, allowing for the analysis of samples collected with a low-volume sampler. The median concentration of the total 15 PAHs determined was  $2.3 \pm 1.8 \text{ ng m}^{-3}$  ( $n = 19$ ), of which 63% were present in  $\text{PM} < 1.0 \mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{1.0}$ ). Oxy-PAH and nitro-PAH concentrations were about an order of magnitude lower.  $\text{PM} < 2.5 \mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{2.5}$ ) collected in the dry season, when most fires occur, had three times higher total concentrations of PAHs and oxy-PAHs than in the wet season and had positive correlations with the number of fire spots and anhydrosugars concentrations. These results, together with the fact that biomass burning explained 65% of the data variance (principal component analysis - PCA), highlighted the importance of this practice as a source of PAHs and oxy-PAHs in the region's atmosphere. On the other hand, the results indicated that nitro-PAHs were primarily emitted by diesel-powered vehicles. The equivalent concentration of benzo[a]pyrene was four times higher in the dry season than in the wet season and increased by about 23 times during a local fire. The cytotoxicity and genotoxicity of organic extracts of  $\text{PM}_{1.0}$  were evaluated through *in vitro* tests with human liver HepG2 cells. For both types of tests, significant toxicity was observed only for samples collected during the dry season. Persistent DNA damage was also observed, which may have impaired the DNA repair system. In addition to working with the PM extract, this study investigated the cytotoxic and genotoxic effects of the PAH retene using HepG2 cells. Retene had minimal effects on cell viability but induced DNA strand breaks, micronucleus formation, and the formation of reactive oxygen species (ROS) in a concentration and time-dependent manner. Retene activated checkpoint kinase 1 (Chk1) phosphorylation, an indicator of replication stress and chromosomal instability, corroborating the increased formation of micronuclei. An antioxidant, N-acetylcysteine (NAC), was observed to have a protective effect on ROS generation and DNA damage signaling, suggesting oxidative stress as a key

mechanism of the observed genotoxic effects of retene in HepG2 cells. In conclusion, the results of this study contribute to a better understanding of the environmental and health challenges posed by biomass burning and the urgency of addressing this issue in the context of current global climate change.

**Keywords:** PAH. Retene. Levoglucosan. HepG2 cells. Genotoxicity. Air pollution.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Distribuições típicas de (a) número, (b) área superficial e (c) volume das partículas em função do diâmetro na atmosfera. A distribuição de volume é equivalente à distribuição de massa quando há pouca variação na densidade .....	28
<b>Figura 2</b> - (a) Ilustração das regiões do sistema respiratório. (b) Previsão da deposição total e por região do sistema respiratório em função do diâmetro das partículas.....	29
<b>Figura 3</b> - Contribuição relativa em porcentagem dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos para as fases gasosa e particulada de amostras coletadas em Campo Grande – MT, Brasil .....	34
<b>Figura 4</b> - Esquema do mecanismo de ação do benzo[a]pireno (B[a]P) via formação de diol epóxidos por meio das enzimas do citocromo P450 (CYP) e epóxido hidrolase (EH) .....	37
<b>Figura 5</b> - Esquema dos principais eventos-chave relacionados à carcinogenicidade dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA).....	38
<b>Figura 6</b> - Esquema das vias de resposta ao dano no DNA. ....	39
<b>Figura 7</b> - Estrutura química do reteno .....	43
<b>Figura 8</b> - Números de focos de incêndio de 1998 a 2021 e porcentagem da colheita manual que utiliza fogo em relação à colheita total .....	45
<b>Figura 9</b> - Geração de energia elétrica nas usinas sucroalcooleiras pela queima do bagaço da cana-de-açúcar.....	46
<b>Figura 10</b> - Esquema da formação de levoglucosano a partir da pirólise ( $150 < T < 350$ °C) da celulose .....	47
<b>Figura 11</b> - (a) Mapa do Estado de São Paulo com destaque para a localização do município de Ribeirão Preto. (b) Parte do mapa de Ribeirão Preto, com indicação dos locais de amostragem no campus da USP na periferia (A) e no centro da cidade (B) .....	51
<b>Figura 12</b> - Fotos do amostrador MOUDI (a) montado e (b) desmontado com os filtros antes da amostragem. (c) Filtros após a amostragem.....	52
<b>Figura 13</b> - Precipitação acumulada, precipitação normal climatológica (1991-2021), temperatura diária média e radiação solar diária média registradas em Ribeirão Preto nos anos de (a) 2020 e (b) 2021.....	53
<b>Figura 14</b> - Gráfico de contorno da resposta para diferentes proporções de diclorometano, metanol e acetonitrila .....	74
<b>Figura 15</b> - Porcentagem relativa dos efeitos das variáveis 1 (número de extrações), 2 (volume de solvente) e 3 (tempo de ultrassom) e suas interações. Os valores de efeito calculados são fornecidos ao lado de cada coluna .....	75

<b>Figura 16</b> - (a) Superfície de resposta e (b) gráfico de contorno para o modelo gerado pelo refinamento da otimização das condições de extração.....	77
<b>Figura 17</b> - Cromatograma obtido a partir da extração de um filtro dopado com uma concentração final de 300 ng mL <sup>-1</sup> dos padrões de: (1) fluoreno- <i>d</i> <sub>10</sub> , (2) fluoreno, (3) fenantreno- <i>d</i> <sub>10</sub> , (4) fenantreno, (5) antraceno, (6) 9,10-antraquinona- <i>d</i> <sub>8</sub> , (7) 9,10-antraquinona, (8) 5-nitroacenafteno, (9) fluoranteno, (10) 2-nitrofluoreno, (11) pireno, (12) 9-nitroantraceno- <i>d</i> <sub>9</sub> , (13) 9-nitroantraceno, (14) reteno, (15) benzo[ <i>a</i> ]fluorenona, (16) benzo[ <i>a</i> ]antraceno, (17) criseno- <i>d</i> <sub>12</sub> , (18) criseno, (19) 3-nitrofluoranteno, (20) 1-nitropireno, (21) benzo[ <i>b</i> ]fluoranteno, (22) benzo[ <i>k</i> ]fluoranteno, (23) benzo[ <i>e</i> ]pireno, (24) benzo[ <i>a</i> ]pireno- <i>d</i> <sub>12</sub> , (25) benzo[ <i>a</i> ]pireno, (26) 6 <i>H</i> -benzo[ <i>cd</i> ]piren-6-ona, (27) perileno- <i>d</i> <sub>12</sub> , (28) indeno[1,2,3, <i>cd</i> ]perileno, (29) dibenzo[ <i>a,h</i> ]antraceno, (30) benzo[ <i>ghi</i> ]perileno, (31) 6-nitrobenzo[ <i>a</i> ]pireno.....	79
<b>Figura 18</b> - Recorte do cromatograma de uma mistura de levoglucosano, manosano, galactosano e levoglucosano- <sup>13</sup> C na concentração final de 1 µg mL <sup>-1</sup> após a etapa de derivatização .....	85
<b>Figura 19</b> - Concentrações dos anidroaçúcares (a) levoglucosano, (b) manosano e (c) galactosano determinadas por CG-EM após a extração com diclorometano (DCM) e metanol versus a extração com acetonitrila (ACN). .....	86
<b>Figura 20</b> - Mediana das frações de massa dos HPA, oxi-HPA e nitro-HPA determinadas no MP grosso (MP <sub>2,5-10</sub> ) em função da (a) pressão de vapor e (b) massa molecular. ....	87
<b>Figura 21</b> - Concentrações da soma dos (a) HPA, (b) oxi-HPA e (c) nitro-HPA no MP coletado em Ribeirão Preto no campus (n = 14) e no centro da cidade (n = 5), em que a data apresentada corresponde ao início da amostragem .....	89
<b>Figura 22</b> - Concentrações de levoglucosano, manosano e galactosano no MP coletado em Ribeirão Preto no campus (n = 14) e no centro da cidade (n = 5) , em que a data apresentada corresponde ao início da amostragem .....	92
<b>Figura 23</b> - Diagramas de caixa das concentrações de HPA, oxi-HPA, nitro-HPA e anidroaçúcares no MP <sub>2,5</sub> coletado no campus e no centro de Ribeirão Preto, durante a estação úmida (n = 7) e seca (n = 12). A linha do meio na caixa representa a mediana; a caixa inferior é o primeiro quartil; a caixa superior é o terceiro quartil; as barras de erro indicam valores mínimos e máximos; (■) média; (◆) <i>outliers</i> . O asterisco (*) ao lado do nome do composto indica uma diferença significativa entre as medianas para cada estação (teste de Mann-Whitney; p < 0,05). Observe que os valores mostrados para levoglucosano foram reduzidos por um fator de dez.....	93
<b>Figura 24</b> - (a) Gráfico de escores e (b) gráfico de pesos para CP1 x CP2, obtidos da análise de componentes principais das 19 amostras de MP <sub>2,5</sub> .....	97

- Figura 25** - (a) Trajetórias de massas de ar de três dias chegando em Ribeirão Preto (marcada com ★) em três altitudes (500, 1.000 e 1.500 m) no dia 19 de setembro de 2020, no momento que a amostragem de MP total terminou. (B) Focos de incêndio registrados em todo país durante o mesmo período das trajetórias de massas de ar. .... 101
- Figura 26** - a) Porcentagem de redução de MTT pelas células HepG2 após exposição a extratos de MP<sub>1,0</sub> a 1 m<sup>3</sup> ar equivalente por mL por 24, 48 e 72 h. CCCP (10 μmol L<sup>-1</sup>) foi usado como controle positivo (CP). (b) Intensidade da cauda dos nucleoides de HepG2 após exp exposição a extratos de MP<sub>1,0</sub> a 1 m<sup>3</sup> ar equivalente por mL por 4 e 24 h, avaliada por ensaio cometa. Neste caso, MMS (0,13 μmol L<sup>-1</sup>) foi usado como controle positivo (CP). Os dados são apresentados como média ± erro padrão (n = 3), com \*\*\*p < 0,001, \*\*p < 0,01 e \*p < 0,05, quando comparados ao controle negativo de DMSO (CN)..... 103
- Figura 27** - Porcentagem da redução do MTT pelas células HepG2 após a exposição ao retno em diferentes concentrações por (a) 24 h, (b) 48 h e (c) 72 h. CCCP (10 μmol L<sup>-1</sup>) foi usado como controle positivo (CP). Os dados são apresentados como média ± erro padrão (n = 3), com \*\*\*p < 0,001, \*\*p < 0,01 e \*p < 0,05, quando comparados ao controle negativo de DMSO (CN) ..... 105
- Figura 28** - Intensidade da cauda dos nucleoides de HepG2 após a exposição ao retno por 4 e 24 h determinada pelo ensaio cometa. MMS (0,13 μmol L<sup>-1</sup>) foi usado como controle positivo (CP). Os dados são apresentados como média ± erro padrão (n = 3), com \*\*\*p < 0,001, \*\*p < 0,01 e \*p < 0,05, quando comparados ao controle negativo de DMSO (CN). A média indicada com (#) foi significativamente diferente da mesma concentração após 4 h de exposição (#p < 0.05) ..... 106
- Figura 29** - a) Frequência de micronúcleos (MN), brotos nucleares (BN) e pontes nucleoplasmáticas (PNP) em células HepG2 expostas ao retno por 48 h avaliadas pelo teste de micronúcleo com bloqueio da citocinese pela citocalasina B (MNCtB). MMS (0,13 μmol L<sup>-1</sup>) foi utilizado como controle positivo (CP). (b) Frequência de células apoptóticas e necróticas, de MN e de núcleos hipodiploides (HD) em células HepG2 expostas ao retno por 72 h avaliadas pelo teste de micronúcleo por citometria de fluxo. Etoposídeo (1 μmol L<sup>-1</sup>) foi utilizado como controle positivo (CP). Os dados representam média ± EP (n = 3) com \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001 em comparação com o controle negativo de DMSO (CN). ..... 107
- Figura 30** - Curvas de concentração-resposta com base nos níveis de (A) pChk1 e (B) γH2AX em células HepG2 expostas ao retno (RET) por 48 h. Os dados representam a média ± erro padrão (n ≥ 3). Os dados para o dibenz[*a,h*]pireno (DB[*a,h*]P), benzo[*a*]pireno (B[*a*]P) e fenantreno (FEN) foram obtidos de Dreij et al. (2017) e Galvão et al. (2022). *Blots* representativos estão mostrados na parte superior. B[*a*]P 3 μmol/L foi usado

como controle positivo (CP). CN = controle negativo com DMSO. Cdk2 foi usado como controle. ....	108
<b>Figura 31</b> - Produção relativa de espécies reativas de oxigênio (ERO) avaliada utilizando o ensaio MitoSOX em células HepG2 expostas ao reteno em diferentes concentrações por 4, 12, 24, 48 e 72 h. B[a]P (1,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi utilizado como controle positivo (CP). Os dados representam média $\pm$ EP ( $n \geq 3$ ) com * $p < 0,05$ , ** $p < 0,01$ , *** $p < 0,001$ , **** $p < 0,0001$ em comparação com o controle negativo de DMSO (CN).....	110
<b>Figura 32</b> - Esquema das vias de metabolização do reteno propostas por Huang et al. (2012) .....	111
<b>Figura 33</b> - Níveis de (a) pChk1 e $\gamma\text{H2AX}$ nas células HepG2 após exposição ao reteno em diferentes concentrações e intervalos de tempo. B[a]P (3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi usado como controle positivo (CP). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão ( $n = 3$ ), com *** $p < 0,001$ , ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ , quando comparados ao controle negativo de DMSO (CN).....	113
<b>Figura 34</b> - Níveis de (a) pChk1 e $\gamma\text{H2AX}$ nas células HepG2 após exposição ao reteno em diferentes concentrações e intervalos de tempo na ausência e na presença de NAC (-NAC e +NAC, respectivamente). B[a]P (3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi usado como controle positivo (CP). Os dados são apresentados como média $\pm$ erro padrão ( $n = 3$ ), com *** $p < 0,001$ , ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ , quando comparados ao DMSO controle (CN).....	114

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Valores diretrizes de qualidade do ar para material particulado $\leq 10 \mu\text{m}$ ( $\text{MP}_{10}$ ) e $\leq 2,5 \mu\text{m}$ ( $\text{MP}_{2,5}$ ) preconizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), pela União Europeia (EU), pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA), pelo Ministério de Ecologia e Ambiente da China (MEE – China) e pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) do Brasil .....	30
<b>Tabela 2</b> - Estrutura molecular, massa molecular (MM), temperatura de ebulição (Tebulição), pressão de vapor ( $P_v$ ) a 25 °C, logaritmo da constante de partição octanol-água (Kow), e classificação de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) dos 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos considerados prioritários pela US-EPA.....	33
<b>Tabela 3</b> - Estrutura molecular, massa molecular (MM), temperatura de ebulição (Tebulição), pressão de vapor ( $P_v$ ) a 25 °C, logaritmo da constante de partição octanol-água (Kow), e classificação de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) de alguns derivados oxi e nitrogenados dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.....	35
<b>Tabela 4</b> - Fatores de equivalência TEF (toxicity equivalence factor), RPF (relative potency factor) e grupo IARC para cada um dos 16 HPA prioritários da US-EPA.....	41
<b>Tabela 5</b> - Padrões utilizados para a construção das curvas analíticas e nos testes de recuperação .....	54
<b>Tabela 6</b> - Padrões internos utilizados e seus respectivos analitos .....	55
<b>Tabela 7</b> - Fragmentos iônicos utilizados para quantificação e confirmação dos analitos e o tempo de retenção de cada analito.....	56
<b>Tabela 8</b> - Condições experimentais do planejamento de mistura realizada para otimização do solvente de extração, e as respostas em termos de desejabilidade global (Dg). Os valores codificados estão mostrados entre parênteses .....	72
<b>Tabela 9</b> - Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão linear calculado a partir dos dados experimentais do planejamento de mistura .....	73
<b>Tabela 10</b> - Condições experimentais do planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) com ponto central realizadas para otimização do número de extrações, volume de solvente e tempo de ultrassom, e as respostas em termos de desejabilidade global (Dg). Os valores codificados estão entre parênteses .....	74
<b>Tabela 11</b> - Planejamento de composto central utilizado para o processo de refinamento das condições de extração (volume de solvente e tempo de ultrassom) e as respostas em termos de desejabilidade global (Dg). Os valores codificados estão entre parênteses .....	76

<b>Tabela 12</b> - Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão linear calculado a partir dos dados experimentais do planejamento fatorial completo.....	76
<b>Tabela 13</b> - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), faixas lineares de trabalho, equações e coeficiente de correção (r) obtidos para cada composto policíclico aromático determinado.....	82
<b>Tabela 14</b> - Desvio padrão relativo (DPR) dos analitos determinados em triplicata em três diferentes concentrações.....	83
<b>Tabela 15</b> - Recuperações médias dos analitos determinados em triplicata nas amostras de MP10 dopadas com três diferentes concentrações. As relações dos sinais obtidos utilizando o método otimizado aqui proposto e o método de referência segundo Alves et al. (2011) também estão apresentadas .....	84
<b>Tabela 16</b> - Parâmetros meteorológicos, número de dias sem chuva anteriores às amostragens, e número de focos de incêndio acumulados no estado de São Paulo durante as amostragens nas estações úmida e seca em Ribeirão Preto.....	95
<b>Tabela 17</b> - Pesos obtidos na análise de componentes principais (CP) das 19 amostras de MP <sub>2,5</sub> .....	98
<b>Tabela 18</b> - Concentrações de HPA, oxi-PAH, nitro-HPA e levoglucosano determinadas nas amostras utilizadas nos ensaios <i>in vitro</i> .....	102

## LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

AKR - aldo-ceto redutases

ANOVA – análise de variância

AOAC - Associação Internacional Oficial de Químicos Analíticos

B[a]P – benzo[a]pireno

B[a]P<sub>eq</sub> - benzo[a]pireno equivalente

BSTFA - N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida

CCCP - carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CG-EM – cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

CIAGRO - Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas do Estado de São Paulo

CMB - balanço químico de massa

CN – controle negativo

CO/CE – razão carbono orgânico e carbono elementar

CP – controle positivo

CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente

D – diâmetro aerodinâmico

DDR – resposta ao dano no DNA

Dg – desejabilidade global

DMEM - meio Eagle modificado de Dulbecco

DMSO – dimetilsulfóxido

DNA – ácido desoxirribonucleico

DPR – desvio padrão relativo

EH – epóxido hidrolase

ERO – espécies reativas de oxigênio

HPA – hidrocarboneto policíclico aromático

HYSPLIT - Trajetória Integrada Lagrangiana Híbrida de Partícula Única

IARC – Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICH - Conselho Internacional de Harmonização

IDN – Índice de divisão nuclear

INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais  
IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada  
LD – limite de detecção  
LQ – limite de quantificação  
MEM – Meio mínimo essencial  
MM – massa molecular  
MMS - metanossulfonato de metila  
MOUDI - Impactador de Depósito Uniforme de Micro Orifício  
MP – material particulado  
MP<sub>10</sub> – material particulado com diâmetro aerodinâmico equivalente ou menor que 10  
µm  
MP<sub>2,5</sub> - material particulado com diâmetro aerodinâmico equivalente ou menor que 2,5  
µm  
MTT - brometo de 3-(4,5 dimetiliazol-2il)-2,5 difenil tetrazólio  
NAC – N-acetilcisteína  
nitro-HPA – hidrocarbonetos policíclicos aromáticos nitrogenados  
NOAA - Administração Nacional Oceânica e Atmosférica  
OMS – Organização Mundial da Saúde  
oxi-HPA - hidrocarbonetos policíclicos aromáticos oxigenados  
PBS – tampão fosfato  
PCA – análise de componentes principais  
PMF - fatoraçoão de matriz positiva  
PTS – partículas totais em suspensão  
Pv – pressão de vapor  
RPF - fator de potencial relativo  
TEF - fator de toxicidade equivalente  
TMCS - trimetilclorossilano  
TMS - trimetilsilano  
UE – União Europeia  
UNICA - União da Indústria de Cana-de-Açúcar  
US-EPA – Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	22
<b>1.1 Apresentação e motivação para realização do trabalho</b> .....	23
<b>1.2 Poluição do ar</b> .....	25
<b>1.3 Material particulado atmosférico</b> .....	26
<b>1.4 Composição química e toxicidade do material particulado</b> .....	30
<b>1.5 Compostos Policíclicos Aromáticos</b> .....	31
<b>1.6 Efeitos biológicos dos HPA</b> .....	36
<b>1.7 Resposta ao dano no DNA</b> .....	38
<b>1.8 Avaliação do risco da exposição aos HPA</b> .....	40
<b>1.9 Reteno</b> .....	42
<b>1.10 Local de estudo</b> .....	44
<b>1.11 Determinação de HPA e derivados no material particulado</b> .....	46
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	48
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	50
<b>3.1 Amostragem do material particulado</b> .....	51
<b>3.2 Dados meteorológicos</b> .....	53
<b>3.3 Determinação de HPA e derivados</b> .....	54
<b>3.3.1 Preparo das soluções padrões</b> .....	54
<b>3.3.2 Instrumentação analítica</b> .....	55
<b>3.3.3 Procedimento de extração e otimização experimental</b> .....	57
<b>3.3.4 Validação do método otimizado</b> .....	58
<b>3.4 Avaliação do risco de câncer</b> .....	60
<b>3.5 Determinação dos anidroaçúcares</b> .....	61
<b>3.6 Ensaio toxicológicos</b> .....	62
<b>3.6.1 Cultivo de células</b> .....	62
<b>3.6.2 Exposição das células ao reteno e aos extratos de MP</b> .....	62
<b>3.6.3 Viabilidade celular</b> .....	64
<b>3.6.4 Espécies reativas de oxigênio</b> .....	64
<b>3.6.5 Ensaio cometa</b> .....	65
<b>3.6.6 Teste de micronúcleo com bloqueio da citocinese celular</b> .....	66
<b>3.6.7 Teste de micronúcleo por citometria de fluxo</b> .....	68
<b>3.6.8 Western Blotting</b> .....	69
<b>3.7 Análise dos resultados</b> .....	70

<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	71
<b>4.1 Otimização e validação do método de extração dos compostos policíclicos aromáticos do material particulado</b> .....	72
<b>4.1.1 Otimização dos parâmetros de extração</b> .....	72
<b>4.1.2 Validação do método de extração otimizado</b> .....	81
<b>4.1.3 Aplicação do método de extração otimizado para a determinação de anidroaçúcares</b> .....	85
<b>4.2 Distribuição dos HPA, oxi-HPA, nitro-HPA e anidroaçúcares no material particulado</b> .....	87
<b>4.2.1 Distribuição dos HPA e derivados de acordo com sua massa molecular e pressão de vapor</b> .....	87
<b>4.2.2 Distribuição dos HPA e derivados no material particulado fracionado</b> .....	88
<b>4.2.3 Distribuição dos anidroaçúcares no material particulado fracionado</b> .....	91
<b>4.3 Distribuição sazonal e identificação das fontes de emissão dos compostos policíclicos aromáticos e anidroaçúcares no material particulado</b> .....	93
<b>4.3.1 Sazonalidade</b> .....	93
<b>4.3.2 Identificação das fontes de emissão</b> .....	96
<b>4.4 Avaliação do risco de câncer</b> .....	99
<b>4.5 Toxicidade <i>in vitro</i> dos extratos de material particulado</b> .....	102
<b>4.6 Toxicidade <i>in vitro</i> do reteno</b> .....	105
<b>4.6.1 Citotoxicidade</b> .....	105
<b>4.6.2 Genotoxicidade</b> .....	106
<b>4.6.3 Produção de espécies reativas de oxigênio</b> .....	109
<b>5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	116
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	119
<b>APÊNDICE A</b> .....	132
<b>APÊNDICE B</b> .....	134
<b>APÊNDICE C</b> .....	138
<b>APÊNDICE D</b> .....	150
<b>APÊNDICE E</b> .....	160

## **1 INTRODUÇÃO**

## 1.1 Apresentação e motivação para realização do trabalho

A exposição à poluição do ar é um importante fator de risco para a saúde humana em todo o mundo, sendo associada a doenças respiratórias crônicas, doenças cardiovasculares e câncer (ABBAFATI, 2020). O material particulado (MP) é um dos principais indicadores de poluição do ar, e dentre os compostos orgânicos presentes no MP, os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) têm recebido atenção especial devido seu elevado potencial mutagênico e carcinogênico (MALLAH et al., 2022).

A queima de biomassa representa mais de 50% das emissões atmosféricas totais globais de HPA (ZHANG et al., 2022). No Brasil, estima-se que os incêndios florestais representem 60,1% das emissões totais de HPA, seguidos pela queima de lenha em ambientes fechados (17,7%) e veículos automotores (15,0%) (SHEN et al., 2013). Os incêndios florestais são notórios na Amazônia brasileira e no cerrado, no entanto, outras regiões do país também podem ser altamente afetadas pelo uso do fogo (URBAN et al., 2012, 2016; COBELO et al., 2023; SILVA; LOPES; SANTOS, 2023).

O presente estudo foi realizado em Ribeirão Preto, município localizado em uma região agroindustrial do estado de São Paulo, com atividades econômicas baseadas principalmente no cultivo e processamento de cana-de-açúcar para produção de etanol e açúcar. Por décadas, o fogo foi utilizado para queimar a palha da cana-de-açúcar a fim de facilitar o processo de colheita manual. Desde 2006, uma política pública de substituição progressiva da colheita manual tem sido implementada, sendo que agora a colheita mecanizada representa cerca de 98% da safra total (dado de 2022/23; CONAB, 2022).

Apesar da drástica redução no uso do fogo antes da colheita de cana-de-açúcar, números elevados de focos de incêndio no estado de São Paulo foram registrados recentemente, com um aumento de cerca de 100% em 2020 e 2021 em comparação com a média dos 9 anos anteriores (INPE, 2023a). O persistente elevado número de focos de incêndio na estação seca pode ser atribuído ao uso do fogo para limpeza de terrenos na agricultura, bem como a incêndios florestais acidentais e/ou criminosos em florestas locais e plantações. Essa situação tem sido agravada no contexto das mudanças climáticas, com períodos mais longos de seca e distribuição inadequada de chuvas (STRINGER et al., 2021). Outra fonte importante de emissões

---

da queima de biomassa na região de estudo é a utilização do resíduo seco da cana-de-açúcar (bagaço) como combustível na indústria canavieira. Além disso, o bagaço excedente é posteriormente utilizado para geração de energia termelétrica e por outras indústrias regionais, como a de laranja (URBAN et al., 2014).

Dada a elevada frequência de incêndios e densidade populacional da região, o impacto da queima de biomassa na saúde humana motivou este estudo, pois precisa ser melhor investigado.

Neste trabalho, primeiramente serão apresentados os resultados do desenvolvimento analítico de um método de extração do MP visando a determinação simultânea de HPA e dos anidroaçúcares marcadores da queima de biomassa. Em seguida, as concentrações de HPA determinadas nas amostras de MP coletadas de forma fracionada numa região urbana e semiurbana de Ribeirão Preto serão apresentadas juntamente com ferramentas estatísticas a fim de avaliar as principais fontes desses compostos na região.

Tendo em vista a importância do potencial tóxico dos HPA, a terceira parte do trabalho irá abordar um estudo toxicológico em que se avaliou o potencial citotóxico e genotóxico de extratos do MP fino, utilizando ensaios *in vitro* com células HepG2 de fígado humano.

Concentrações elevadas do HPA reteno encontradas anteriormente em amostras de MP de regiões canavieiras (URBAN et al., 2016) e a escassez de estudos utilizando células humanas motivou o estudo sobre a toxicidade desse composto em particular. Na quarta e última parte da tese, portanto, serão apresentados os resultados da investigação sobre a citotoxicidade, a genotoxicidade e a geração de espécies reativas de oxigênio no meio intracelular induzidas pela exposição das células ao reteno.

Nos apêndices C, D e E estão apresentados os três artigos derivados desta tese que foram publicados (SCARAMBONI et al., 2021, 2023, 2024).

---

## 1.2 Poluição do ar

A história da poluição do ar urbana remonta a séculos atrás, com dados que indicam que na Grécia antiga e nas áreas sob domínio do império Romano a poluição do ar era severa devido à produção de metal e à queima de madeira (HONG et al., 1994). Durante a Idade Média, no século XII, a cidade de Londres já sofria com o ar poluído principalmente pela queima de carvão mineral, combustível barato em relação à madeira, porém pouco eficiente que era utilizado para aquecimento residencial. Já no século XVII, John Evelyn (1620 – 1706), um escritor inglês, foi um dos primeiros a chamar a atenção da sociedade para os possíveis riscos à saúde ao respirar a fumaça oriunda da queima de carvão em uma carta dirigida ao rei inglês na época. Com a Revolução Industrial, os problemas com a poluição pioraram, por causa do uso das máquinas a vapor e a combustão de carvão em fornos e caldeiras dentro das fábricas (JACOBSON, 2012).

O Grande *Smog* (do inglês *smoke* + *fog*, isto é, fumaça + neblina) de Londres em 1952, causada por uma combinação de emissões de queima de carvão e condições climáticas, resultou em milhares de mortes. Apesar de não ter sido o primeiro episódio de *smog* no mundo com resultados letais, serviu como um ponto de virada no reconhecimento da urgência de lidar com a poluição do ar (JACOBSON, 2012). A Lei do Ar Limpo (*Clean Air Act*) de 1956 no Reino Unido e de 1963 nos Estados Unidos estiveram entre os esforços legislativos pioneiros destinados a conter a poluição do ar. Essas regulamentações impuseram restrições às emissões de fontes industriais e estabeleceram padrões para a qualidade do ar.

No Brasil, a industrialização e a urbanização no século XX levaram a problemas significativos de poluição do ar nos grandes centros urbanos, como São Paulo e Rio de Janeiro, e de cidades tidas como industriais, como é o caso de Cubatão, no Estado de São Paulo. O amplo uso de automóveis, combinado com as emissões industriais, contribuiu para o aumento de poluentes na atmosfera. Os esforços iniciais de regulamentação no Brasil começaram na metade do século XX, com a criação do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente), que desempenhou um papel fundamental na formulação de políticas ambientais, mas somente em 1990 padrões de qualidade do ar nacionais foram estabelecidos (LIMA et al., 2012).

---

---

De acordo com a nova resolução CONAMA Nº 491 DE 19/11/2018, que estabelece padrões de qualidade do ar no Brasil, poluente atmosférico é definido como:

qualquer forma de matéria em quantidade, concentração, tempo ou outras características, que tornem ou possam tornar o ar impróprio ou nocivo à saúde, inconveniente ao bem-estar público, danoso aos materiais, à fauna e flora ou prejudicial à segurança, ao uso e gozo da propriedade ou às atividades normais da comunidade (BRASIL, 2018, p. 1).

Os poluentes que possuem padrões de qualidade do ar na resolução do CONAMA são: material particulado com tamanho menor que 10  $\mu\text{m}$  ( $\text{MP}_{10}$ ) e menor que 2,5  $\mu\text{m}$  ( $\text{MP}_{2,5}$ ), dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ), dióxido de nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ), ozônio ( $\text{O}_3$ ), fumaça, monóxido de carbono (CO), partículas totais em suspensão (PTS) e chumbo (Pb) (BRASIL, 2018).

Em diversos estudos epidemiológicos, o material particulado ( $\text{MP}_{10}$  e  $\text{MP}_{2,5}$ ) teve uma correlação mais forte com o aumento da taxa de mortalidade do que qualquer outro dos principais poluentes atmosféricos, como  $\text{SO}_2$ ,  $\text{NO}_2$  e  $\text{O}_3$  (SALDIVA et al., 1995; SUN; HONG; WOLD, 2010; RAPPAZZO et al., 2019). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a poluição do ar de ambientes externos e internos levou a cerca de 6,7 milhões de mortes prematuras em todo o mundo em 2019, principalmente devido ao  $\text{MP}_{2,5}$  (WHO, 2022). Em outubro de 2013, a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) classificou a poluição do ar e o  $\text{MP}_{2,5}$  como cancerígenos para os seres humanos (Grupo 1) (IARC, 2016). Dessa forma, é evidente o relevante impacto na saúde do material particulado atmosférico.

### **1.3 Material particulado atmosférico**

O material particulado (MP) é um dos principais indicadores de poluição do ar e consiste em partículas sólidas ou líquidas presentes na atmosfera, com diâmetro que varia de alguns nanômetros (nm) a dezenas de micrômetros ( $\mu\text{m}$ ). O termo “aerossol” também é constantemente utilizado como sinônimo de material particulado, no entanto, a definição mais rigorosa de aerossol inclui tanto as partículas quanto o gás em que elas estão suspensas, caracterizando assim um sistema bifásico (FINLAYSON-PITTS; PITTS JR, 1999). Neste trabalho, manteremos os termos partículas e material particulado, frequentemente abreviado como MP.

---

---

O MP pode ser emitido diretamente para a atmosfera (MP primário), ou formado por processos de conversão de gás em partícula (MP secundário). As fontes primárias podem ser naturais ou antrópicas, e incluem a ressuspensão do solo por processos mecânicos, os processos de combustão, erupções vulcânicas, “spray” marinho, pólen e esporos de fungos. As fontes secundárias são aquelas que emitem gases e vapores que reagem e produzem substâncias de menor volatilidade, que conseqüentemente condensam em partículas sólidas e/ou líquidas. Exemplos incluem sais de sulfato e nitrato formados a partir da oxidação de SO<sub>2</sub> e NO<sub>2</sub> provenientes de emissões veiculares e processos de combustão, além de partículas orgânicas formadas a partir da oxidação de compostos orgânicos voláteis (COV) (ALVES, 2005).

Uma vez na atmosfera, as partículas podem alterar seu tamanho e composição por meio da condensação e/ou evaporação de compostos voláteis, por coagulação com outras partículas, por reação química ou, na presença de supersaturação de água podem ser tornar gotículas de neblina e nuvem (SEINFELD; PANDIS, 2006). O MP tem um papel importante na química e na física da atmosfera, pois influencia o balanço radiativo do planeta, a formação de nuvens, além de afetar a biogeoquímica dos ecossistemas (MONKS et al., 2009; FUZZI et al., 2015).

Como as partículas possuem formas irregulares, elas geralmente são idealizadas como partículas esféricas, e o seu tamanho é expresso em termos do diâmetro aerodinâmico equivalente (D), que corresponde ao diâmetro de uma esfera de densidade 1,0 g cm<sup>-3</sup> com a mesma velocidade de sedimentação que a partícula em questão (FINLAYSON-PITTS; PITTS JR, 1999; ALVES, 2005). As propriedades do MP, como número de partículas, área superficial e volume, podem ser distribuídas em função do seu diâmetro (Figura 1).

As partículas ultrafinas, ou do modo de nucleação, possuem  $D \leq 100$  nm e constituem a maior fração do número total de partículas na atmosfera (Figura 1-a). Devido sua pequena massa, a concentração geralmente é expressa em termos de número de partículas por volume de ar (por exemplo, número de partículas por cm<sup>3</sup>). As partículas ultrafinas são formadas por processos de conversão gás-partícula e por processos de combustão, e têm um tempo de residência curto (de minutos a horas) pois são instáveis e tendem a se agregar e formar partículas maiores. Essas partículas maiores, com D entre 100 nm e 1 µm, são classificadas no modo de acumulação, pois tendem a permanecer suspensas na atmosfera por vários dias. Dessa forma, elas podem ser transportadas por longas distâncias antes de serem removidas pela

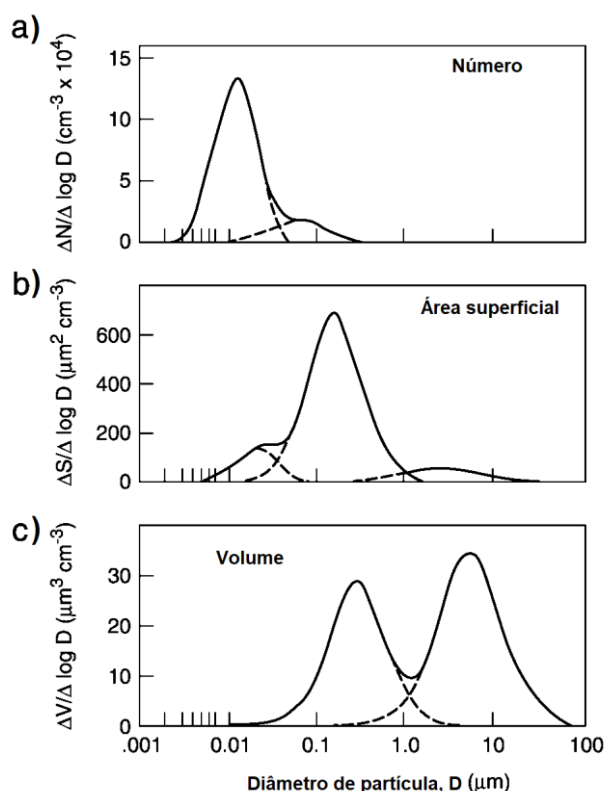
---



deposição seca ou úmida. O modo de acumulação corresponde à maior fração da área superficial total (Figura 1-b) (HEAL; KUMAR; HARRISON, 2012).

As partículas com  $D > 1 \mu\text{m}$ , geralmente são partículas primárias geradas por processos mecânicos, como ressuspensão do solo por vento ou por veículos e maquinários, além do spray marinho e emissões vulcânicas. Partículas grossas têm velocidades de sedimentação suficientemente grandes para se depositarem em um tempo razoavelmente curto. As partículas grossas juntamente com as de modo de acumulação correspondem aos picos da distribuição do volume total das partículas, que é equivalente à distribuição de massa quando há pouca variação na densidade das partículas (Figura 1-c). Dessa forma, o MP com  $D > 100 \text{ nm}$  (modo acumulação e partículas grossas) geralmente é quantificado por sua concentração em massa por volume de ar (por exemplo,  $\mu\text{g por m}^3$ ) (HEAL; KUMAR; HARRISON, 2012).

**Figura 1** - Distribuições típicas de (a) número, (b) área superficial e (c) volume das partículas em função do diâmetro na atmosfera. A distribuição de volume é equivalente à distribuição de massa quando há pouca variação na densidade

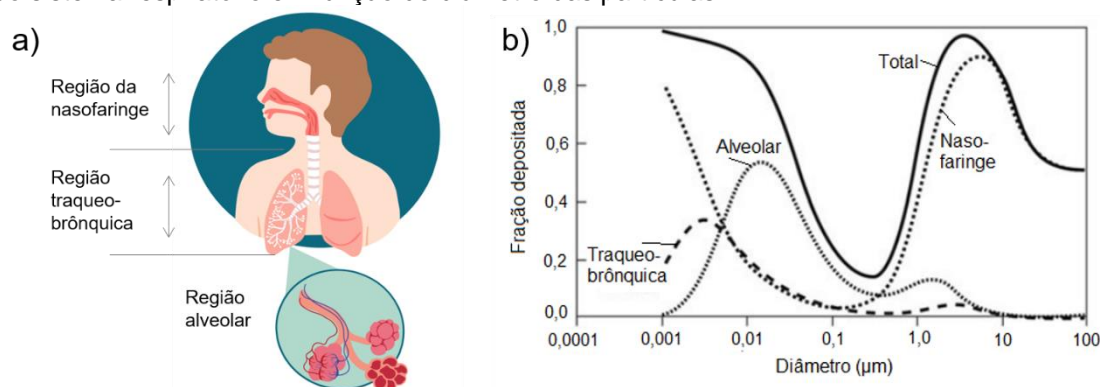


Fonte: adaptado de Finlayson-Pitts; Pitts Jr (1999).

A convenção atual dos órgãos de gestão pública para monitoramento da qualidade do ar é de quantificar duas frações de tamanho do MP:  $D \leq 10 \mu\text{m}$  ( $\text{MP}_{10}$ ) e

$\leq 2,5 \mu\text{m}$  ( $\text{MP}_{2,5}$ ), também chamadas de partículas inaláveis e respiráveis, respectivamente (WHO, 2021). Esses termos se referem à profundidade de penetração no trato respiratório, em que as partículas da fração inalável são capazes de penetrar e se depositar no sistema respiratório superior (região da nasofaringe), enquanto as partículas da fração respirável são capazes de alcançar as superfícies dos alvéolos pulmonares, onde acontece a troca de gases, alcançando assim a corrente sanguínea (Figura 2).

**Figura 2** - (a) Ilustração das regiões do sistema respiratório. (b) Previsão da deposição total e por região do sistema respiratório em função do diâmetro das partículas



Fonte: (a) elaborado pela autora no programa gráfico canva.com. (b) adaptado de Kuempel et al. (2015).

O  $\text{MP}_{2,5}$  também é frequentemente chamado de MP fino ou fração fina. Já o MP com D entre 2,5 e 10  $\mu\text{m}$  é chamado de MP grosso ou fração grossa. Como mencionado anteriormente, o MP com  $D \leq 100 \text{ nm}$  é considerado a fração ultrafina e geralmente é quantificado por número, em vez de massa. As partículas ultrafinas são um subconjunto do  $\text{MP}_{2,5}$ , que por sua vez é um subconjunto do  $\text{MP}_{10}$ .

Na Tabela 1, estão apresentados alguns exemplos de valores diretrizes de qualidade do ar para  $\text{MP}_{10}$  e  $\text{MP}_{2,5}$  preconizados por órgãos ambientais pelo mundo. Os valores recomendados pela OMS são os mais recentes e também os mais restritivos. Em outubro de 2022, a Comissão Europeia propôs revisões à sua diretriz visando tornar os índices de qualidade do ar da União Europeia mais próximos aos valores recomendados pela OMS, mas ainda não foram aprovadas (BELOCONI; VOUNATSOU, 2023). Nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental (US-EPA) também estuda a atualização dos seus valores, mas somente para a média anual de  $\text{MP}_{2,5}$  que deve passar de 12 a 9,0  $\mu\text{g m}^{-3}$  (US-EPA, 2023). A China segue com padrões mais permissivos, enquanto atualmente a legislação brasileira é a que

mais se aproxima dos valores recomendados pela OMS, dentre as apresentadas na Tabela 1. É importante destacar que ainda existem países em que nenhum padrão de qualidade do ar existe, como é o caso de quase metade dos países africanos (45%) e da região do Pacífico Ocidental (48%) (WHO, 2021).

**Tabela 1** – Valores diretrizes de qualidade do ar para material particulado  $\leq 10 \mu\text{m}$  ( $\text{MP}_{10}$ ) e  $\leq 2,5 \mu\text{m}$  ( $\text{MP}_{2,5}$ ) preconizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS), pela União Europeia (EU), pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA), pelo Ministério de Ecologia e Ambiente da China (MEE – China) e pelo Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) do Brasil

Órgão / ano de publicação	$\text{MP}_{10}$ ( $\mu\text{g m}^{-3}$ )		$\text{MP}_{2,5}$ ( $\mu\text{g m}^{-3}$ )	
	Anual	24 h	Anual	24 h
OMS / 2021	15	45	5	15
UE / 2008	40	50	25	-
UE – proposta de 2022	20	45	10	25
US-EPA / 1990	-	150	12	35
MEE – China / 2012	70	150	35	75
CONAMA / 2018	20	50	10	25

Fontes: OMS, 2021; Diretiva 2008/50/EC da União Europeia; Emendas de 1990 no *Clean Air Act* dos Estados Unidos; MEE – China GB 3095/2012; BRASIL, 2018.

Tais valores estão apenas relacionados ao diâmetro e à concentração em massa das partículas na atmosfera. No entanto, conhecer a composição química do MP também é fundamental para investigar sua toxicidade. Como a associação entre o MP e os efeitos adversos à saúde já está bem estabelecida, a maior lacuna atual no nosso conhecimento está relacionada em entender quais os componentes e/ou quais das suas características físicas e químicas são responsáveis pela toxicidade do MP (KELLY; FUSSELL, 2012).

#### 1.4 Composição química e toxicidade do material particulado

O MP constitui-se numa mistura complexa e heterogênea de diferentes compostos orgânicos e inorgânicos, que variam no tempo e espaço, de acordo com suas fontes de emissão e os processos físicos e químicos que sofrem na atmosfera. Os principais componentes do MP, que juntos, no geral, representam a maior fração da massa são os sais de sulfato, nitrato e amônio, cloretos, carbono elementar e orgânico, componentes minerais (como silicatos e óxidos de alumínio, cálcio e ferro), além de materiais biológicos como esporos, pólen, bactéria e vírus. Além disso,

---

existem os componentes presentes em níveis traços, como metais e compostos orgânicos (HARRISON; YIN, 2000).

A identidade dos componentes do MP responsáveis pelos efeitos adversos e os mecanismos biológicos envolvidos ainda não estão completamente compreendidos, mas há estudos que apontam o estresse oxidativo, a inflamação, a apoptose, a autofagia e o dano no DNA como os principais mecanismos relacionados à toxicidade do MP (KELLY; FUSSELL, 2012; FENG et al., 2016; LI et al., 2022).

O estresse oxidativo é decorrente do desequilíbrio entre a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e a capacidade antioxidante da célula. O excesso de ERO pode danificar proteínas, lipídeos e a membrana celular, causando inflamação, e também pode ocasionar danos ao DNA, levando a problemas na proliferação celular (LI; XIA; NEL, 2008). Há diversos compostos do MP que são capazes de induzir a formação de ERO e levar ao estresse oxidativo, como os metais de transição ferro, cobre, níquel, cromo, cobalto e vanádio, que geram radicais livres via reação Fenton (FENG et al., 2016). Além dos metais, constituintes orgânicos como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e quinonas, derivadas oxigenadas dos HPA (oxi-HPA), podem induzir a produção de ERO via ciclo redox (CLERGÉ et al., 2019; MALLAH et al., 2022).

O efeito carcinogênico do MP está principalmente associado ao seu potencial genotóxico, isto é, à sua capacidade de causar dano ao DNA, seja por danos oxidativos por excesso de ERO ou pela formação de adutos entre o DNA e compostos orgânicos (QUEZADA-MALDONADO et al., 2021). Os HPA e seus derivados têm recebido atenção especial devido seu potencial mutagênico e carcinogênico.

### **1.5 Compostos Policíclicos Aromáticos**

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) compõem uma ampla classe de compostos orgânicos constituídos por átomos de carbono e hidrogênio, cuja estrutura química é formada por dois ou mais anéis aromáticos condensados. Os HPA são formados a partir da combustão incompleta de todo tipo de material orgânico, e estão presentes não somente na atmosfera, mas em diversos compartimentos ambientais, como água, sedimento e solo (KIM et al., 2013).

As fontes naturais de HPA incluem erupções vulcânicas e incêndios florestais naturais, e correspondem a uma pequena fração das emissões totais. As principais

---

---

fontes de HPA são antrópicas, e incluem a queima de biomassa, emissão de queima de combustíveis por automóveis, geração de energia industrial, incineradores e produção de alcatrão, coque e asfalto (ZHANG; TAO, 2009).

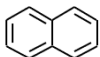
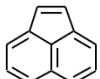
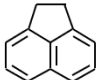
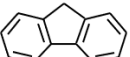
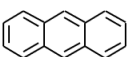
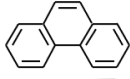
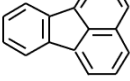
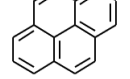
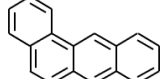
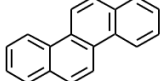
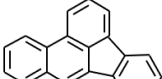
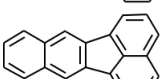
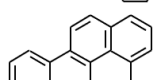
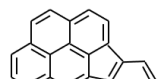
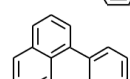
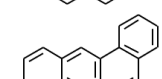
Embora centenas de HPA sejam atualmente conhecidos, a maioria dos estudos de exposição e poluição atmosférica ambiental concentram-se em 16 compostos prioritários listados pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA) na década de 1970 (KEITH, 2015). A lista foi baseada na ocorrência dos HPA no meio ambiente, na sua toxicidade e na disponibilidade de padrões e métodos analíticos na época, mas sua relevância atual tem sido questionada por vários autores (ANDERSSON; ACHTEN, 2015; SAMBUROVA; ZIELINSKA; KHLYSTOV, 2017; DA SILVA JUNIOR et al., 2021). Isso porque atualmente as técnicas analíticas estão mais avançadas, possibilitando a determinação de vários compostos simultaneamente com elevada precisão e exatidão, e além disso, já se sabe da existência de outros HPA que são relevantes em termos de toxicidade, como alguns HPA alquilados e dibenzopirenos (DA SILVA JUNIOR et al., 2021).

Por ser uma classe diversa, as propriedades físico-químicas dos HPA, como volatilidade e lipofilicidade, assim como os efeitos biológicos, podem variar significativamente de acordo com a estrutura e a massa molecular (KIM et al., 2013). Na Tabela 2 estão apresentadas as estruturas moleculares dos 16 HPA prioritários, juntamente com a massa molecular e algumas propriedades, como a temperatura de ebulição, a pressão de vapor e o coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ), que é uma medida de lipofilicidade. Na Tabela 2 também estão apresentadas as classificações de cada composto de acordo com a IARC.

De forma geral, conforme a massa molecular dos HPA aumenta, a temperatura de ebulição aumenta e a pressão de vapor diminui, indicando uma variação de volatilidade conforme a massa molecular e o número de anéis aromáticos. Assim, os HPA com baixa massa molecular, com 2 e 3 anéis aromáticos, são mais voláteis e estão presentes em maior proporção na fase gasosa do que na fase particulada (Figura 3). Enquanto os HPA de massa molecular maior (4 e 5 anéis aromáticos ou mais) estão presentes principalmente na fase particulada, por serem menos voláteis.

---

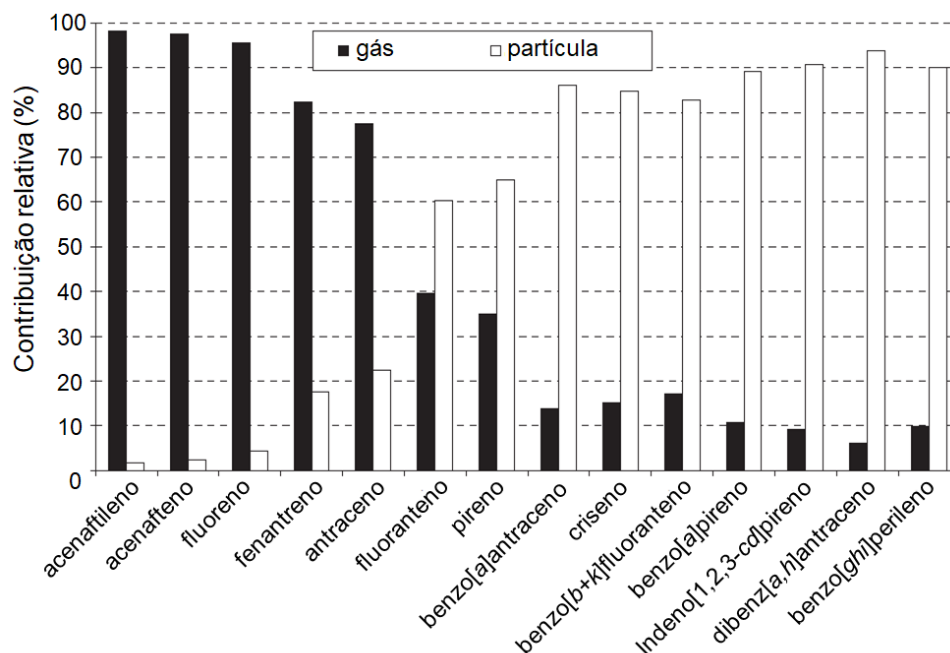
**Tabela 2** - Estrutura molecular, massa molecular (MM), temperatura de ebulição (Tebulição), pressão de vapor (P<sub>v</sub>) a 25 °C, logaritmo da constante de partição octanol-água (K<sub>ow</sub>), e classificação de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) dos 16 hidrocarbonetos policíclicos aromáticos considerados prioritários pela US-EPA

Nome do composto	Estrutura	MM (u)	T <sub>ebulição</sub> (°C)	P <sub>v</sub> a 25 °C (Pa)	Log K <sub>ow</sub>	Grupo IARC <sup>a</sup>
Naftaleno		128	218	1,4	3,40	-
Acenaftileno		152	265-275	8,8 x 10 <sup>-1</sup>	4,07	-
Acenafteno		154	279	2,9 x 10 <sup>-1</sup>	3,92	-
Fluoreno		166	293-295	8,0 x 10 <sup>-2</sup>	4,18	3
Antraceno		178	340	1,1 x 10 <sup>-3</sup>	4,50	3
Fenantreno		178	342	1,6 x 10 <sup>-3</sup>	4,60	3
Fluoranteno		202	375	1,2 x 10 <sup>-3</sup>	5,22	3
Pireno		202	393	6,0 x 10 <sup>-4</sup>	5,18	3
Benzo[a]antraceno		228	400	2,8 x 10 <sup>-5</sup>	5,16	2B
Criseno		228	448	8,4 x 10 <sup>-5</sup>	5,91	2B
Benzo[b]fluoranteno		252	481	6,7 x 10 <sup>-5</sup>	6,12	2B
Benzo[k]fluoranteno		252	480	1,3 x 10 <sup>-5</sup>	6,84	2B
Benzo[a]pireno		252	496	7,3 x 10 <sup>-7</sup>	6,50	1
Indeno[1,2,3-cd]pireno		276	524	1,3 x 10 <sup>-8</sup>	6,58	2B
Benzo[ghi]perileno		276	536	1,4 x 10 <sup>-8</sup>	7,10	3
Dibenz[a,h]antraceno		278	545	1,3 x 10 <sup>-8</sup>	6,50	2A

<sup>a</sup> grupo 1 – carcinogênico aos humanos; grupo 2A – provavelmente carcinogênico aos humanos; grupo 2B – possivelmente carcinogênico aos humanos; grupo 3 – não é classificado quanto à carcinogenicidade devido a evidências experimentais limitadas ou inadequadas.

Fontes: Cheruyiot et al. (2015); Jameson (2019).

**Figura 3** - Contribuição relativa em porcentagem dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos para as fases gasosa e particulada de amostras coletadas em Campo Grande – MT, Brasil



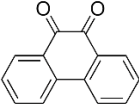
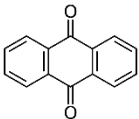
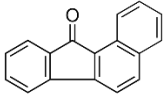
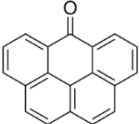
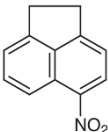
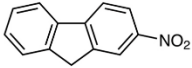
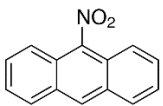
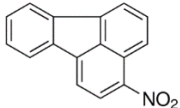
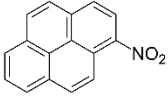
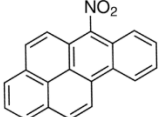
Fonte: adaptado de Ré-Poppi e Santiago-Silva (2005).

Os HPA de maior massa molecular são mais lipofílicos, e apresentam maior caráter carcinogênico que os HPA de menor massa molecular. Apesar de menos tóxicos, os HPA de baixa massa molar podem sofrer reações de oxidação ou nitração, gerando os oxi e nitro-HPA, que por sua vez, podem apresentar maior caráter mutagênico e/ou carcinogênico do que suas moléculas de origem (FRANCO et al., 2010).

Oxi e nitro-HPA têm substituições de um ou mais átomos de hidrogênio pelos grupos funcionais carbonila e nitro, respectivamente. Além de serem produtos de reações secundárias na atmosfera, os derivados oxigenados e nitrogenados dos HPA podem ser emitidos diretamente para a atmosfera juntamente com os HPA não-substituídos durante a combustão incompleta de combustíveis fósseis e biomassa. A combustão de diesel tem sido relatada como uma importante fonte de nitro-HPA para a atmosfera (ABBAS et al., 2018; IDOWU et al., 2019). Comparados aos HPA não-substituídos correspondentes, oxi e nitro-HPA possuem pressões de vapor mais baixas e, conseqüentemente, uma maior tendência a permanecer na fase particulada.

Na Tabela 3, estão apresentados alguns exemplos de derivados oxi e nitrogenados dos HPA, juntamente com suas respectivas massas moleculares e algumas propriedades físico-químicas.

**Tabela 3** - Estrutura molecular, massa molecular (MM), temperatura de ebulição (Tebulição), pressão de vapor (P<sub>v</sub>) a 25 °C, logaritmo da constante de partição octanol-água (K<sub>ow</sub>), e classificação de acordo com a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) de alguns derivados oxi e nitrogenados dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Nome do composto	Estrutura	MM (u)	T <sub>ebulição</sub> (°C)	P <sub>v</sub> a 25 °C (Pa)	Log K <sub>ow</sub>	Grupo IARC <sup>a</sup>
<i>Oxi-HPA</i>						
9,10-fenantrenoquinona		208	360	3,1 x 10 <sup>-4</sup>	2,52	-
9,10-antraquinona		208	380	1,1 x 10 <sup>-4</sup>	3,34	-
Benzo[a]fluorenona		230	403	5,1 x 10 <sup>-5</sup>	4,73	-
6H-benzo[cd]piren-6-ona		254	509	2,3 x 10 <sup>-8</sup>	5,31	-
<i>Nitro-HPA</i>						
5-nitroacenafteno		199	279	5,5 x 10 <sup>-3</sup>	3,85	-
2-nitrofluoreno		211	496	1,3 x 10 <sup>-3</sup>	3,37	2B
9-nitroantraceno		223	543	1,8 x 10 <sup>-4</sup>	4,78	-
3-nitrofluoranteno		247	446	7,4 x 10 <sup>-6</sup>	4,75	-
1-nitropireno		247	587	7,4 x 10 <sup>-6</sup>	5,06	2A
6-nitrobenzo[a]pireno		297	525	4,1 x 10 <sup>-8</sup>	5,93	-

<sup>a</sup> grupo 1 – carcinogênico aos humanos; grupo 2A – provavelmente carcinogênico aos humanos; grupo 2B – possivelmente carcinogênico aos humanos; grupo 3 – não é classificado quanto à carcinogenicidade devido a evidências experimentais limitadas ou inadequadas.

Fontes: Wei et al. (2015); Bandowe e Meusel (2017); Idowu et al. (2019).

A 9,10-antraquinona é um dos oxi-HPA mais abundantes no MP e pode estar presente na atmosfera urbana em concentrações comparáveis a dos HPA não-substituídos. O composto 6H-benzo[cd]piren-6-ona demonstrou ser mutagênico e



---

uma forte promotora de tumores em linhagens celulares humanas (CLERGÉ et al., 2019). O 9-nitroantraceno é um dos nitro-HPA mais abundantes no MP atmosférico (BANDOWE; MEUSEL, 2017). Alguns nitro-HPA já foram classificados como provavelmente ou possivelmente carcinogênicos para os seres humanos pela IARC: 1-nitropireno e 2-nitrofluoreno (IARC, 2012; Tabela 3). Já o 3-nitrofluoranteno apresentou atividade mutagênica em *Salmonella typhimurium* (IDOWU et al., 2019).

## 1.6 Efeitos biológicos dos HPA

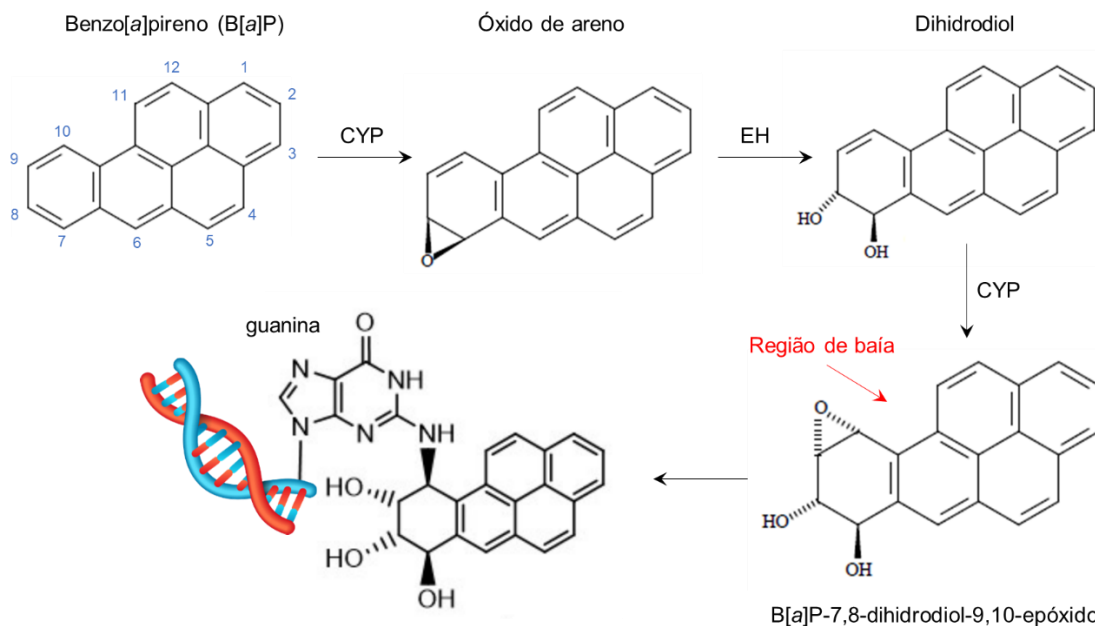
Devido à sua lipofilicidade, os HPA podem atravessar as membranas celulares por difusão passiva após a absorção e/ou inalação (MOORTHY; CHU; CARLIN, 2015). A presença de HPA já foi detectada em praticamente todos os órgãos, mas especialmente naqueles ricos em tecido adiposo, os quais podem atuar como depósitos para a liberação gradual desses compostos (PASTOR-BELDA et al., 2019; MALLAH et al., 2022).

Os HPA não-substituídos são considerados pró-carcinógenos, pois não induzem diretamente danos ao DNA. Em vez disso, é a transformação em seus metabólitos carcinogênicos que contribui para os seus efeitos biológicos adversos (MOORTHY; CHU; CARLIN, 2015).

O benzo[a]pireno (B[a]P) é o HPA mais estudado até hoje e o que tem o mecanismo de ativação melhor estabelecido. As enzimas do citocromo P450, principalmente as isoformas CYP1A1, CYP1A2 e CYP1B1 oxidam o B[a]P formando um óxido de areno (Figura 4). O óxido de areno é transformado em um dihidrodiol pela enzima epóxido hidrolase (EH), que é novamente oxidado pelas enzimas CYP formando o diol epóxido. O dihidrodiol pode ser formado em diversas posições da molécula. No entanto, a molécula de B[a]P possui uma região chamada de “região de baía”, na qual o carbono tem uma grande eletrofilicidade e reatividade. Além disso, por causa do impedimento estérico, as enzimas não conseguem dar continuidade à oxidação do diol epóxido. Sendo assim, o diol epóxido formado nesta região se torna bastante tóxico, pois se liga à base guanina do DNA covalentemente, formando um aduto. Esse aduto atrapalha a replicação celular, e se não for reparado, pode levar à formação de mutações (Figura 4). Esse mecanismo foi proposto pela primeira vez em 1982 por Conney (CONNEY, 1982).

---

**Figura 4** - Esquema do mecanismo de ação do benzo[*a*]pireno (B[a]P) via formação de diol epóxidos por meio das enzimas do citocromo P450 (CYP) e epóxido hidrolase (EH)



Fonte: elaborado no programa ChemSketch pela própria autora, baseado em Conney (1982).

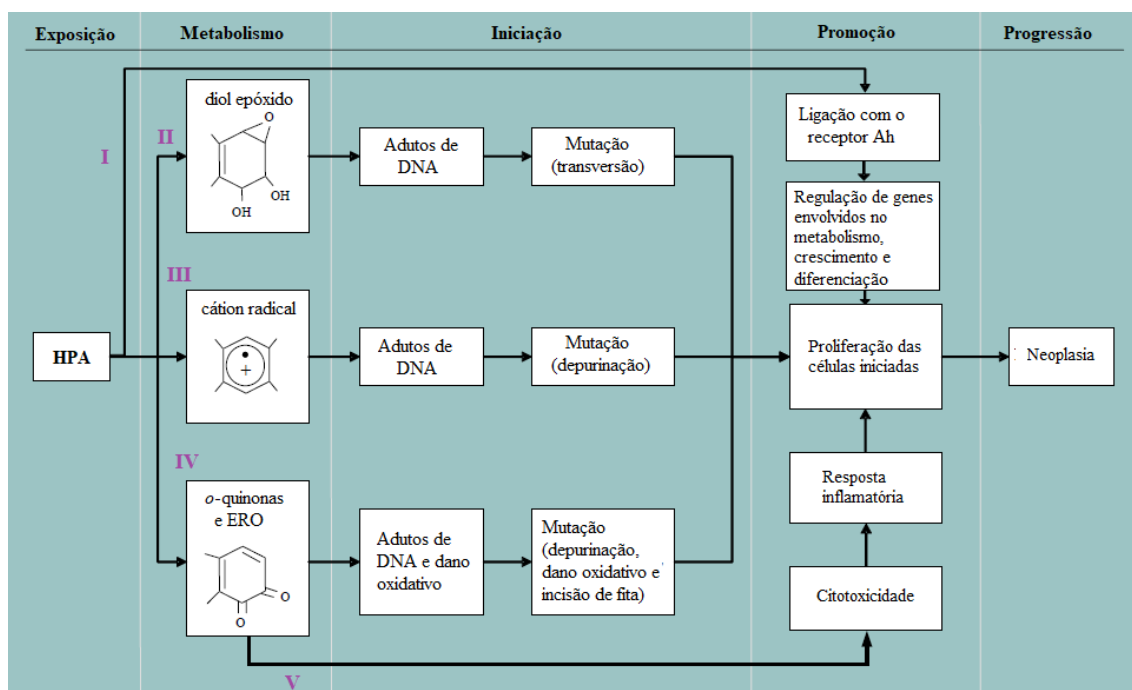
Os metabólitos reativos dos HPA também podem induzir a formação de adutos de proteínas nas células, o que pode afetar as atividades normais dessas proteínas. Os metabólitos dos HPA também podem desencadear um aumento nas espécies reativas de oxigênio (ERO), as quais podem afetar diretamente o DNA, os lipídios, ou as proteínas e iniciar a carcinogênese.

A carcinogênese química, ou seja, o processo de formação do câncer pela exposição a agentes químicos, está intrinsecamente ligada com mecanismos de mutagênese. Após a exposição ao carcinógeno, este é transformado em metabólitos ativos que levam a mutações (etapa da iniciação). Na etapa seguinte, chamada de promoção, as células transformadas sofrem alterações genéticas e crescem descontroladamente. Por fim, a etapa de progressão consiste na manifestação da neoplasia (câncer clínico) (RIBEIRO; MARQUES, 2003).

Atualmente, sabe-se da existência de pelo menos três mecanismos que explicam o processo de iniciação do câncer devido à exposição aos HPA (Figura 5). O primeiro deles é pela formação dos diol epóxidos, como explicado anteriormente (Figura 5 – II). Além disso, a metabolização dos HPA também pode levar à formação de cátions radicais, que formam adutos de DNA e geram depurinação (Figura 5 – III), e de *orto*-quinonas, que entram em ciclo redox com a forma catecol e geram espécies

reativas de oxigênio (ERO), levando a danos oxidativos no DNA (Figura 5 – IV). O excesso de ERO pode levar à morte celular e à resposta inflamatória (Figura 5 – V) (USEPA, 2010). Além das lesões no DNA induzidas por ERO, as *orto*-quinonas de HPA também podem modificar o DNA de forma covalente, resultando em adutos (PENNING, 2017). Já foi visto que a *orto*-quinona B[a]P-7,8-diona forma adutos estáveis com as bases guanina e adenosina em células pulmonares humanas (HUANG; BLAIR; PENNING, 2013). Muitos HPA, incluindo o B[a]P, são ligantes para o receptor de aril hidrocarboneto (AhR), que tem diferentes funções envolvidas no metabolismo, incluindo a indução da metabolização pelas enzimas CYP (Figura 5 – I) (JARVIS et al., 2014). Dessa forma, o próprio HPA induz sua metabolização ao se ligar ao receptor AhR (GOEDTKE et al., 2021).

**Figura 5** - Esquema dos principais eventos-chave relacionados à carcinogenicidade dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA)



Fonte: adaptado de USEPA (2010).

## 1.7 Resposta ao dano no DNA

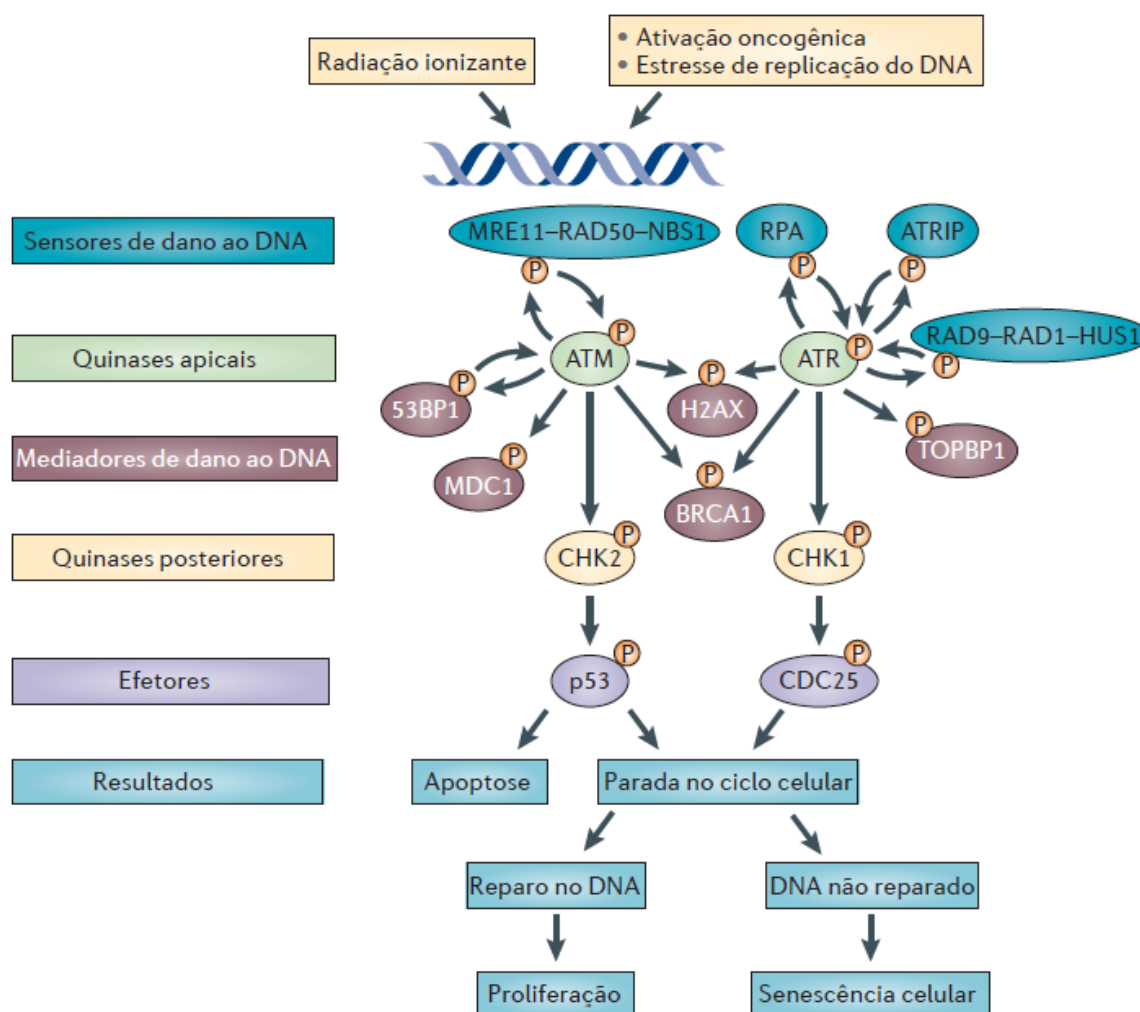
O DNA é uma molécula altamente estável, já que é nela que as informações genéticas estão armazenadas. No entanto, o DNA é suscetível a estresse genotóxico, seja de fontes endógenas, como o ataque por espécies reativas de oxigênio

produzidas pelo metabolismo normal, ou de fontes exógenas, como exposição a mutágenos ambientais. Para preservar as informações codificadas no DNA, as células possuem uma maquinaria complexa que responde aos danos no DNA.

A resposta ao dano no DNA (DDR) envolve múltiplas proteínas com diferentes funções. Sensores detectam lesões no DNA e ativam uma cascata de transdutores de sinal, resultando na ativação de efetores que iniciam a resposta apropriada, como a parada do ciclo celular e reparo do DNA, ou apoptose (RAY; FRY, 2015).

A via de DDR é composta por dois sensores principais: o complexo MRE11–RAD50–NBS1 (MRN), que detecta quebras de dupla hélice no DNA, e a proteína de replicação A (RPA) e o complexo RAD9–RAD1–HUS1 (9-1-1), que detectam regiões expostas de DNA de fita simples (SULLI; DI MICCO; DI FAGAGNA, 2012; Figura 6).

**Figura 6** - Esquema das vias de resposta ao dano no DNA.



Fonte: Sulli, Di Micco e Di Fagagna (2012).

O complexo MRN recruta a quinase apical ataxia telangiectasia mutada (ATM), enquanto a RPA e o complexo 9-1-1 recrutam a proteína relacionada à ataxia telangiectasia e Rad3 (ATR). As quinases ATR e ATM ativam (por fosforilação) a variante de histona H2AX na posição Ser139 (conhecida como  $\gamma$ H2AX) próximo à lesão no DNA (BURMA et al., 2001; WARD; CHEN, 2001). Modificações de histonas desempenham um papel importante na resposta ao dano no DNA; a fosforilação da histona H2AX é amplamente aceita como marcador de dano no DNA (FERNANDEZ-CAPETILLO et al., 2004).

Além de H2AX, outros mediadores de danos no DNA, como MDC1, BRCA1 e 53BP1, sustentam e amplificam o sinal da resposta ao dano no DNA. Eventualmente, o sinal da resposta ao dano no DNA se propaga para longe do local danificado devido à ativação de quinases posteriores Chk2 (principalmente fosforilado por ATM) e Chk1 (principalmente fosforilado por ATR), convergindo em efetores, como p53 e as fosfatases da divisão celular 25 (CDC25). Os resultados celulares mediados pela DDR podem ser: morte celular por apoptose; parada transitória do ciclo celular seguida de reparo do DNA e retomada da proliferação; ou senescência celular causada pela persistência de danos no DNA não reparados (SULLI; DI MICCO; DI FAGAGNA, 2012).

Assim como a histona H2AX, a checkpoint quinase 1 (Chk1), é um potencial marcador para danos no DNA (DAI; GRANT, 2011). Dessa forma, as concentrações de ambas as proteínas já foram propostas como eficientes *endpoints* para monitorar danos no DNA após a exposição a agentes genotóxicos, como os HPA (AUDEBERT et al., 2012; DREIJ et al., 2017).

## **1.8 Avaliação do risco da exposição aos HPA**

Devido ao seu elevado potencial mutagênico e carcinogênico, o B[a]P é frequentemente utilizado como um marcador da exposição total dos HPA presentes em misturas complexas. Outra metodologia para avaliar o potencial risco decorrente da exposição a uma mistura de HPA, é baseada na soma da contribuição de cada HPA normalizado por fatores de equivalência relativos ao B[a]P (JUNG et al., 2010). A partir dessa metodologia, obtém-se a concentração de B[a]P equivalente (B[a]P<sub>eq</sub>), calculada a partir da Equação 1.

---

$$B[a]P_{eq} = \sum_i^{n=i} (C_i \times Fator_i) \quad (1)$$

Onde  $B[a]P_{eq}$  é a concentração de B[a]P equivalente,  $C_i$  é a concentração de cada HPA individual e  $Fator_i$  é o fator de equivalência. Os fatores de equivalência foram propostos a partir dos resultados de ensaios *in vivo*, ao comparar efeitos, como a formação de tumores em roedores, do HPA em estudo em relação ao B[a]P (AQUILINA; HARRISON, 2023). Na literatura são frequentemente utilizados o fator TEF de toxicidade equivalente (*toxicity equivalence factor*) (NISBET; LAGOY, 1992) ou o fator RPF de potencial relativo (*relative potency factor*) (USEPA, 2010). Na Tabela 4 estão apresentados os valores de TEF e RPF de cada um dos 16 HPA prioritários selecionados pela US-EPA.

**Tabela 4** - Fatores de equivalência TEF (*toxicity equivalence factor*), RPF (*relative potency factor*) e grupo IARC para cada um dos 16 HPA prioritários da US-EPA

16 HPA prioritários (US-EPA)	TEF	RPF	Grupo IARC
Naftaleno	0,001		-
Acenaftileno	0,001		-
Acenafteno	0,001		-
Fluoreno	0,001		3
Fenantreno	0,001		3
Antraceno	0,01		3
Fluoranteno	0,001	0,08	3
Pireno	0,001		3
Benzo[a]antraceno	0,1	0,2	2B
Criseno	0,1	0,1	2B
Benzo[b]fluoranteno	0,1	0,8	2B
Benzo[k]fluoranteno	0,1	0,03	2B
<b>Benzo[a]pireno</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
Indeno[1,2,3- <i>cd</i> ]pireno	0,1	0,07	2B
Dibenz[a,h]antraceno	5	10	2A
Benzo[ghi]perileno	0,01	0,009	3

Fontes: Nisbet e Lagoy (1992); USEPA (2010).

Ao utilizar esses fatores, assume-se que o risco potencial de câncer pela exposição à mistura de HPA é aditivo, e não se considera outros efeitos de interação, o que provavelmente subestima o real risco de exposição para a saúde humana (JARVIS et al., 2013). Outra limitação desta abordagem é relacionada à disparidade encontrada entre os valores de TEF ou RPF para os HPA individuais, além do fato que há muitos HPA que ainda não tiveram a atribuição de um fator relativo (JARVIS

---

et al., 2014). Recentemente uma abordagem baseada na avaliação da mistura complexa como um todo, para determinar fatores potenciais de mistura (*mixture potency factors* - MPF) foi proposto, empregando um modelo *in vitro* a partir da resposta ao dano no DNA observado em células HepG2, evitando assim o uso de experimentos com animais (DREIJ et al., 2017; GALVÃO et al., 2022). As células hepáticas do tipo HepG2 foram escolhidas pois contêm muitas das enzimas funcionais envolvidas no metabolismo de várias substâncias químicas tóxicas, incluindo dos HPA (KNASMÜLLER et al., 1998).

Neste modelo, a resposta é monitorada pela concentração da quinase Chk1 e da histona variante H2AX ativadas. Esse modelo pode inclusive ser utilizado para calcular os valores de TEF ou RPF para os HPA individuais, sendo que apresentou uma ótima correspondência com os valores obtidos com ensaios *in vivo* já publicados anteriormente (DREIJ et al., 2017; GALVÃO et al., 2022). Um exemplo de HPA que não possui um valor de TEF ou RPF atribuído é o reteno, um alquil-HPA emitido principalmente pela queima de biomassa.

### 1.9 Reteno

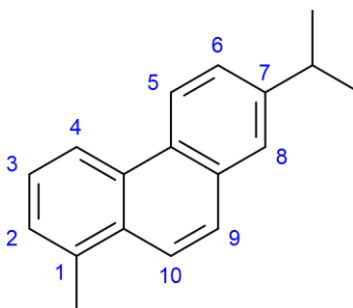
O reteno (1-metil-7-isopropilfenantreno, Figura 7) não está incluído na lista dos 16 HPA prioritários da US-EPA, mas tem sido utilizado como marcador de queima de biomassa desde a década de 1980, quando foi relatado como produto de degradação térmica do ácido abiético, presente na resina de coníferas (RAMDAHL, 1983). No entanto, a utilização do reteno como marcador exclusivo de coníferas tem sido questionado, uma vez que emissões de queima de outros tipos de madeira (incluindo carvalho e eucalipto), carvão e combustíveis veiculares também podem ser fontes importantes deste composto (SHEN et al., 2012; ALVES et al., 2016).

O reteno foi o HPA mais abundante determinado em amostras coletadas na região Amazônica nos anos de 2011 e 2012, e representou, em média, 25% da massa total de HPA nas amostras, alcançando 50% durante o pico da queima (ALVES et al., 2015). Similarmente ao que foi observado na região amazônica, o reteno foi o HPA mais abundante encontrado no MP oriundo de regiões canavieiras no estado de São Paulo em 2010 e 2011, porém em uma concentração média cerca de 18 vezes maior que a relatada no arco do desmatamento da Amazônia (URBAN et al., 2016). Elevadas concentrações de reteno também foram determinada no MP de incêndios

---

florestais no Canadá, Alasca e Groenlândia (YU et al., 2019) e em Portugal (ALVES et al., 2011; VICENTE et al., 2012, 2017). Além disso, o reteno tem sido utilizado como marcador de queima residencial de lenha em áreas urbanas, particularmente durante o inverno (LI et al., 2009; KRUMAL; MIKUSKA; VECERA, 2017).

**Figura 7** - Estrutura química do reteno



Fonte: elaborado no programa ChemSketch pela própria autora.

Apesar de sua relevância, existem poucos estudos sobre os efeitos tóxicos do reteno (DA SILVA JUNIOR et al., 2021). A atividade mutagênica do reteno nas cepas de *Salmonella Typhimurium* TA98, TA97a, TA100 e TA102 (cepas de mutação de substituição de base, mutação de mudança de quadro de leitura/*frameshift*, mutação de transição e mutação de transversão, respectivamente) não foi detectada, com ou sem ativação metabólica exógena (MÖLLER, 2009; PEIXOTO et al., 2019). Apesar disso, estudos com células A549 de pulmão humano indicaram que o reteno causou danos ao DNA, aumentou a frequência de micronúcleos e promoveu a morte celular e o estresse oxidativo (ALVES et al., 2017; PEIXOTO et al., 2019). Em um estudo com células SK-N-SH de neuroblastoma humano, o reteno causou principalmente efeitos relacionados ao estresse oxidativo: aumento nos níveis de ERO, diminuição do potencial de membrana mitocondrial, aumento da peroxidação lipídica e regulação positiva de genes responsivos ao estresse oxidativo (SARMA; BLAIS; CHAN, 2017). Esses resultados são um indicativo da necessidade de se incluir o reteno nos estudos de avaliação de risco dos HPA.

Uma vez que a maioria dos HPA exerce seus efeitos tóxicos após serem metabolizados em intermediários mais reativos e eletrofílicos, é de interesse avaliar os efeitos do reteno usando uma linhagem celular mais competente metabolicamente. Como mencionado na seção anterior, as células de hepatocarcinoma humano HepG2 expressam várias enzimas de fase I e fase II e são capazes de ativar HPA e outros



mutágenos (KNASMÜLLER et al., 1998), e são sugeridas como um bom modelo para estudar a toxicidade de agentes químicos ambientais (JARVIS et al., 2013). De acordo com nossa revisão da literatura, este é o primeiro trabalho a estudar os efeitos tóxicos do reteno em células HepG2 (SCARAMBONI et al., 2023).

### **1.10 Local de estudo**

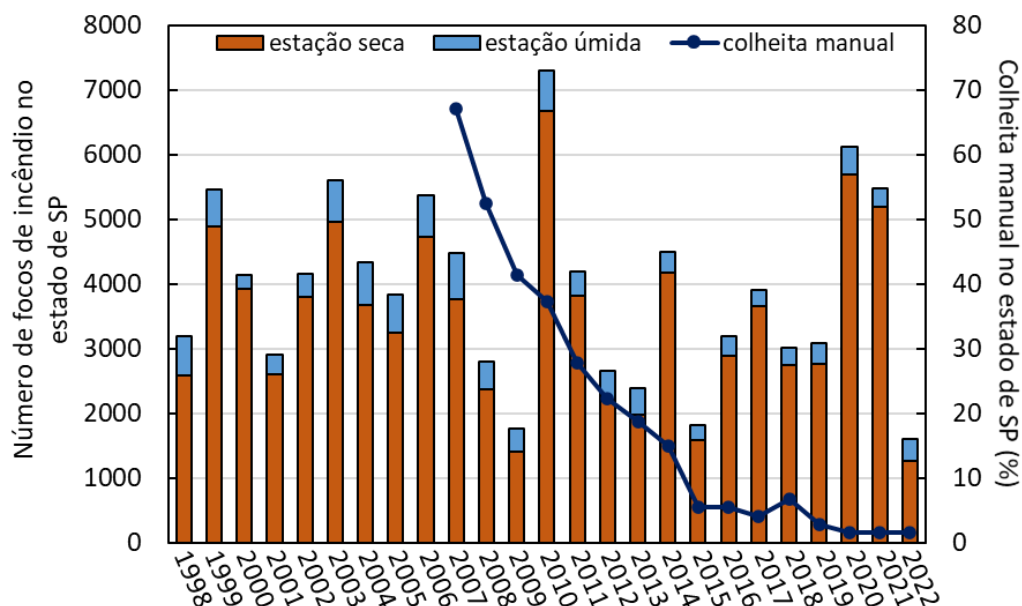
Ribeirão Preto é uma cidade localizada no interior do estado de São Paulo, com uma população de aproximadamente 698 mil habitantes e com cerca de 565 mil veículos (CETESB, 2022; IBGE, 2022), sendo a cidade-sede da Região Metropolitana de Ribeirão Preto, que compreende 34 municípios, com aproximadamente 1,7 milhão de habitantes. As principais atividades econômicas de Ribeirão Preto são a indústria sucroalcooleira e o setor de serviços.

Por décadas, a queima da palha da cana-de-açúcar foi empregada para facilitar a colheita manual na região. Diversos estudos epidemiológicos identificaram problemas respiratórios e cardiovasculares na população afetada pela poluição atmosférica proveniente da queima da palha da cana-de-açúcar (CANÇADO et al., 2006; ARBEX et al., 2010, 2014). Desde 2006, foi implementada uma política pública para substituir progressivamente a colheita manual pela mecânica, sendo que a colheita mecânica representa hoje cerca de 98% do total da colheita 2022/23 (CONAB, 2022).

No entanto, apesar da redução desse tipo de prática, o número de focos de incêndio detectados por satélite acumulados no estado de São Paulo ainda é elevado, sendo que em 2020 e 2021 os números foram praticamente o dobro (6.123 e 5.469 focos) da média dos 9 anos anteriores (3.190 focos; Figura 8). O persistente elevado número de focos de incêndio pode ser atribuído ao uso do fogo para limpeza de terrenos na agricultura, bem como a incêndios florestais acidentais e/ou criminosos em florestas locais e plantações. Essa situação tem sido agravada no contexto das mudanças climáticas, com períodos mais longos de seca e distribuição inadequada de chuvas.

---

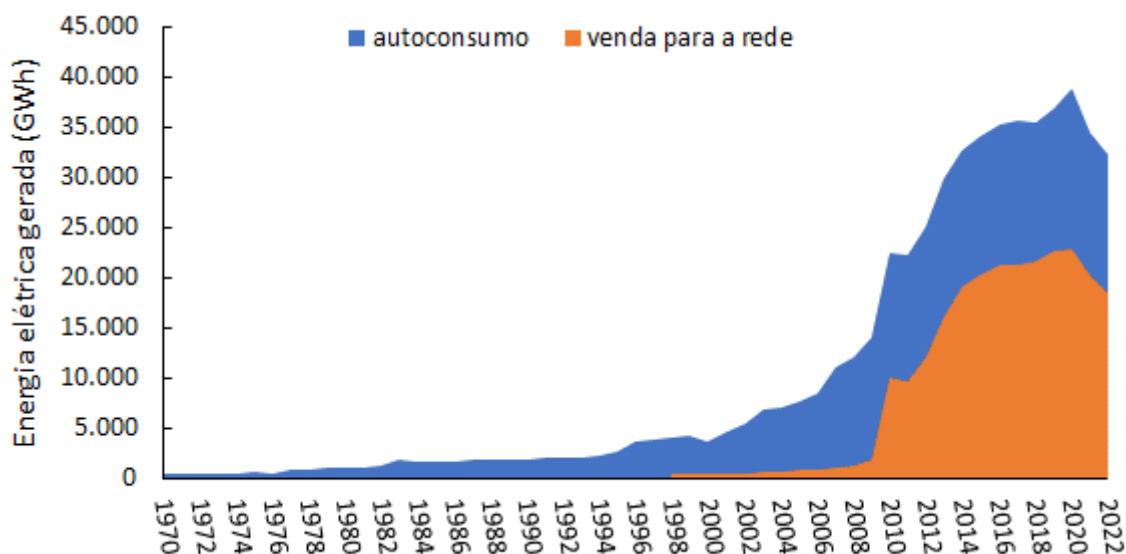
**Figura 8** - Números de focos de incêndio de 1998 a 2021 e porcentagem da colheita manual que utiliza fogo em relação à colheita total



Fontes: UNICA (2022); INPE (2023a).

Outra fonte importante de emissões da queima de biomassa na região de estudo é a utilização do resíduo seco da cana-de-açúcar (bagaço) como combustível da própria indústria canavieira (URBAN et al., 2014). A cogeração de energia elétrica para o autoconsumo é uma prática rotineira nas unidades sucroalcooleiras desde a década de 1970, mas com o aumento da produção, o excedente de energia elétrica passou a ser vendido para o sistema elétrico nacional no final dos anos 1990, e se tornou um negócio para a indústria canavieira (Figura 9). Em 2022, foram gerados 32.261 GWh de energia elétrica pela queima do bagaço da cana-de-açúcar dentro das usinas, sendo que 57% desse total foram vendidos para o sistema elétrico nacional (MME, 2023).

**Figura 9** - Geração de energia elétrica nas usinas sucroalcooleiras pela queima do bagaço da cana-de-açúcar



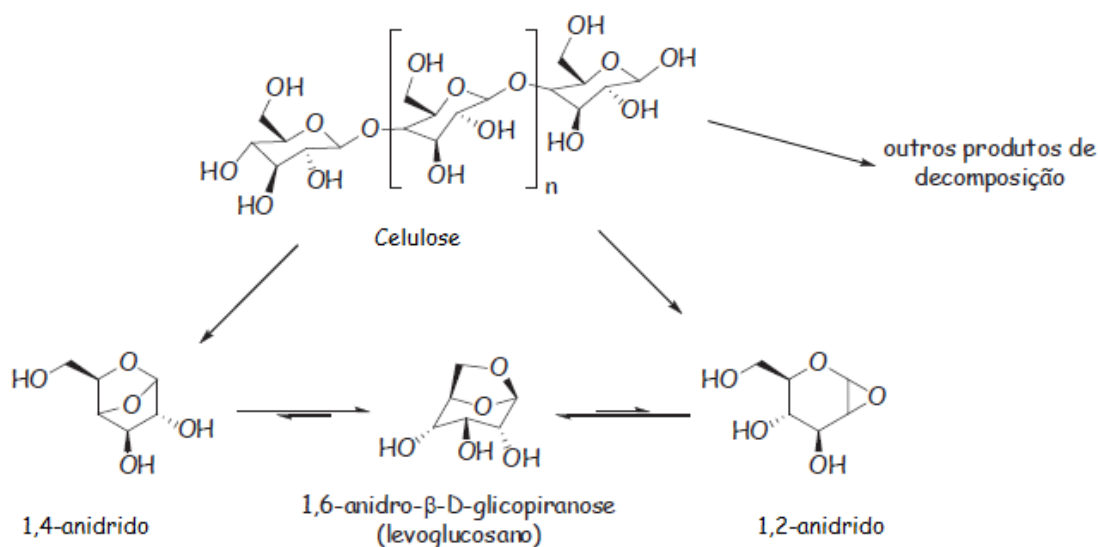
Fonte: MME (2023).

Dada a elevada frequência de incêndios e a elevada densidade populacional, o impacto da queima de biomassa na saúde humana da região precisa de ser melhor investigado.

### 1.11 Determinação de HPA e derivados no material particulado

A queima de biomassa é uma importante fonte de emissões de HPA, portanto a utilização de um traçador químico capaz de identificar esta origem de MP é de grande relevância (URBAN et al., 2014). O levoglucosano é um anidroaçúcar produzido pela pirólise da celulose e foi proposto como um traçador específico para queima de biomassa (SIMONEIT et al., 1999; URBAN et al., 2012). Sua emissão acontece entre 150 e 350 °C, com um máximo em 300 °C (Figura 10). Dessa forma, as temperaturas alcançadas nos processos de cozinhar, assar e tostar não são suficientes para pirolisar os carboidratos a levoglucosano. Por outro lado, acima de 350 °C, os anidroaçúcares podem se degradados (SUCIU; MASIELLO; GRIFFIN, 2019).

**Figura 10** - Esquema da formação de levoglucosano a partir da pirólise ( $150 < T < 350 \text{ }^\circ\text{C}$ ) da celulose



Fontes: Simoneit et al. (1999); Urban (2014).

São poucos os métodos existentes relatados na literatura para extração simultânea de levoglucosano e HPA, antes da determinação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) e envolvem etapas experimentais adicionais, como fracionamento ou uso de um sistema de injeção de dessorção térmica (VAN DROOGE; BALLESTA, 2009; TURAP et al., 2018; VAN DROOGE et al., 2018). Os métodos de extração de HPA relatados na literatura para uso com CG-EM geralmente envolvem o uso de grandes volumes de solventes orgânicos (>300 mL) e procedimentos de extração demorados para permitir a detecção e quantificação dessas moléculas (GUO et al., 2003; MACHADO et al., 2009; MARQUES et al., 2009; GONÇALVES et al., 2011; ALVES et al., 2015; SONG et al., 2018). Métodos de extração que utilizam microvolumes de solvente são adequados apenas para análise de amostras de MP coletadas por amostradores de ar de grande volume, onde há grande massa depositada no filtro de amostragem (SANTOS et al., 2016). Portanto, um método de extração que permita a redução de volumes de solventes orgânicos, o uso de amostradores de baixo volume e a extração quantitativa simultânea de levoglucosano seria altamente desejável.

Com base na revisão da literatura, a hipótese a ser testada nesta tese é de que, apesar da redução da colheita manual da cana-de-açúcar na região de Ribeirão Preto, a queima de biomassa é uma fonte relevante de MP que contém em sua composição espécies químicas que possuem potencial efeito adverso a nível celular e molecular.

## **2 OBJETIVOS**

O objetivo global deste trabalho foi de investigar o impacto da queima de biomassa na emissão de HPA e seus derivados oxi e nitrogenados e na toxicidade *in vitro* do material particulado (MP) atmosférico coletado em Ribeirão Preto.

Para atingir o objetivo global, os seguintes objetivos específicos foram propostos:

- 1) Otimizar e validar um método de extração quantitativa simultânea de HPA, oxi-HPA, nitro-HPA e anidroaçúcares que permita a utilização de quantidades reduzidas de solventes orgânicos, e o uso de amostradores de pequeno volume.
  - 2) Determinar a distribuição de HPA, oxi-HPA, nitro-HPA e anidroaçúcares no MP fracionado por tamanho.
  - 3) Identificar os aportes de HPA, oxi-HPA, nitro-HPA por tráfego de veículos e por queima de biomassa;
  - 4) Avaliar as variações sazonais das concentrações de HPA, oxi-HPA, nitro-HPA e anidroaçúcares, por meio de amostragens nas estações seca e chuvosa;
  - 5) Estimar o risco de desenvolver câncer de pulmão devido à exposição à misturas de HPA utilizando a concentração de benzo[a]pireno como marcador;
  - 6) Avaliar a viabilidade celular e o dano genotóxico ocasionado pela exposição a extratos do MP com tamanho menor que 1  $\mu\text{m}$  em células HepG2.
  - 7) Avaliar a citotoxicidade, genotoxicidade e geração de espécies reativas de oxigênio no meio intracelular ocasionadas pela exposição das células HepG2 ao retno em concentrações ambientalmente relevantes.
-

### **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1 Amostragem do material particulado

As amostras de material particulado foram coletadas em Ribeirão Preto, localizada no nordeste do Estado de São Paulo (Figura 11a), em dois locais de amostragem. O primeiro foi localizado no *campus* da Universidade de São Paulo (-21.161274S, -47.858257O) na periferia da cidade, a cerca de 1 km de distância de plantações de cana-de-açúcar e com mínima circulação de veículos (indicado pela letra “A” na Figura 11b). O segundo foi localizado no centro da cidade (-21.178233S, -47.811086O), em uma área com intenso tráfego de pessoas e veículos (indicado pela letra “B” na Figura 9b).

**Figura 11** - (a) Mapa do Estado de São Paulo com destaque para a localização do município de Ribeirão Preto. (b) Parte do mapa de Ribeirão Preto, com indicação dos locais de amostragem no campus da USP na periferia (A) e no centro da cidade (B)



Fontes: (a) adaptado de Cartas e Mapas - IBGE. (b) Google Maps.

As amostras de material particulado fracionado ocorreram entre janeiro de 2020 e julho de 2021 ( $n = 29$ ), utilizando um impactador MOUDI (*Micro Orifice Uniform Deposit Impactor*, modelo 100S4, MSP Corporation) de 4 estágios com cortes aerodinâmicos de 18, 10, 2,5 e 1,0  $\mu\text{m}$  (Figura 12). Dessa forma, as seguintes frações de tamanho do MP foram coletadas:  $\text{MP}_{>18}$  ( $D > 18 \mu\text{m}$ ),  $\text{MP}_{10-18}$  ( $10 \mu\text{m} < D \leq 18 \mu\text{m}$ ),  $\text{MP}_{2,5-10}$  ( $2,5 \mu\text{m} < D \leq 10 \mu\text{m}$ ),  $\text{MP}_{1,0-2,5}$  ( $1,0 \mu\text{m} < D \leq 2,5 \mu\text{m}$ ), e  $\text{MP}_{1,0}$  ( $D \leq 1,0 \mu\text{m}$ ). O material particulado com tamanho menor que 2,5  $\mu\text{m}$  ( $\text{MP}_{2,5}$ ) foi definido como MP fino, e correspondeu à soma das duas menores frações coletadas ( $\text{MP}_{1,0-2,5} + \text{MP}_{1,0}$ ). O material particulado com tamanho entre 2,5  $\mu\text{m}$  e 10  $\mu\text{m}$  ( $\text{MP}_{2,5-10}$ ) foi definido como MP grosso.



**Figura 12** - Fotos do amostrador MOUDI (a) montado e (b) desmontado com os filtros antes da amostragem. (c) Filtros após a amostragem

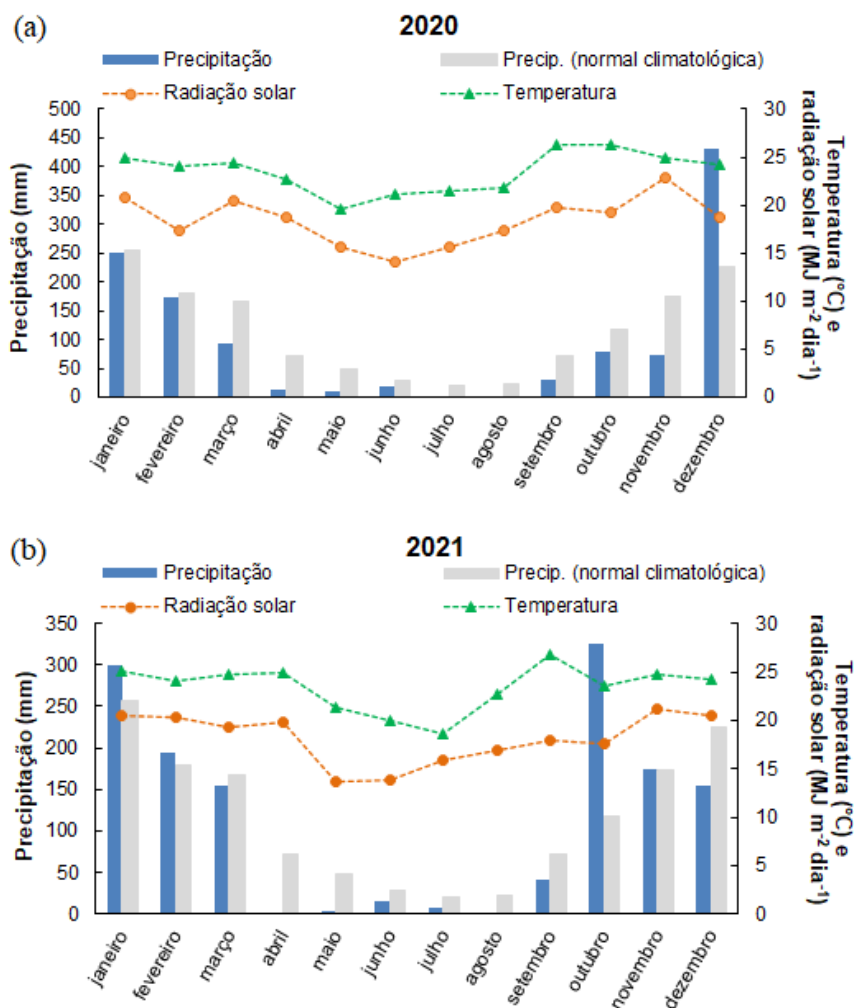


Fonte: a própria autora.

As amostras foram coletadas em membranas de fibra de quartzo (47 mm de diâmetro, Whatman) previamente calcinadas a 600 °C por 6 h. A amostragem foi realizada a uma vazão de  $\sim 30 \text{ L min}^{-1}$ , por 3 a 5 dias, de acordo com a massa de MP esperada (Apêndice A). Após a coleta, as membranas foram embaladas em papel alumínio e sacos plásticos, e armazenadas a -22 °C até extração e análise.

A região de Ribeirão Preto possui clima tropical caracterizado por invernos secos (junho a agosto) e verões chuvosos (dezembro a fevereiro), com variações sazonais modestas de temperatura e radiação solar. As temperaturas médias mensais variam apenas 5,3 °C durante o ano, portanto, as diferenças sazonais geralmente estão relacionadas aos padrões de chuva (CLIMATE-DATA.ORG, 2021). Neste trabalho, a estação seca foi considerada de abril a setembro, enquanto a estação chuvosa foi de outubro a março, com base nos valores mensais de chuva durante o período de amostragem (Figura 13). O ano de 2020 foi considerado um ano seco, com precipitação total de 1.175 mm, abaixo da quantidade normal climatológica de 1.384 mm (CIIAGRO, 2023; CLIMATE-DATA.ORG, 2023). Houve períodos de dias muito quentes e com baixos percentuais de umidade relativa do ar, principalmente durante o mês de setembro, propiciando condições para ocorrência generalizada de focos de queimada, bem como condições para a ressuspensão de poeira do solo (CETESB, 2020). O ano de 2021 também foi um ano seco, pois com exceção do mês de outubro, nos demais meses as precipitações ficaram abaixo das respectivas normais climatológicas.

**Figura 13** - Precipitação acumulada, precipitação normal climatológica (1991-2021), temperatura diária média e radiação solar diária média registradas em Ribeirão Preto nos anos de (a) 2020 e (b) 2021



Fonte: CIIAGRO (2023).

### 3.2 Dados meteorológicos

Os dados meteorológicos de temperatura do ar, umidade relativa do ar, precipitação, velocidade do vento e radiação solar foram obtidos no site do Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas do Estado de São Paulo (CIIAGRO, 2023). As trajetórias de massas de ar foram geradas usando o modelo HYSPLIT (*Hybrid Single Particle Lagrangian Integrated Trajectory*), desenvolvido pelo Laboratório de Recursos Atmosféricos da Administração Nacional Oceânica e Atmosférica (NOAA) (STEIN et al., 2015). Os números dos focos de incêndio no estado de São Paulo foram obtidos no site do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE, 2023b).

### 3.3 Determinação de HPA e derivados

#### 3.3.1 Preparo das soluções padrões

Para a construção das curvas analíticas e para a realização dos testes de recuperação, uma solução estoque padrão contendo todos os HPA, nitro-HPA e oxi-HPA foi preparada em diclorometano:tolueno (1:1) na concentração de 1.000 ng mL<sup>-1</sup> (concentrações individuais). Uma solução estoque de padrão interno contendo os HPA, nitro-HPA e oxi-HPA deuterados também foi preparada em diclorometano:tolueno (1:1) na concentração de 1.000 ng mL<sup>-1</sup>. A lista completa dos padrões utilizados está apresentada na Tabela 5, e os padrões internos utilizados para cada analito estão apresentados na Tabela 6.

**Tabela 5** - Padrões utilizados para a construção das curvas analíticas e nos testes de recuperação

<b>Padrão</b>	
Mistura dos 16 HPA prioritários (naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fenantreno, antraceno, fluoreno, fluranteno, pireno, benz[ <i>a</i> ]antraceno, criseno, benzo[ <i>b</i> ]fluoranteno, benzo[ <i>k</i> ]fluoranteno, benzo[ <i>a</i> ]pireno, indeno[1,2,3- <i>cd</i> ]pireno, dibenz[ <i>a,h</i> ]antraceno, benzo[ <i>ghi</i> ]perileno)	Supelco, 2.000 µg mL <sup>-1</sup>
Mistura de 6 HPA deuterados (1,4-diclorobenzeno- <i>d</i> <sub>4</sub> , naftaleno- <i>d</i> <sub>8</sub> , acenafteno- <i>d</i> <sub>10</sub> , fenantreno- <i>d</i> <sub>10</sub> , criseno- <i>d</i> <sub>12</sub> , perileno- <i>d</i> <sub>12</sub> )	Supelco, 2.000 µg mL <sup>-1</sup>
reteno	SPEX CertiPrep, 1.000 µg mL <sup>-1</sup>
benzo[ <i>e</i> ]pireno	Sigma-Aldrich, 100 µg mL <sup>-1</sup>
9-nitrofenantreno	Dr. Ehrenstorfer GmbH, 10 µg mL <sup>-1</sup>
acetofenona	Sigma-Aldrich, ≥ 99.5%
1-naftaldeído	Sigma-Aldrich, 95%
1,4-benzoquinona	Sigma-Aldrich, > 98%
1,4-naftoquinona	Sigma-Aldrich, ≥ 96.5%
9,10-fenantrenoquinona	Sigma-Aldrich, ≥ 99%
9,10-antraquinona	Acros Organics, 98%
5-nitroacenafteno	Dr. Ehrenstorfer GmbH, 96.4%
2-nitrofluoreno	Sigma-Aldrich, 98%
9-nitroantraceno	Sigma-Aldrich, 93%
benzo[ <i>a</i> ]fluorenona	Sigma-Aldrich, solid, 99.79%
3-nitrofluoranteno	Sigma-Aldrich, 90%
1-nitropireno	Sigma-Aldrich, ≥ 95%
6 <i>H</i> -benzo[ <i>cd</i> ]piren-6-ona	Sigma-Aldrich, 98.8%
6-nitrobenzo[ <i>a</i> ]pireno	Santa Cruz, 99.78%
fluoreno- <i>d</i> <sub>10</sub>	Sigma-Aldrich, ≥ 98%
benzo[ <i>a</i> ]pireno- <i>d</i> <sub>12</sub>	Sigma-Aldrich, ≥ 98%
9,10-antraquinona- <i>d</i> <sub>8</sub>	Santa Cruz, 97%
9-nitroanthracene- <i>d</i> <sub>8</sub>	Toronto Research Chemicals, 99%

Fonte: a própria autora.

**Tabela 6** - Padrões internos utilizados e seus respectivos analitos

<b>Padrões internos deuterados</b>	<b>Analitos</b>
naftaleno- <i>d</i> <sub>8</sub>	naftaleno
acenafteno- <i>d</i> <sub>10</sub>	acenaftileno acenafteno
fenantreno- <i>d</i> <sub>10</sub>	fenantreno antraceno
fluoreno- <i>d</i> <sub>10</sub>	fluoreno
criseno- <i>d</i> <sub>12</sub>	fluoranteno pireno reteno benzo[ <i>a</i> ]antraceno criseno
benzo[ <i>a</i> ]pireno- <i>d</i> <sub>12</sub>	benzo[ <i>a</i> ]pireno benzo[ <i>e</i> ]pireno
perileno- <i>d</i> <sub>12</sub>	benzo[ <i>b</i> ]fluoranteno benzo[ <i>k</i> ]fluoranteno indeno[1,2,3- <i>cd</i> ]pireno dibenz[ <i>a,h</i> ]antraceno benzo[ <i>ghi</i> ]perileno
9,10-antraquinona- <i>d</i> <sub>8</sub>	acetofenona 1-naftaldeído 1,4-benzoquinona 1,4-naftoquinona 9,10-fenantrenoquinona 9,10-antraquinona benzo[ <i>a</i> ]fluorenona 6 <i>H</i> -benzo[ <i>cd</i> ]piren-6-ona
9-nitroantraceno- <i>d</i> <sub>9</sub>	5-nitroacenafteno 9-nitroantraceno 9-nitrofenantreno 3-nitrofluoranteno 1-nitropireno 6-nitrobenzo[ <i>a</i> ]pireno

Fonte: a própria autora.

### 3.3.2 Instrumentação analítica

As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM), modelo GCMS-QP2010 (Shimadzu), localizado no Departamento de Química da UFSCar, com a colaboração da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Roberta Cerasi Urban. A injeção foi feita usando um amostrador automático AOC-20i (Shimadzu) e a coluna utilizada foi uma coluna capilar SLB®-5ms (Sigma-Aldrich). Os parâmetros cromatográficos foram configurados de acordo com o método proposto por Santos et al. (2016), com pequenas alterações. O forno do CG foi programado da seguinte forma: 70 °C (mantido por 2 min); aumento de temperatura de 30 °C min<sup>-1</sup> para 200 °C (por 5 min); aumento de temperatura de 5 °C min<sup>-1</sup> para 320 °C (por 3 min). Gás hélio foi utilizado como gás de arraste, a uma vazão constante de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. O injetor foi operado a 300 °C, em modo *splitless*, com um tempo de

amostragem de 0,80 min. O espectrômetro de massas foi operado no modo de impacto de elétrons, usando energia de ionização de 70 eV, com temperaturas de fonte e interface de 250 e 320 °C, respectivamente. As análises foram realizadas no modo de monitoramento de íons selecionados (SIM). Para cada HPA e derivado, pelo menos dois íons com relações carga/massa ( $m/z$ ) diferentes foram selecionados (Tabela 7).

**Tabela 7** - Fragmentos iônicos utilizados para quantificação e confirmação dos analitos e o tempo de retenção de cada analito

Analito	Íon de quantificação ( $m/z$ )	Íon de confirmação ( $m/z$ )	Tempo de retenção (min)
1,4-benzoquinona	108	110	5,20
acetofenona	105	77	5,43
naftaleno- $d_8$	136	134	6,23
naftaleno	128	127	6,25
1,4-naftoquinona	158	130	7,56
acenaftileno	152	151	7,86
acenafteno- $d_{10}$	164	162	8,03
acenafteno	154	153	8,08
1-naftaldeído	156	127	8,22
fluoreno- $d_{10}$	176	175	8,80
fluoreno	166	165	8,86
9,10-fenantrenoquinona	180	208	10,50
fenantreno- $d_{10}$	188	189	11,09
fenantreno	178	176	11,17
antraceno	178	176	11,33
9,10-antraquinona- $d_8$	216	188	14,14
9,10-antraquinona	180	208	14,23
5-nitroacenafteno	199	152	14,85
fluoranteno	202	101	15,93
2-nitrofluoreno	165	211	16,60
pireno	202	101	16,93
9-nitroantraceno- $d_9$	232	184	17,03
9-nitroantraceno	223	176	17,10
9-nitrofenantreno	165	176	18,46
reteno	219	234	18,47
benzo[a]fluorenona	202	230	20,99
benzo[a]antraceno	228	114	22,68
criseno- $d_{12}$	240	236	22,73
criseno	228	114	22,85
3-nitrofluoranteno	201	247	24,17
1-nitropireno	201	247	25,08
benzo[b]fluoranteno	252	250	27,54
benzo[k]fluoranteno	252	250	27,64
benzo[e]pireno	252	250	28,65
benzo[a]pireno- $d_{12}$	264	260	28,76
benzo[a]pireno	252	250	28,85
6H-benzo[cd]poren-6-ona	254	226	28,83
perileno- $d_{12}$	264	260	29,09
indeno-[1,2,3-cd]-pireno	276	138	33,04
dibenzo[a,h]antraceno	278	139	33,14
benzo[ghi]perileno	276	138	33,91
6-nitrobenzo[a]pireno	267	297; 239	33,46

Fonte: a própria autora.

### 3.3.3 Procedimento de extração e otimização experimental

A otimização experimental do procedimento de extração foi realizada utilizando membranas de fibra de vidro em branco com uma área de 17,3 cm<sup>2</sup> (Gelman Sciences Inc.), que foram dopadas com soluções padrões de HPA, oxi-HPA, nitro-HPA, e os padrões internos deuterados, a uma concentração final de 1,0 µg mL<sup>-1</sup>. As membranas dopadas foram cortadas em pedaços pequenos diretamente em um recipiente de vidro e extraídas com solvente orgânico em um banho de ultrassom (Unique). Quando o procedimento de extração foi repetido, os extratos foram combinados e então evaporados até aproximadamente 0,5 mL sob pressão reduzida (usando um rotaevaporador Büchi). O extrato foi filtrado usando um filtro de politetrafluoretileno (PTFE) com porosidade de 0,22 µm (Analítica) e, em seguida, completamente evaporado sob fluxo de nitrogênio. O material seco foi ressuspense em 100 µL de acetonitrila (Supelco), e 2 µL foram injetados no sistema CG-EM. Para obter as recuperações de cada HPA e derivado, a relação entre as áreas de pico de cada analito e seu respectivo padrão interno foi comparada a uma solução de controle que foi injetada diretamente no CG-EM.

Inicialmente, um planejamento de mistura de três componentes foi utilizado para otimizar os melhores solventes de extração, que eram: acetonitrila, diclorometano e metanol (Merck). Foram realizados dez experimentos de acordo com o planejamento centróide simplex, utilizando pontos axiais. Para avaliar o erro experimental, três réplicas no ponto central foram realizadas, elevando o número total para 12 experimentos. A fim de determinar apenas o efeito dos solventes, o volume total de solvente foi fixado em 3 x 5 mL e o tempo de banho ultrassônico foi fixado em 30 minutos.

Após a seleção do melhor solvente, as condições previamente fixadas no planejamento de mistura foram então otimizadas usando um planejamento fatorial completo (2<sup>3</sup>) com ponto central. Nove experimentos foram realizados, variando o volume do solvente de extração (3,0; 4,0 e 5,0 mL), o número de extrações (1, 2 e 3) e o tempo de ultrassom (10, 20 e 30 minutos). Três réplicas no ponto central foram feitas e o número total de experimentos foi 11. Um refinamento adicional foi feito usando um desenho composto central, no qual as duas variáveis seguintes foram testadas em cinco níveis diferentes: volume do solvente de extração (2,6; 3,0; 4,0; 5,0

e 5,4 mL) e tempo de ultrassom (6, 10, 20, 30 e 34 minutos). Quatro experimentos adicionais foram realizados no processo de refinamento.

As recuperações de todos os analitos foram convertidas em valores entre zero (resposta completamente indesejável) e 1 (resposta desejável), usando uma função de desejabilidade (PEREIRA-FILHO, 2015). A função de desejabilidade utilizada considerou a amplitude do intervalo de recuperação obtido (de 0 a 300%) e o intervalo desejável (de 70 a 130%), e foi calculada de acordo com a Equação 2, onde  $d_i$  representa a desejabilidade individual para cada HPA e  $y$  representa a recuperação.

$$d_i = \left\{ \begin{array}{l} \frac{y}{0,7} \text{ se } y < 0,7 \\ 1 \text{ se } 0,7 < y < 1,3 \\ \frac{3,0 - y}{3,0 - 1,3} \text{ se } y > 1,3 \end{array} \right\} \quad (2)$$

A desejabilidade individual de cada HPA ( $d_i$ ) foi convertida em desejabilidade global ( $Dg$ ) para cada experimento, de acordo com a Equação 3.

$$Dg = \sqrt[k]{d_1 d_2 \dots d_k} \quad (3)$$

Onde  $k$  é o número de desejabilidades individuais.

O valor desejabilidade geral de cada experimento foi então usado para calcular os efeitos e também um único modelo de regressão que representa a melhor condição de extração. O modelo foi calculado usando o software gratuito Octave, na versão *guide user interface* (GUI), com rotinas computacionais propostas por Pereira e Pereira-Filho (2018).

### 3.3.4 Validação do método otimizado

O limite de detecção (LD) foi calculado diminuindo gradualmente a concentração dos analitos até alcançar uma relação sinal-ruído entre 3:1 e 2:1 (ICH, 2005). O LD foi calculado injetando diretamente as soluções padrão no sistema CG-EM e, portanto, os valores de concentração obtidos estão relacionados ao poder de detecção da instrumentação cromatográfica. Já o limite de quantificação (LQ) foi

---

definido como a concentração mais baixa da curva analítica, uma vez que é o nível mínimo em que o analito pode ser quantificado com precisão e exatidão aceitáveis (ICH, 2005).

As curvas analíticas foram construídas em triplicata dopando as membranas de fibra de vidro com diferentes volumes de uma solução padrão contendo todos os HPAs e derivados, e também com um volume fixo da solução padrão contendo os padrões internos (concentração final de 200 ng mL<sup>-1</sup>). As membranas dopadas foram submetidas ao processo de extração completo e após a extração, os extratos foram injetados no CG-EM, e as curvas analíticas foram feitas usando a relação entre as áreas do analito e do padrão interno respectivo *versus* a concentração.

A precisão do método foi avaliada por meio da repetibilidade de 9 determinações diferentes abrangendo a faixa analítica, portanto, o desvio padrão relativo (DPR) foi calculado para 3 réplicas em 3 concentrações diferentes: baixa, média e alta (ICH, 2005).

A exatidão do método otimizado foi avaliada de duas maneiras, por meio do teste de recuperação na matriz da amostra e pela comparação com um método de referência (IUPAC, 2002). O teste de recuperação na matriz da amostra foi realizado utilizando uma amostra de MP<sub>10</sub> coletada pelo grupo de pesquisa da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Roberta C. Urban, na cidade de São Carlos, no dia 27 de abril de 2017, durante 24 horas, com um amostrador de grande volume (modelo GS-2310, Accu-vol). Foi escolhida uma amostra de grande volume para este teste devido à grande área da membrana (509 cm<sup>2</sup>) e maior quantidade de MP coletado, o que permitiu a análise de 3 repetições de 3 concentrações diferentes, conforme sugerido pela IUPAC (2002). Assim, a membrana foi cortada em doze discos de 17,3 cm<sup>2</sup>, sendo três deles extraídos e analisados sem adição de padrão, e aos nove restantes foram adicionadas soluções padrões de HPA e derivados. Três discos foram dopados para uma concentração final de 100 ng mL<sup>-1</sup> (concentração mais baixa da faixa analítica), outros três para 300 ng mL<sup>-1</sup> (concentração intermediária) e os últimos três para 500 ng mL<sup>-1</sup> (concentração mais alta). A recuperação percentual foi calculada subtraindo a concentração da amostra dopada da não dopada.

O teste de exatidão usando o método de referência (ALVES et al., 2011; URBAN et al., 2016) foi realizado usando a fração fina (< 1,0 µm) de duas amostras de MP fracionado, coletadas em paralelo com dois amostradores MOUDI de pequeno volume idênticos. Uma membrana foi extraída com o método otimizado e a outra foi

---



extraída usando o método de referência detalhado por Urban et al. (2016). Resumidamente, a extração de acordo com o método de referência foi realizada em sistema de refluxo com diclorometano (300 mL) por 24 h. O extrato foi transferido para um balão redondo, e a membrana foi novamente extraída com 25 mL de metanol durante 10 min em um banho de ultrassom, por três vezes. Os extratos combinados de diclorometano e metanol (375 mL) foram concentrados até aproximadamente 1 mL sob pressão reduzida, e o extrato final foi filtrado (PTFE, 0,22 µm) e, em seguida, evaporado completamente sob fluxo de nitrogênio ultrapuro. O material seco foi ressuspense em 100 µL de diclorometano, e 2 µL foram injetados no sistema CG-EM. A recuperação percentual foi calculada usando a relação entre as áreas do analito e do padrão interno obtidas para o método otimizado, dividida pela relação obtida para o método de referência.

### 3.4 Avaliação do risco de câncer

A atividade carcinogênica das misturas ambientais de HPA foi expressa em termos da concentração equivalente de benzo[a]pireno ( $B[a]P_{eq}$ ), calculada de acordo com a Equação 4 (USEPA, 2010).

$$B[a]P_{eq} = \sum_i^{n=i} (C_i \times RPF_i) \quad (4)$$

onde,  $C_i$  é a concentração e  $RPF_i$  é o fator de potência relativa dos HPA 'i' individuais classificados como cancerígenos pela IARC. Os valores de RPF foram retirados do documento da USEPA (2010).

O risco de se contrair câncer de pulmão ao longo da vida foi estimado usando o benzo[a]pireno como um composto representativo da mistura de HPA. Dessa forma, multiplicou-se a concentração de benzo[a]pireno pelo valor da unidade de risco de  $8,7 \times 10^{-5}$  por  $ng\ m^{-3}$ , sugerido pela OMS com base em estudos epidemiológicos com trabalhadores de coqueria. Isso significa que aproximadamente 9 em cada 100.000 pessoas podem desenvolver câncer de pulmão quando expostas cronicamente a  $1\ ng\ m^{-3}$  de benzo[a]pireno durante a vida adulta de 70 anos (OMS, 2000).

### 3.5 Determinação dos anidroaçúcares

Para a construção das curvas analíticas e para a realização dos testes de recuperação, uma solução estoque padrão contendo os anidroaçúcares levoglucosano (99%, Sigma-Aldrich), manosano (99%, Toronto Research Chemicals) e galactosano ( $\geq 95\%$ , Cayman Chemicals) foi preparada na concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (concentrações individuais) em metanol. A solução estoque do padrão interno levoglucosano- $^{13}\text{C}$  (98%, Cambridge Isotope Laboratories) foi preparada em metanol na concentração de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Para determinar os anidroaçúcares por cromatografia gasosa, é necessário realizar a etapa de derivatização, para torná-los mais voláteis (MEDEIROS; SIMONEIT, 2007; URBAN et al., 2012). Neste trabalho, a derivatização foi realizada por 3 h, a  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ , adicionando ao extrato seco  $40 \mu\text{L}$  de N,O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) contendo 1% de trimetilclorossilano (TMCS; Sigma-Aldrich) e  $10 \mu\text{L}$  de piridina (Merck). Dessa forma, os derivados de trimetilsilano (TMS) substituem os hidrogênios ácidos por grupos silanóis, reduzindo o ponto de ebulição dos analitos. Após a reação, hexano ( $950 \mu\text{L}$ ) foi adicionado ao extrato derivado, a mistura foi homogeneizada, e  $1 \mu\text{L}$  foi injetado no sistema CG-EM. Os parâmetros cromatográficos para esta análise foram os descritos por Carvalho et al. (2023).

As curvas analíticas foram construídas em triplicata, dopando os filtros de quartzo brancos com diferentes volumes de uma solução padrão contendo os três anidroaçúcares, e também com um volume fixo da solução padrão contendo o padrão interno levoglucosano- $^{13}\text{C}$  (concentração final de  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os filtros dopados foram submetidos ao processo de extração dos HPA otimizado neste trabalho. Após a extração, as curvas foram construídas com a razão entre as áreas do analito e do padrão interno.

O teste de exatidão foi realizado comparando os valores obtidos no filtro final (MP  $< 1,0 \mu\text{m}$ ) extraído com o método otimizado para a extração dos HPA com uma outra porção do mesmo filtro extraído com uma mistura de diclorometano e metanol (1:3 v/v), solventes tradicionais de extração de açúcares, e o procedimento foi realizado de acordo com Carvalho et al. (2023).

---

## 3.6 Ensaios toxicológicos

### 3.6.1 Cultivo de células

As células do tipo HepG2 (*American Type Culture Collection*) foram cultivadas em *Minimum Essential Medium* (MEM, Gibco) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SFB, Gibco), penicilina 100 U mL<sup>-1</sup>, estreptomicina 100 µg mL<sup>-1</sup>, anfotericina 0,25 µmol L<sup>-1</sup> e piruvato de sódio 1 mmol L<sup>-1</sup> (Sigma-Aldrich). O pH da solução foi ajustado para 7,4 com bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich). Os frascos de cultura (área de crescimento de 75 cm<sup>2</sup>) foram mantidos a 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> até atingir confluência entre 70 e 80%, quando foi feita uma subcultura em capela de fluxo laminar, desprendendo as células aderidas no frasco com 5,0 mL de solução de tripsina 10% v/v em solução tampão fosfato pH 7,4 (PBS) estéril. A tripsinização também foi realizada antes do plaqueamento celular, em que um determinado número de células foi adicionado em poços de placas de cultura, a fim de submetê-las às diferentes concentrações das substâncias em estudo. O teste de exclusão com azul de Tripán foi aplicado para verificar o número de células viáveis, que foram contadas em uma câmara de *Newbauer* (FRESHNEY, 2010). Os processos de cultivo de células, tripsinização e plaqueamento, serão realizados conforme descrito detalhadamente por BERNARDES (2016). Todos os ensaios toxicológicos com células HepG2 serão realizados em triplicata, utilizando 3 poços distintos da placa de cultura. Além disso, serão realizados 3 experimentos independentes a fim de obter a triplicata biológica.

### 3.6.2 Exposição das células ao reteno e aos extratos de MP

Inicialmente, foi feita uma estimativa de qual seria a faixa de concentração de reteno a ser utilizada nos ensaios. Para isso, a concentração média de reteno encontrada no material particulado de regiões canavieiras (11,0 ng m<sup>-3</sup>; URBAN et al., 2016) foi multiplicada pelo volume de ar médio inalado por um adulto por dia (16 m<sup>3</sup> dia<sup>-1</sup>; USEPA, 2011), para se obter a quantidade de massa média de reteno que estaria sendo inalada. No entanto, nem toda a massa inalada é depositada nos alvéolos, e por isso, esse valor foi multiplicado por 0,2, que é o fator de deposição alveolar médio de partículas entre 1,0 e 10 µm de diâmetro, predita por um modelo de

---

deposição (HEYDER, 2004). Assim, a massa de reteno que estaria sendo depositada nos alvéolos por dia seria de:

$$\left(11,0 \frac{ng}{m^3}\right) \times 16 m^3 \times 0,2 = 35,2 ng$$

Esse valor de massa encontrado foi dividido pelo volume de meio de cultura que é utilizado no poço da placa de cultura de 96 poços (200  $\mu$ L), e com a massa molar do reteno (234,34 g mol<sup>-1</sup>), calculou-se assim, qual seria a concentração de reteno no poço em  $\mu$ mol L<sup>-1</sup>:

$$C_{poço} = \frac{35,2 ng}{200 \mu L} \times \frac{1 mol}{234,34 g} = 0,75 \mu mol L^{-1}$$

Dessa forma, inicialmente foram escolhidas as concentrações entre 0,05 e 1,0  $\mu$ mol L<sup>-1</sup> para realizar o primeiro ensaio para avaliar a viabilidade celular das células HepG2 após a exposição ao reteno.

Para o preparo das soluções estoque de reteno, a solução padrão de reteno em diclorometano foi seca sob fluxo de nitrogênio e redissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO, >99,5%, Sigma-Aldrich). A concentração de reteno na solução em DMSO foi confirmada por CG-EM. A solução de reteno foi adicionada nos poços da placa de cultura contendo as células de modo que o volume adicionado não ultrapassasse a 1,0% do volume total do poço, pois esta é uma concentração de DMSO segura, que não é tóxica para as células HepG2 (SONG et al., 2012). O tratamento com a concentração final de 1,0% de DMSO não causou diminuição na viabilidade celular após 24 e 48 h nem aumentou danos no DNA (ensaio do cometa) significativamente em comparação com o controle de apenas células e meio de cultura (dados não mostrados, comunicação pessoal com Raul Ghiraldelli Miranda).

Três amostras de MP representativas foram estudadas, sendo duas da estação seca e uma da estação chuvosa. Metade do filtro final contendo MP < 1  $\mu$ m foi extraído usando o mesmo método empregado para a análise química, seco sob fluxo de nitrogênio e redissolvido em DMSO. A concentração final dos extratos orgânicos correspondeu a 1 m<sup>3</sup> de ar amostrado em 1 mL de meio contendo as células. Uma membrana não amostrada foi submetida ao mesmo procedimento de extração, e posteriormente o extrato seco foi redissolvido em DMSO e utilizado como o controle branco nos estudos *in vitro*.

Para o controle negativo, foi adicionado apenas o DMSO na concentração equivalente à utilizada para o reteno e o extrato do MP, e o controle positivo foi feito

---

de acordo com o ensaio aplicado. As células tratadas foram incubadas novamente a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub>.

### 3.6.3 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada utilizando brometo de 3-(4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5 difenil tetrazólio (MTT), um corante que é reduzido por uma enzima presente nas mitocôndrias, gerando um produto colorido (sal de formazan) que foi quantificado por espectrofotometria ( $\lambda = 570$  nm). Essa reação só ocorre em células viáveis e com metabolismo ativo, e dessa forma é possível quantificar indiretamente as células viáveis após a exposição ao agente em estudo (MOSMANN, 1983).

Para esse ensaio, as células HepG2 foram semeadas em placas de 96 poços ( $5 \times 10^4$  células por poço) e incubadas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. Após este período, as células foram tratadas com as diferentes concentrações do reteno e dos extratos de MP, e incubadas novamente por 24, 48 e 72 h. O controle negativo foi o DMSO, e o controle positivo foi o carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona (CCCP), um inibidor químico da fosforilação oxidativa (HEYTLER, 1979), com uma concentração final no poço de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ . Após o tempo de tratamento, as células foram lavadas com 200  $\mu\text{L}$  de PBS, depois foram adicionados 180  $\mu\text{L}$  de meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Gibco) sem vermelho de fenol e 20  $\mu\text{L}$  de MTT  $5 \text{ mg mL}^{-1}$  em PBS, em capela de fluxo laminar. As células foram novamente incubadas por 3 h no escuro, e após esse período, o meio de cultura e MTT foram descartados e os cristais de formazan produzidos foram solubilizados em 200  $\mu\text{L}$  de DMSO e 25  $\mu\text{L}$  de solução glicina  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 10,2), e a absorvância foi medida no equipamento SpectraMax i3x (Molecular Devices).

### 3.6.4 Espécies reativas de oxigênio

A produção de superóxido mitocondrial foi medida usando o indicador de superóxido mitocondrial MitoSOX™ Red (M36008, Thermo Fisher Scientific) conforme descrito anteriormente por Barrón Cuenca et al. (2022). As células HepG2 foram semeadas em placas de 96 poços pretas com fundo transparente e plano ( $1 \times 10^4$ /poço) e incubadas durante 24 h antes da exposição. As células foram expostas ao reteno por 4, 12, 24, 48 e 72 h. DMSO e B[a]P ( $1,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foram utilizados como

---

---

controles negativo e positivo, respectivamente. Após a exposição, as células foram lavadas com a solução tampão *Hank's Balanced Salt Solution* (HBSS) e incubadas durante 15 min com o reagente MitoSOX Red diluído no momento do uso em HBSS na concentração de 5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Posteriormente, as células foram lavadas novamente com HBSS e a intensidade de fluorescência foi medida em comprimentos de onda de excitação e emissão de 510 e 590 nm, respectivamente, no leitor de microplacas Tecan Infinite F 200.

Os valores de intensidade de fluorescência foram posteriormente normalizadas com a concentração de proteína total determinada pelo ensaio de Bradford. Para isso, após a leitura, a solução tampão foi removida e as células foram lisadas adicionando-se 10  $\mu\text{L}$  da solução tampão de lise Complete-Lysis M (Roche) em cada poço. A placa foi então agitada suavemente por 10 min em banho de gelo, e 10  $\mu\text{L}$  do lisado foi transferido para outra placa para a determinação de proteínas com o reagente Coomassie blue (Sigma-Aldrich).

Para determinar se a geração de espécies reativas de oxidênio é um mecanismo importante do efeito genotóxico do reteno, as células HepG2 foram pré-tratadas com N-acetilcisteína (NAC, Sigma-Aldrich), que é um antioxidante permeável às células envolvido na indução da síntese de glutatona e eliminação de ERO (SHANG et al., 2014). O NAC foi dissolvido em PBS e filtrado (0,22  $\mu\text{m}$ ) antes do uso. As células foram tratadas com 2  $\text{mmol L}^{-1}$  de NAC durante 1 h antes da exposição ao reteno.

### 3.6.5 Ensaio cometa

Danos na fita de DNA foram detectados usando o ensaio cometa em meio alcalino, como proposto por Tice et al. (2000). Este ensaio foi realizado no laboratório da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Danielle Palma de Oliveira, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. As células HepG2 foram semeadas em placas de 12 poços (1 x 10<sup>6</sup>/poço) e incubadas durante 24 h antes da exposição. As células foram expostas ao reteno e aos extratos de MP por 4 e 24 h. O controle negativo foi o DMSO, e o positivo foi o metanossulfonato de metila (MMS), um agente alquilante de DNA (BERANEK, 1990), em uma concentração final no poço de 0,13  $\mu\text{mol L}^{-1}$  por 3 h.

Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS e tripsinizadas. O teste com azul de Tripán foi realizado para verificar a viabilidade celular. Sendo a viabilidade

---

---

igual ou maior 80%, o ensaio teve prosseguimento colocando as células meio de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% m/v, que posteriormente foi polimerizada. Após essa etapa, as lâminas contendo as células em agarose foram colocadas em contato com uma solução de lise (NaCl 2,5 mol L<sup>-1</sup>; EDTA 100 mmol L<sup>-1</sup>; Tris 10 mmol L<sup>-1</sup>; Triton X-100 1% v/v) de pH 10,4 por 24 h, na geladeira, para promover a lise celular e expor o material genético.

As lâminas foram, então, transferidas para uma cuba de eletroforese em um banho de gelo, contendo uma solução alcalina de pH 13 (NaOH 300 mmol L<sup>-1</sup> e EDTA 1 mmol L<sup>-1</sup>), e permaneceram por 20 min para que ocorresse a desnaturação da fita dupla do DNA. A cuba foi ligada, e as lâminas submetidas a uma corrente elétrica (25 V cm<sup>-1</sup>, 300 mA e 30 W) por 20 min. O DNA, que tem carga negativa, migra para o polo positivo, e se houverem danos, os pequenos fragmentos de DNA migram mais rapidamente que o nucleóide, formando assim, uma imagem que parece de um cometa. Após a neutralização e fixação das lâminas, elas foram coradas com 200 µL de GelRed 4x (Biotium), e lidas em um microscópio de fluorescência Olympus Bx50 (Olympus America INC), sob objetiva de 40x. Utilizando o *software* Comet assay IV, foram contados 100 nucleóides de cada concentração e dos controles negativo e positivo, sendo 50 nucleóides por lâmina. O parâmetro utilizado para avaliar a extensão do dano no DNA foi o de intensidade de cauda, que equivale a porcentagem de DNA na cauda.

### **3.6.6 Teste de micronúcleo com bloqueio da citocinese celular**

O teste de micronúcleo com bloqueio da citocinese foi realizado utilizando um inibidor (citocalasina B) que age no final da divisão celular, impedindo a citocinese (divisão do citoplasma) e levando a um acúmulo de células binucleadas que passaram por apenas um ciclo de divisão (FENECH, 2000). Os micronúcleos (MN) são formados durante a telófase da mitose ou meiose, e são resultantes de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não foram incluídos no núcleo principal (SALVADORI; RIBEIRO; FENECH, 2003). Assim sendo, a presença de micronúcleos representa a perda de cromatina decorrente de dano cromossômico.

As células HepG2 foram semeadas em frascos de 25 cm<sup>2</sup> (5 × 10<sup>6</sup> células por frasco) e incubadas por 24 h antes de exposição. Após esse período, as células foram então expostas ao reteno em diferentes concentrações e aos controles positivo e

---

negativo por 20 h. DMSO e metanossulfonato de metila (MMS, 0,13  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. Após a exposição, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com PBS estéril, e um novo meio de cultura foi adicionado, contendo citoclasina B (3,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Posteriormente, os frascos foram incubados por mais 28 h. Após esse período, as células foram tripsinizadas, transferidas para tubos cônicos e centrifugadas. O sobrenadante foi descartado, e foram adicionados 3 mL de solução de citrato de sódio 1% m/v, 20  $\mu\text{L}$  de formol e 3 mL do fixador metanol/ácido acético 3:1. Após homogeneização e nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado, as células foram colocadas em lâminas, e coradas com uma solução Giemsa 5% para a leitura no microscópio óptico. A proporção de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos foi anotada para as primeiras 500 células viáveis contadas, a fim de se determinar o Índice de Divisão Nuclear (IDN, Equação 5).

$$IDN = \frac{M1 + 2 \times (M2) + 3 \times (M3) + 4 \times (M4)}{N} \quad (5)$$

Onde M1, M2, M3 e M4 representar o número de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos, respectivamente; e N o número total de células viáveis.

Para a análise de MN, a proporção de células binucleadas deve ser igual ou superior a um percentual de 35% do total. O número de MN por célula binucleada foi contado, e os resultados expressos em frequência de micronúcleos por 1.000 células binucleadas. Foram analisadas 2.000 células binucleadas por condição, sendo 1.000 células em cada lâmina. A análise foi realizada manualmente. Para ser considerado um micronúcleo, as seguintes características foram observadas (FENECH, 2000):

- A morfologia do MN é idêntica à dos núcleos principais;
- Diâmetro entre 1/16 e até, no máximo, 1/3 dos núcleos principais (ou entre 1/256 e 1/9 da área de um dos núcleos principais);
- Mesma coloração dos núcleos, mas ocasionalmente pode apresentar maior intensidade e não apresentar refringências;
- Não estar ligado ou conectado a um dos núcleos principais, podendo estar encostado, mas não sobreposto a um dos núcleos.



### 3.6.7 Teste de micronúcleo por citometria de fluxo

Micronúcleos, núcleos hipodiploides, células apoptóticas e necróticas foram avaliadas por citometria de fluxo, conforme o método descrito por Bryce et al. (2007) com pequenas modificações de acordo com Vallabani et al. (2022). As células HepG2 foram semeadas em placas de 24 poços ( $6 \times 10^4$ /poço) e incubadas durante 24 h antes da exposição. As células foram expostas ao reteno por 72 h, correspondendo a 2–3 períodos normais de duplicação de células HepG2 (LE BIHANIC et al., 2016). DMSO e etoposídeo ( $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. Após a exposição, a placa foi transferida para o gelo e mantida por 20 min. Posteriormente, o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS gelado. O corante brometo de etídio monoazida ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , EMA, Invitrogen) foi preparado em solução tampão gelada de PBS suplementada com 2% de SFB no momento do uso e no escuro, e depois adicionado em cada poço ( $300 \mu\text{L}$ ). Em seguida, a placa foi incubada em gelo por 30 min, 15 cm abaixo de uma luz branca fria. O corante EMA é capaz de penetrar nas células com membrana danificada (células inviáveis) e se ligar covalentemente ao DNA após a fotoativação, permitindo desse modo, a distinção entre células viáveis e inviáveis por meio da integridade da membrana celular (AVLASEVICH et al., 2006).

Após a incubação com EMA, as células em cada poço foram lavadas com  $600 \mu\text{L}$  de solução tampão PBS gelada e, em seguida, a solução de lise filtrada I (preparada em água ultrapura, contendo: NaCl  $0,584 \text{ mg mL}^{-1}$ ; citrato trissódico  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ; Igepal CA-630  $0,6 \mu\text{L mL}^{-1}$ ; RNase A  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  e SYTOX Green  $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi adicionada em cada poço ( $300 \mu\text{L}$ ), e as células foram incubadas por 1 h em temperatura ambiente. Posteriormente, a solução filtrada II (preparada em água ultrapura com ácido cítrico  $15 \text{ mg mL}^{-1}$ ; sacarose  $85,6 \text{ mg mL}^{-1}$  e SYTOX Green  $0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi adicionada em cada poço ( $300 \mu\text{L}$ ) sem descartar a solução I, e deixada equilibrar a temperatura ambiente por 30 min. Esses processos objetivaram a lise das células, digerindo suas membranas citoplasmáticas e resultando em lisados contendo cromatina livre que estará marcada ou somente com o corante SYTOX (oriunda de células viáveis) ou com ambos os corantes SYTOX e EMA (oriunda de células inviáveis).

Após a incubação, os núcleos foram contados e analisados utilizando o citômetro de fluxo BD Accuri™ C6 (BD Biosciences) com excitação em 488 nm. A

---

fluorescência associada ao corante EMA foi registrada no canal FL3 (610/20 nm) e a fluorescência do SYTOX Green no canal FL1 (530/30 nm). No total, foram contadas 10.000 células por amostra e a análise dos dados foi realizada utilizando o software BD Accuri™ C6.

### 3.6.8 Western Blotting

As proteínas de sinalização do dano no DNA checkpoint quinase 1 (Chk1) e histona H2AX foram determinadas na sua forma fosforilada utilizando Western Blotting, de acordo com o procedimento descrito por Galvão et al. (2022). As células HepG2 foram semeadas em placas de 6 poços ( $3 \times 10^5$  células/poço) e incubadas por 24 h antes da exposição. DMSO e B[a]P ( $3 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foram utilizados como controles negativo e positivo, respectivamente. Após a exposição, as células foram mantidas em gelo, lavadas duas vezes com PBS gelado e raspadas em 100  $\mu\text{L}$  de solução de lise IPB-7 ( $20 \text{ mmol L}^{-1}$  de trietanolamina-HCl pH 7,8;  $0,7 \text{ mol L}^{-1}$  de NaCl; 0,5% de Igepal CA-630; 0,2% de desoxicolato de sódio), suplementada com o coquetel de inibidores de protease e fosfatase Halt™ (#78442 Thermo Fisher Scientific) e  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF, Sigma-Aldrich). Em seguida, o lisado foi sonificado por 10 s (mantido em gelo) e centrifugado a 16060 g por 20 min a 4 °C. 25  $\mu\text{g}$  de proteínas foram submetidos a separação vertical em gel de poliacrilamida (13,5%) em condições desnaturantes (SDS-PAGE) a uma voltagem inicial de 100 V por 15 min, seguida por 150 V por 60 min. Posteriormente, as proteínas foram transferidas para uma membrana de PVDF (Bio-Rad) por eletro-transferência úmida. A ligação inespecífica foi reduzida bloqueando as membranas com 5% de leite desnatado em solução tampão Tris com detergente Tween 20 a 0,1% (TBS-T). As membranas foram então incubadas durante a noite a 4 °C com o anticorpo primário para Chk1 fosforilada em Ser-317 (#2344, Cell Signaling Technology), H2AX fosforilada em Ser-139 (#2577, Cell Signaling Technology) ou o controle endógeno Cdk2 (M2) (sc-163, Santa Cruz Biotechnology). Após três lavagens de 5 min com TBS-T, as membranas foram incubadas por 1 h com o anticorpo secundário (Santa Cruz Biotechnology). As proteínas foram detectadas usando o kit de quimiluminescência WesternBright™ ECL (Advansta Inc.) e a análise de densitometria das bandas foi realizada usando o software ImageJ versão 1.48 (National Institute of Health, EUA).

---

### 3.7 Análise dos resultados

A normalidade dos dados resultantes da análise química foi avaliada por meio do teste Shapiro-Wilk. Devido à distribuição não-normal dos dados, as medianas  $\pm$  intervalos interquartis foram utilizados nas discussões dos resultados e ferramentas não paramétricas foram empregadas para comparar as medianas (teste de Mann-Whitney) e encontrar correlações entre as variáveis (coeficiente de correlação de Spearman,  $\rho$ ).

A análise de componentes principais (PCA) foi utilizada para reduzir o número de variáveis para um número menor de fatores, a fim de entender melhor as fontes de emissão. Antes da análise estatística, os valores abaixo do limite de detecção (LD) foram substituídos por LD/2 e todos os valores foram autoescalados. Componentes com autovalores maiores que 1 foram extraídos da matriz de covariância.

Os dados toxicológicos foram apresentados como valores médios  $\pm$  erros padrão para três experimentos independentes. As diferenças entre as amostras e o controle negativo foram testadas quanto à significância usando análise de variância (ANOVA) unidirecional ou bidirecional, seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnett. As diferenças entre os controles positivo e negativo foram testadas quanto à significância ( $p < 0,05$ ) usando o teste t não pareado.

A análise estatística foi realizada usando os pacotes de software Statistica 14.0 (TIBCO) e GraphPad Prism 8 (GraphPad Inc.).

---

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

## 4.1 Otimização e validação do método de extração dos compostos policíclicos aromáticos do material particulado

### 4.1.1 Otimização dos parâmetros de extração

A escolha do solvente a ser utilizado na extração foi otimizada utilizando um planejamento de mistura. As condições experimentais para cada componente do planejamento de mistura (valores reais e codificados) estão mostradas na Tabela 8, juntamente com a desejabilidade global (Dg) obtida.

**Tabela 8** - Condições experimentais do planejamento de mistura realizada para otimização do solvente de extração, e as respostas em termos de desejabilidade global (Dg). Os valores codificados estão mostrados entre parênteses

Experimento	Volume de solvente (mL)			Dg
	Diclorometano	Metanol	Acetonitrila	
1	0,83 (0,167)	3,40 (0,667)	0,83 (0,167)	0,571
2	3,40 (0,667)	0,83 (0,167)	0,83 (0,167)	0,670
3	0,00 (0)	2,50 (0,5)	2,50 (0,5)	0,637
4	0,00 (0)	5,00 (1)	0,00 (0)	0,587
5	0,00 (0)	0,00 (0)	5,00 (1)	0,761
6	0,83 (0,167)	0,83 (0,167)	3,40 (0,667)	0,765
7	2,50 (0,5)	2,50 (0,5)	0,00 (0)	0,601
8	2,50 (0,5)	0,00 (0)	2,50 (0,5)	0,743
9	5,00 (1)	0,00 (0)	0,00 (0)	0,711
10	1,70 (0,333)	1,70 (0,333)	1,70 (0,333)	0,635
11	1,70 (0,333)	1,70 (0,333)	1,70 (0,333)	0,570
12	1,70 (0,333)	1,70 (0,333)	1,70 (0,333)	0,752

Fonte: a própria autora.

Com base nos dados apresentados na Tabela 8, foi possível calcular o modelo de regressão cúbica usando a rotina computacional "regression2", proposta por Pereira e Pereira-Filho (2018). Os coeficientes de interação binária para todos os pares possíveis de componentes e o coeficiente de interação terciária dos três componentes não foram significativos (nível de confiança de 95%). Portanto, o modelo foi recalculado com os coeficientes individuais, que permaneceram significativos após o recálculo (nível de confiança de 95%).

Uma breve descrição da análise de variância (ANOVA) para o modelo linear calculado é apresentada na Tabela 9. O teste de distribuição de Fisher (teste F) foi usado para examinar a significância da diferença entre os parâmetros da ANOVA. O

modelo de regressão linear foi significativo ( $F$  calculado  $>$   $F$  tabelado) e não houve falta de ajuste ( $F$  calculado  $<$   $F$  tabelado). O modelo foi capaz de explicar 63% da variação ( $R^2 = 0,63$ ), com uma variação máxima explicável de 74% ( $R^2$  máx = 0,74). Portanto, o modelo de regressão foi capaz de descrever satisfatoriamente o comportamento dos dados.

**Tabela 9** - Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão linear calculado a partir dos dados experimentais do planejamento de mistura

Parâmetro	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	Teste F	F tabelado (95%)
Regressão	0,0405	2	0,0202	7,5960	4,2560
Resíduo	0,0240	9	0,0027		
Total	0,0644	11	0,0059		
Erro puro	0,0170	2	0,0085	0,1171	19,353
Falta de ajuste	0,0070	7	0,0010		
Variação explicada ( $R^2$ )	0,6280				
Máxima variação explicada ( $R^2$ máx)	0,7924				

Fonte: a própria autora.

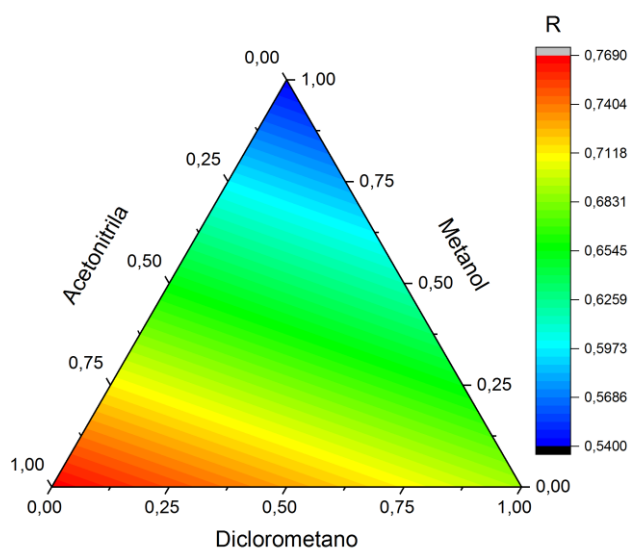
A equação linear obtida (Equação 6) foi usada para calcular as condições experimentais ideais e traçar a superfície de resposta (Figura 14).

$$R = 0,692v_1 + 0,541v_2 + 0,768v_3 \quad (6)$$

onde  $R$  é a resposta (desejabilidade global),  $v_1$  corresponde à variável 1 (diclorometano),  $v_2$  à variável 2 (metanol) e  $v_3$  à variável 3 (acetonitrila).

O metanol foi o solvente que implicou a menor desejabilidade, enquanto a proporção com a maior resposta (ou seja, a desejabilidade mais próxima de 1) foi 100% de acetonitrila. Portanto, esta condição foi escolhida para continuar o processo de otimização da extração.

**Figura 14** - Gráfico de contorno da resposta para diferentes proporções de diclorometano, metanol e acetoneitrila



Fonte: a própria autora.

As condições experimentais (valores reais e codificados) do planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) com ponto central, usadas para determinar as condições ideais para as outras variáveis (volume de solvente, número de extrações e tempo de ultrassom), estão mostradas na Tabela 10, juntamente com os resultados de desejabilidade global.

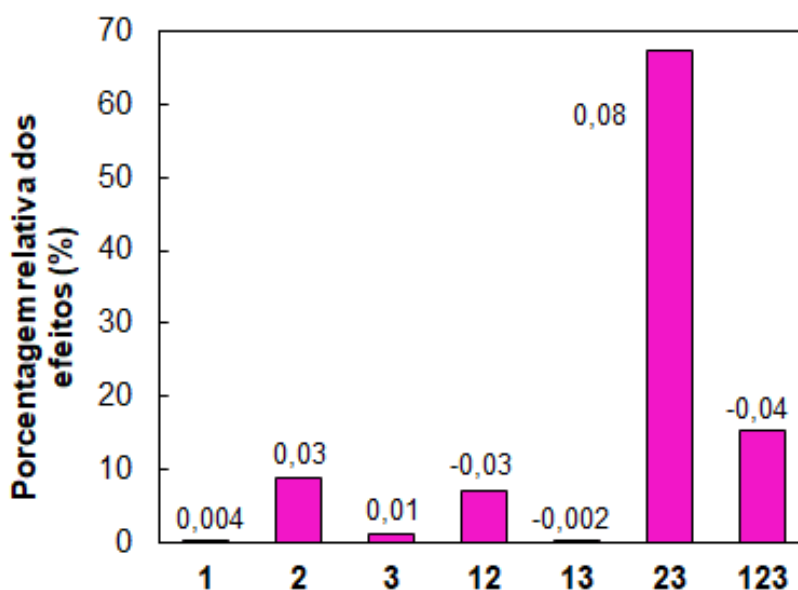
**Tabela 10** - Condições experimentais do planejamento fatorial completo ( $2^3$ ) com ponto central realizadas para otimização do número de extrações, volume de solvente e tempo de ultrassom, e as respostas em termos de desejabilidade global (Dg). Os valores codificados estão entre parênteses

Experimento	Número de extrações	Volume do solvente (mL)	Tempo de ultrassom (min)	Dg
1	1 (-1)	3,00 (-1)	10 (-1)	0,647
2	3 (1)	3,00 (-1)	10 (-1)	0,640
3	1 (-1)	5,00 (1)	30 (1)	0,715
4	3 (1)	5,00 (1)	10 (-1)	0,601
5	1 (-1)	3,00 (-1)	30 (1)	0,541
6	3 (1)	3,00 (-1)	30 (1)	0,607
7	1 (-1)	5,00 (1)	10 (-1)	0,583
8	3 (1)	5,00 (1)	30 (1)	0,652
9	2 (0)	4,00 (0)	20 (0)	0,584
10	2 (0)	4,00 (0)	20 (0)	0,589
11	2 (0)	4,00 (0)	20 (0)	0,529

Fonte: a própria autora.

Com base nos dados apresentados na Tabela 10, foi possível calcular os efeitos que as variáveis individuais e suas interações tiveram na resposta. Sete efeitos, sendo três de primeira ordem (1, 2 e 3), três de segunda ordem (12, 13 e 23) e um de terceira ordem (123), foram calculados usando a rotina computacional "fabi\_efeito" (PEREIRA; PEREIRA-FILHO, 2018). Como mostrado na Figura 15, o efeito mais importante, com uma porcentagem relativa de 67%, foi para a interação das variáveis 2 e 3 (volume de solvente e tempo de ultrassom, respectivamente). Portanto, essas duas variáveis foram testadas em um maior número de níveis, em um processo de refinamento, em que a variável 1 foi mantida constante em seu nível alto (+1), pois apesar de seu efeito ter sido pequeno, ele foi positivo (Figura 15).

**Figura 15** - Porcentagem relativa dos efeitos das variáveis 1 (número de extrações), 2 (volume de solvente) e 3 (tempo de ultrassom) e suas interações. Os valores de efeito calculados são fornecidos ao lado de cada coluna



Fonte: a própria autora.

O refinamento foi realizado usando um planejamento de composto central. Com a exclusão de uma variável, alguns experimentos do planejamento fatorial completo anterior foram duplicados, de modo que a desejabilidade global foi calculada como a média aritmética da duplicata. As condições experimentais do planejamento de composto central (valores reais e codificados) usadas para o processo de refinamento estão mostradas na Tabela 11, juntamente com os valores de desejabilidade global.



**Tabela 11** - Planejamento de composto central utilizado para o processo de refinamento das condições de extração (volume de solvente e tempo de ultrassom) e as respostas em termos de desejabilidade global (Dg). Os valores codificados estão entre parênteses

Experimento	Volume de solvente (mL)	Tempo de ultrassom (min)	Dg
1 e 2	3,00 (-1)	10 (-1)	0,644
3 e 8	5,00 (1)	30 (1)	0,684
4 e 7	5,00 (1)	10 (-1)	0,593
5 e 6	3,00 (-1)	30 (1)	0,575
9	4,00 (0)	20 (0)	0,568
10	2,60 (-1,41)	20 (0)	0,674
11	4,00 (0)	6 (-1,41)	0,747
12	5,40 (1,41)	20 (0)	0,629
13	4,00 (0)	34 (1,41)	0,673

Fonte: a própria autora.

Um modelo de regressão foi gerado a partir dos dados na Tabela 11, usando a rotina computacional "regression2" (PEREIRA; PEREIRA-FILHO, 2018). O modelo mostrou uma leve falta de ajuste, pois a razão entre os valores F calculados e tabulados foi ligeiramente maior que 1 (Tabela 12). Dessa forma, os coeficientes foram calculados considerando que não houve falta de ajuste no modelo. O modelo foi capaz de explicar 48% da variação ( $R^2 = 0,48$ ), com uma variação máxima explicável de 87% ( $R^2 \text{ máx} = 0,87$ ).

**Tabela 12** - Análise de variância (ANOVA) para o modelo de regressão linear calculado a partir dos dados experimentais do planejamento fatorial completo

Parâmetro	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	Teste F	F tabelado (95%)
Regressão	0,0242	5	0,0048	1,6405	3,4820
Resíduo	0,0265	9	0,0029		
Total	0,0507	14	0,0036	6,1736	4,7570
Erro puro	0,0065	6	0,0011		
Falta de ajuste	0,0200	3	0,0067		
Variação explicada ( $R^2$ )	0,4768				
Máxima variação explicada ( $R^2 \text{ máx}$ )	0,8720				

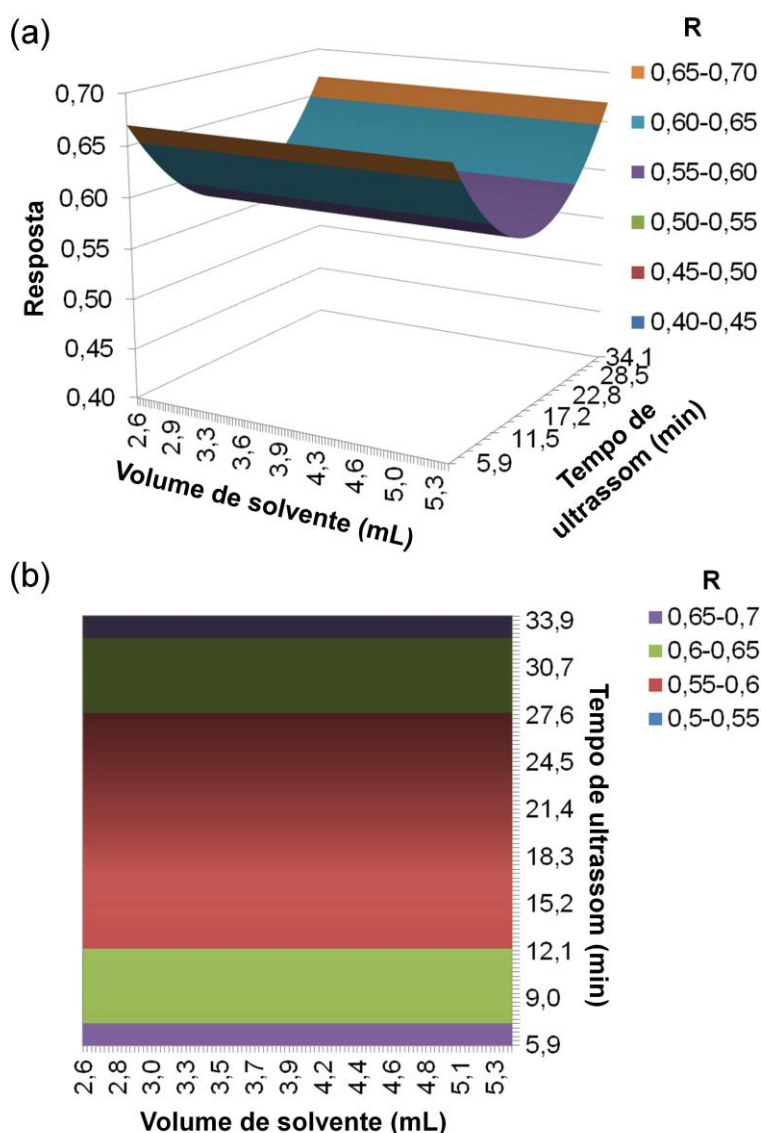
Fonte: a própria autora.

Considerando apenas os coeficientes significativos (nível de confiança de 95%), a seguinte equação de regressão foi obtida:

$$R = 0,568 + 0,052v_{22} \quad (7)$$

onde R é a resposta (desejabilidade global) e  $v_{22}$  corresponde ao quadrado da variável 2 (tempo de ultrassom). Portanto, o volume do solvente não foi importante em termos de desejabilidade, mas o tempo de ultrassom sim. A Equação 7 foi usada para traçar a superfície de resposta e o gráfico de contorno (Figura 16).

**Figura 16** - (a) Superfície de resposta e (b) gráfico de contorno para o modelo gerado pelo refinamento da otimização das condições de extração



Fonte: a própria autora.

Como o volume do solvente não influenciou a resposta, o volume intermediário de 4,0 mL foi escolhido, minimizando assim o volume do solvente, mas ao mesmo tempo garantindo que todo o filtro fosse coberto. O tempo de extração influenciou a

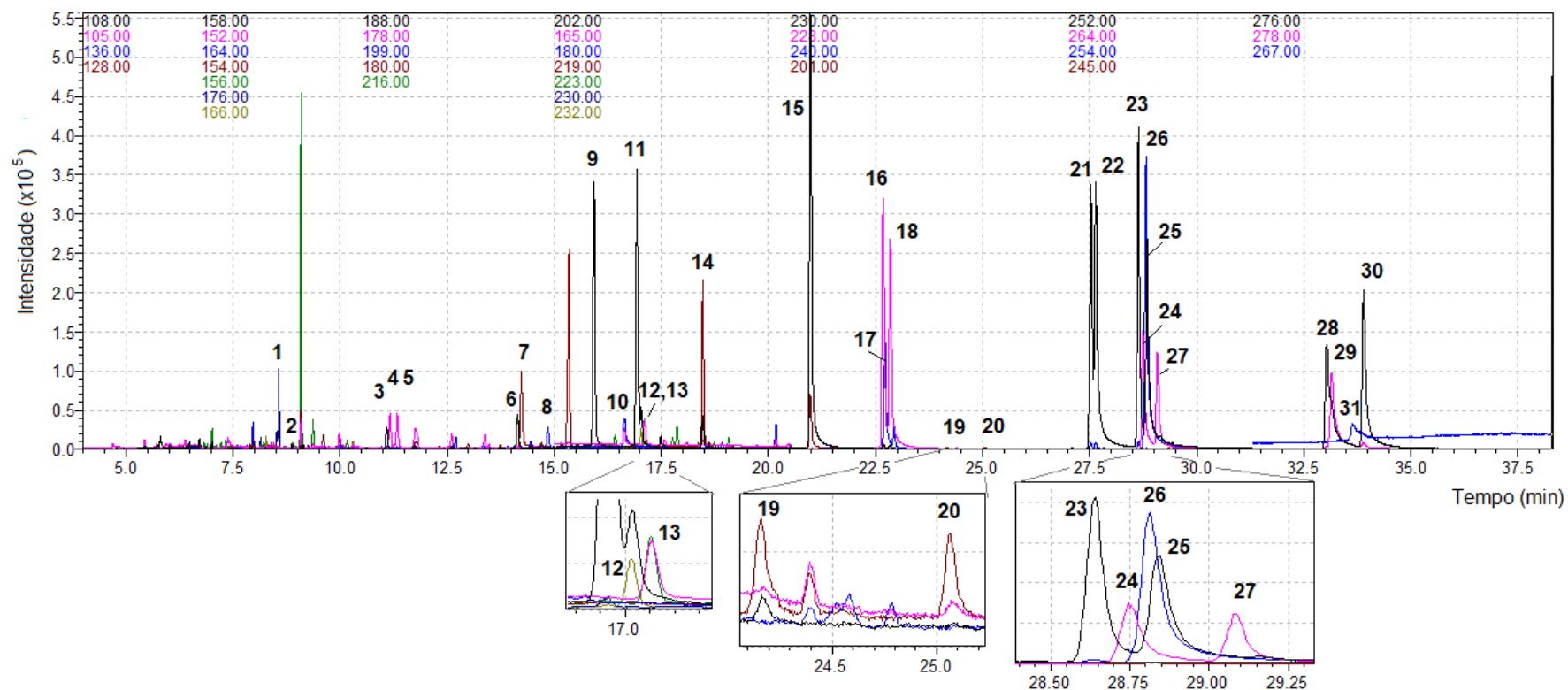
desejabilidade global, com as respostas máximas obtidas nos dois extremos (6 e 34 min).

Para determinar o tempo mais adequado para a extração, uma amostra de MP<sub>10</sub> foi analisada, em triplicata, mantendo fixos o solvente de extração (acetonitrila), o volume do solvente (4 mL) e o número de extrações (3), mas usando os dois tempos de ultrassom diferentes. As áreas dos picos correspondentes aos HPA e seus derivados para os tempos de extração de 6 e 34 min foram em sua maioria (74%) estatisticamente iguais (teste t, p = 0,05). No entanto, as áreas correspondentes aos HPA pireno, benzo[a]antraceno, criseno-*d*<sub>12</sub>, criseno, benzo[k]fluoranteno, benzo[e]pireno, indeno[1,2,3-*cd*]pireno, dibenzo[a,h]antraceno e benzo[ghi]perileno foram estatisticamente maiores após 34 min de extração (teste t, p = 0,05). Portanto, o tempo de extração por ultrassom de 34 min foi selecionado, uma vez que uma maior detectabilidade pode ser essencial para a determinação de HPA em amostras de material particulado, devido às suas baixas concentrações nesta matriz. Portanto, o procedimento do método final otimizado constituiu nas seguintes etapas:

1. Uma membrana de área 17,3 cm<sup>2</sup> foi cortada em pequenos pedaços diretamente em um frasco de vidro.
2. Um volume de 4,0 mL de acetonitrila foi adicionado ao frasco e este foi colocado em banho de ultrassom por 34 min.
3. Após a ultrassonificação, o solvente foi transferido para um balão de fundo redondo.
4. As etapas 2 e 3 foram repetidas duas vezes, e os extratos foram transferidos para o mesmo balão.
5. O extrato combinado foi evaporado até aproximadamente 0,5 mL em evaporador rotativo.
6. O extrato concentrado foi filtrado em membrana de PTFE (0,22 μm) e seco sob suave fluxo de N<sub>2</sub>.
7. O material restante foi ressuspensão em 100 μL de acetonitrila e homogeneizado.
8. Um volume de 2 μL do extrato final foi injetado no sistema CG-EM.

No cromatograma apresentado na Figura 17, é possível observar a boa separação dos picos de um filtro dopado com padrão e extraído pelo método otimizado.

**Figura 17** - Cromatograma obtido a partir da extração de um filtro dopado com uma concentração final de 300 ng mL<sup>-1</sup> dos padrões de: (1) fluoreno-*d*<sub>10</sub>, (2) fluoreno, (3) fenantreno-*d*<sub>10</sub>, (4) fenantreno, (5) antraceno, (6) 9,10-antraquinona-*d*<sub>8</sub>, (7) 9,10-antraquinona, (8) 5-nitroacenafteno, (9) fluoranteno, (10) 2-nitrofluoreno, (11) pireno, (12) 9-nitroantraceno-*d*<sub>9</sub>, (13) 9-nitroantraceno, (14) reteno, (15) benzo[*a*]fluorenona, (16) benzo[*a*]antraceno, (17) criseno-*d*<sub>12</sub>, (18) criseno, (19) 3-nitrofluoranteno, (20) 1-nitropireno, (21) benzo[*b*]fluoranteno, (22) benzo[*k*]fluoranteno, (23) benzo[*e*]pireno, (24) benzo[*a*]pireno-*d*<sub>12</sub>, (25) benzo[*a*]pireno, (26) 6*H*-benzo[*cd*]piren-6-ona, (27) perileno-*d*<sub>12</sub>, (28) indeno[1,2,3,*cd*]perileno, (29) dibenzo[*a,h*]antraceno, (30) benzo[*ghi*]perileno, (31) 6-nitrobenzo[*a*]pireno



Fonte: a própria autora.

---

O método otimizado utiliza 97% menos solvente e reduz o tempo de análise em cerca de 85% em comparação com o método utilizado por diversos grupos de pesquisa, que consome cerca de 375 mL e 25 h para cada amostra (ALVES et al., 2011; URBAN et al., 2016). Apesar de não ter sido necessária uma etapa adicional de limpeza, como o fracionamento em coluna de sílica que é realizado após a extração com Soxhlet (URBAN et al., 2016), o analista deve atentar-se ao fato de que a ausência de dessa etapa pode comprometer o sistema cromatográfico mais rapidamente. Dessa forma, foi necessário realizar ciclos de limpeza térmica, limpar o *liner* do injetor e cortar a coluna cromatográfica com frequência, evitando assim problemas com a sensibilidade do equipamento.

Outro método de extração comumente utilizado para a determinação de HPA em material particulado por CG-EM é aquele baseado no método de extração número 3550C descrito pela US-EPA (2007). Neste método, quatro extrações com 50 mL de diclorometano são realizadas em um banho de ultrassom, cada uma por 15 min, seguidas por uma extração adicional com 100 mL de diclorometano por 20 min (MACHADO et al., 2009; MARQUES et al., 2009). Este método é menos demorado em comparação com a extração Soxhlet, e o tempo total de extração é semelhante ao do método proposto aqui. No entanto, é necessária uma quantidade relativamente alta de solvente para apenas uma amostra (total de 300 mL de diclorometano). Guo et al. (2003) usaram um método de extração semelhante baseado no método US-EPA 3550C, com três extrações em banho de ultrassom usando 150 mL de diclorometano por 30 min. No entanto, uma etapa de fracionamento foi realizada após a extração, usando uma coluna de sílica alumina.

Outras extrações foram propostas com o objetivo de minimizar o uso de solventes orgânicos, como aquela desenvolvida por Pereira, de Andrade e Miguel (2001), envolvendo uma única extração com 4 mL de uma mistura de acetonitrila:diclorometano (3:1) em banho de ultrassom. Mais recentemente, Ferreira et al. (2021) propuseram uma extração de 3 min em banho de ultrassom usando 50 mL de uma mistura 1:1 de n-hexano:acetona. No entanto, ambos os métodos foram validados exclusivamente para a determinação dos 16 HPA prioritários e foram aplicados para a análise de amostras coletadas em amostradores de grande volume.

Um método de extração para HPA e derivados oxi e nitrogenados foi relatado utilizando microextratores da empresa Whatman (Mini<sup>TM</sup> UniPrep Filters) e apenas 500 µL de uma mistura de 18% de acetonitrila em diclorometano (SANTOS et al., 2016).

---

No presente trabalho, testes com os microextratores foram realizados, porém resultaram em áreas de pico muito próximas ao limite de detecção, o que demonstrou que esse método não era adequado para amostras coletadas usando amostradores de baixo volume (dados não mostrados).

Apesar do uso de acetonitrila (que é potencialmente perigosa, pois pode ser metabolizada para cianeto), o método proposto diferiu da grande maioria dos métodos relatados por ser 100% livre de diclorometano, considerado um solvente clorado de categoria vermelha, de acordo com os princípios da Química Verde (JOSHI; ADHIKARI, 2019). Além disso, apesar de não ser uma substância controlada pelo Protocolo de Montreal, o diclorometano tem o potencial de reagir com o ozônio estratosférico. Observações recentes indicaram que, embora seu impacto na camada de ozônio seja atualmente modesto, a concentração de diclorometano cresceu significativamente nos últimos anos, e se essa tendência continuar, poderá atrasar substancialmente a restauração do ozônio antártico aos níveis pré-1980 (HOSSAINI et al., 2017).

#### **4.1.2 Validação do método de extração otimizado**

A validação do método foi realizada de acordo com as diretrizes da Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH) e os critérios sugeridos pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) e pela Associação Internacional Oficial de Químicos Analíticos (AOAC International) (IUPAC, 2002; ICH, 2005; AOAC INTERNATIONAL, 2016).

Os limites de detecção (LD) variaram de  $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$  a  $10 \text{ ng mL}^{-1}$ , sendo que os maiores LD foram para os nitro-HPA (Tabela 13). Os limites de quantificação (LQ) foram de  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  para todos os analitos, com exceção do 5-nitroacenafeno ( $50 \text{ ng mL}^{-1}$ ). A faixa de trabalho linear foi de 10 a  $500 \text{ ng mL}^{-1}$  para todos os analitos, com exceção de 5-nitroacenafteno (de 50 a  $500 \text{ ng mL}^{-1}$ ). Todas as curvas analíticas apresentaram boa linearidade, com coeficientes de correlação linear variando de 0,990 a 0,999. Todos os LD, LQ, faixas lineares de trabalho, equações e coeficientes de correlação (r) estão apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13** - Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ), faixas lineares de trabalho, equações e coeficiente de correção (r) obtidos para cada composto policíclico aromático determinado

Analito	LD (ng mL <sup>-1</sup> )	LQ (ng mL <sup>-1</sup> )	Faixa linear de trabalho (ng mL <sup>-1</sup> )	Equação da reta	r
1,4-benzoquinona	5,0	-	-	-	-
acetofenona	1,0	-	-	-	-
naftaleno	1,0	-	-	-	-
1,4-naftoquinona	5,0	-	-	-	-
acenaftileno	1,0	-	-	-	-
acenafteno	1,0	-	-	-	-
1-naftaldeído	5,0	-	-	-	-
fluoreno	1,0	10	10 - 500	y = 5,828x - 0,0195	0,998
9,10- fenantrenoquinona	1,0	10	10 - 500	y = 1,293x + 0,0017	0,992
fenantreno	1,0	10	10 - 500	y = 4,5766x + 0,1172	0,998
antraceno	1,0	10	10 - 500	y = 4,886x + 0,0039	0,991
9,10-antraquinona	1,0	10	10 - 500	y = 6,976x + 0,0092	0,999
5-nitroacenafteno	10	50	50 - 500	y = 2,862x - 0,0015	0,995
fluoranteno	1,0	10	10 - 500	y = 4,9538x + 0,0152	0,994
2-nitrofluoreno	10	10	10 - 500	y = 2,328x + 0,0187	0,997
Pireno	1,0	10	10 - 500	y = 5,3618x + 0,0131	0,995
9-nitroantraceno	5,0	10	10 - 500	y = 4,7736x + 0,0084	0,999
9-nitrofenantreno	5,0	10	10 - 500	y = 0,4984x + 0,1467	0,990
reteno	1,0	10	10 - 500	y = 3,2023x + 0,0094	0,999
benzo[a]fluorenona	1,0	10	10 - 500	y = 11,055x - 0,0511	0,999
benzo[a]antraceno	1,0	10	10 - 500	y = 6,33x + 0,0107	0,999
criseno	1,0	10	10 - 500	y = 6,4523x + 0,0152	0,999
3-nitrofluoranteno	10	10	10 - 500	y = 0,6865x + 0,0046	0,997
1-nitropireno	10	10	10 - 500	y = 0,5846x - 0,0005	0,998
benzo[b]fluoranteno	1,0	10	10 - 500	y = 6,8226x + 0,0128	0,999
benzo[k]fluoranteno	1,0	10	10 - 500	y = 9,3524x + 0,0196	0,999
benzo[e]pireno	1,0	10	10 - 500	y = 6,9047x + 0,0105	0,999
benzo[a]pireno	1,0	10	10 - 500	y = 6,1208x + 0,015	0,999
6H-benzo[cd]piren-6- ona	5,0	10	10 - 500	y = 45,615x - 0,1871	0,999
indeno[1,2,3-cd]pireno	1,0	10	10 - 500	y = 6,7726x - 0,0195	0,999
dibenzo[a,h]antraceno	5,0	10	10 - 500	y = 4,3032x - 0,0156	0,999
benzo[ghi]perileno	1,0	10	10 - 500	y = 6,4871x - 0,0016	0,999
6-nitrobenzo[a]pireno	10	10	10 - 500	y = 16,608x + 0,0101	0,999

Fonte: a própria autora.

Os limites de quantificação e os coeficientes de correlação linear não foram atribuídos para os seguintes analitos: 1,4-benzoquinona, acetofenona, naftaleno, 1,4-naftoquinona, acenaftileno, acenafteno e 1-naftaldeído. Esses HPA e oxi-HPA têm as menores massas moleculares entre os compostos analisados e são os mais voláteis. Consequentemente, eles provavelmente foram perdidos durante as etapas de evaporação do solvente e não puderam ser quantificados.

Os desvios padrão relativos (DPR) estiveram nas faixas de 1-16%, 1-19% e 2-16% para concentrações baixas, médias e altas, respectivamente (Tabela 14). Considerando que as concentrações dos analitos são baixas (100-500 ng mL<sup>-1</sup>) e que uma variação de até 21% é permitida nesse nível (AOAC International, 2016), pode-

se considerar que os DPR estão dentro de uma faixa aceitável e que o método otimizado apresentou precisão satisfatória.

**Tabela 14** - Desvio padrão relativo (DPR) dos analitos determinados em triplicata em três diferentes concentrações.

Analito	DPR (%) (n = 3)		
	100 ng mL <sup>-1</sup>	300 ng mL <sup>-1</sup>	500 ng mL <sup>-1</sup>
fluoreno	16	7	2
9,10-fenantrenoquinona	4	12	16
fenantreno	5	14	5
antraceno	5	13	4
9,10-antraquinona	7	6	6
5-nitroacenafteno	6	8	2
fluoranteno	12	19	2
2-nitrofluoreno	11	13	6
pireno	11	19	4
9-nitroantraceno	12	4	6
9-nitrofenantreno	7	15	7
reteno	9	10	3
benzo[ <i>a</i> ]fluorenona	15	5	9
benzo[ <i>a</i> ]antraceno	9	5	3
criseno	8	5	3
3-nitrofluoranteno	13	11	6
1-nitropireno	12	6	10
benzo[ <i>b</i> ]fluoranteno	8	2	6
benzo[ <i>k</i> ]fluoranteno	8	3	8
benzo[ <i>e</i> ]pireno	13	3	5
benzo[ <i>a</i> ]pireno	8	6	5
6 <i>H</i> -benzo[ <i>cd</i> ]piren-6-ona	11	1	10
indeno-[1,2,3- <i>cd</i> ]-pireno	4	1	8
dibenzo[ <i>a,h</i> ]antraceno	1	5	10
benzo[ <i>g,h,i</i> ]perileno	4	3	10
6-nitrobenzo[ <i>a</i> ]pireno	15	7	2

Fonte: a própria autora.

A exatidão do método foi avaliada de duas maneiras: por testes de recuperação utilizando a matriz de amostra, e por comparação com um método de referência. As recuperações médias dos compostos na matriz da amostra ficaram nas faixas de 76-128% (HPA), 80-117% (oxi-HPA) e 48-113% (nitro-HPA) (Tabela 15). Embora a faixa de recuperação aceita seja de 80 a 110% para analitos presentes em baixas concentrações (~100 ng mL<sup>-1</sup>), as recuperações obtidas aqui podem ser consideradas satisfatórias, uma vez que foi feita a determinação de um grande número de analitos em uma matriz complexa, como é o caso do material particulado atmosférico (IUPAC, 2002; AOAC International, 2016). Além disso, para corrigir a recuperação baixa ou alta de alguns analitos, curvas analíticas foram construídas com padrões que passaram pelo processo de extração.



As frações finas (MP < 1 µm) de duas amostras coletadas em paralelo no mesmo local, usando dois amostradores de pequeno volume idênticos, foram extraídas de acordo com o método otimizado e o método de referência. Os métodos apresentaram boa concordância, como demonstrado pelas razões entre as respostas de sinal obtidas pelos dois métodos, que variaram de 0,63 a 1,19 (Tabela 15).

**Tabela 15** - Recuperações médias dos analitos determinados em triplicata nas amostras de MP10 dopadas com três diferentes concentrações. As relações dos sinais obtidos utilizando o método otimizado aqui proposto e o método de referência segundo Alves et al. (2011) também estão apresentadas

Analito	Teste na matriz da amostra			Teste de exatidão
	Recuperação média (%) (n = 3)			Método otimizado / método de referência
	100 ng mL <sup>-1</sup>	300 ng mL <sup>-1</sup>	500 ng mL <sup>-1</sup>	
fluoreno	98 ± 16	91 ± 6	102 ± 2	0,77
9,10-fenantrenoquinona	84 ± 4	117 ± 14	97 ± 16	0,94
fenantreno	102 ± 9	122 ± 4	128 ± 12	1,12
antraceno	123 ± 9	122 ± 6	125 ± 13	1,09
9,10-antraquinona	105 ± 18	106 ± 13	100 ± 8	1,13
5-nitroacenafteno	97 ± 18	113 ± 7	110 ± 13	1,07
fluoranteno	110 ± 31	123 ± 21	108 ± 5	1,19
2-nitrofluoreno	86 ± 6	107 ± 5	108 ± 10	1,15
pireno	101 ± 28	118 ± 18	111 ± 4	0,72
9-nitroantraceno	76 ± 9	92 ± 13	88 ± 10	1,11
9-nitrofenantreno	79 ± 10	108 ± 8	93 ± 8	0,85
reteno	94 ± 20	105 ± 12	97 ± 1	0,73
benzo[a]fluorenona	85 ± 15	106 ± 15	100 ± 12	0,79
benzo[a]antraceno	92 ± 18	110 ± 8	106 ± 5	0,76
criseno	97 ± 8	101 ± 3	108 ± 7	0,72
3-nitrofluoranteno	85 ± 11	61 ± 11	74 ± 16	1,09
1-nitropireno	82 ± 14	100 ± 3	109 ± 17	0,94
benzo[b]fluoranteno	113 ± 17	114 ± 12	119 ± 2	0,71
benzo[k]fluoranteno	105 ± 15	104 ± 11	111 ± 1	0,86
benzo[e]pireno	91 ± 24	110 ± 14	105 ± 7	0,75
benzo[a]pireno	90 ± 21	102 ± 12	101 ± 8	0,71
6H-benzo[cd]piren-6-ona	80 ± 9	102 ± 15	96 ± 13	0,98
indeno-[1,2,3-cd]-pireno	92 ± 13	97 ± 13	104 ± 7	0,75
dibenzo[a,h]antraceno	76 ± 9	90 ± 9	95 ± 5	0,89
benzo[g,h,i]perileno	91 ± 4	106 ± 14	102 ± 5	0,73
6-nitrobenzo[a]pireno	76 ± 7	57 ± 6	48 ± 9	0,63

Fonte: a própria autora.

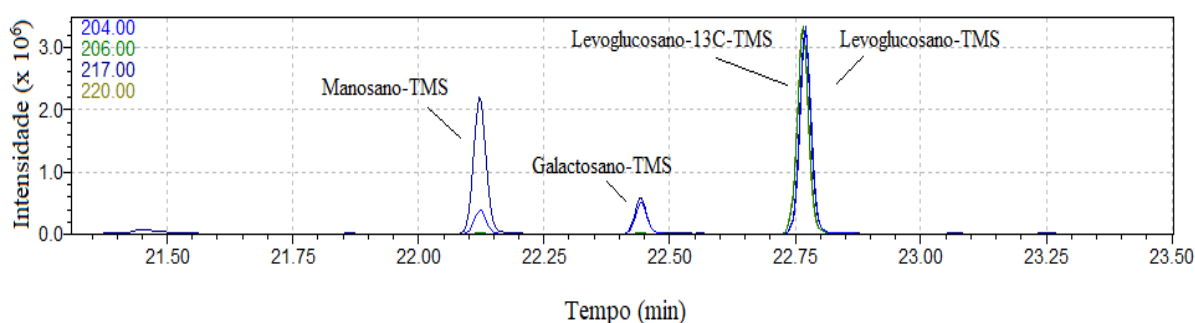
O método de extração otimizado também se mostrou adequado para a determinação de levoglucosano a uma concentração de 1,0 µg mL<sup>-1</sup> (no limite inferior das concentrações esperadas para esse tipo de amostra), com uma recuperação de 93 ± 6%. Isso demonstrou a capacidade de expandir a aplicação do método otimizado, tornando possível que o mesmo extrato usado para a determinação dos HPA por CG-EM possa ser posteriormente derivatizado e usado para a determinação de

levoglucosano, também por CG-EM. Essa aplicação será discutida com mais detalhes na próxima seção.

#### 4.1.3 Aplicação do método de extração otimizado para a determinação de anidroaçúcares

A determinação de levoglucosano foi realizada a partir da derivatização dos padrões e das amostras para quantificação por CG-EM. Foi obtida uma boa separação entre os derivados TMS do levoglucosano e de seus isômeros manosano e galactosano, como apresentado na Figura 18. O padrão interno levoglucosano-<sup>13</sup>C-TMS apresentou o mesmo tempo de retenção do levoglucosano-TMS, porém eles foram distinguidos pelos diferentes íons de quantificação e confirmação: 206 e 220 *m/z* para o levoglucosano-<sup>13</sup>C-TMS, e 204 e 217 *m/z* para o levoglucosano-TMS.

**Figura 18** - Recorte do cromatograma de uma mistura de levoglucosano, manosano, galactosano e levoglucosano-<sup>13</sup>C na concentração final de 1 µg mL<sup>-1</sup> após a etapa de derivatização



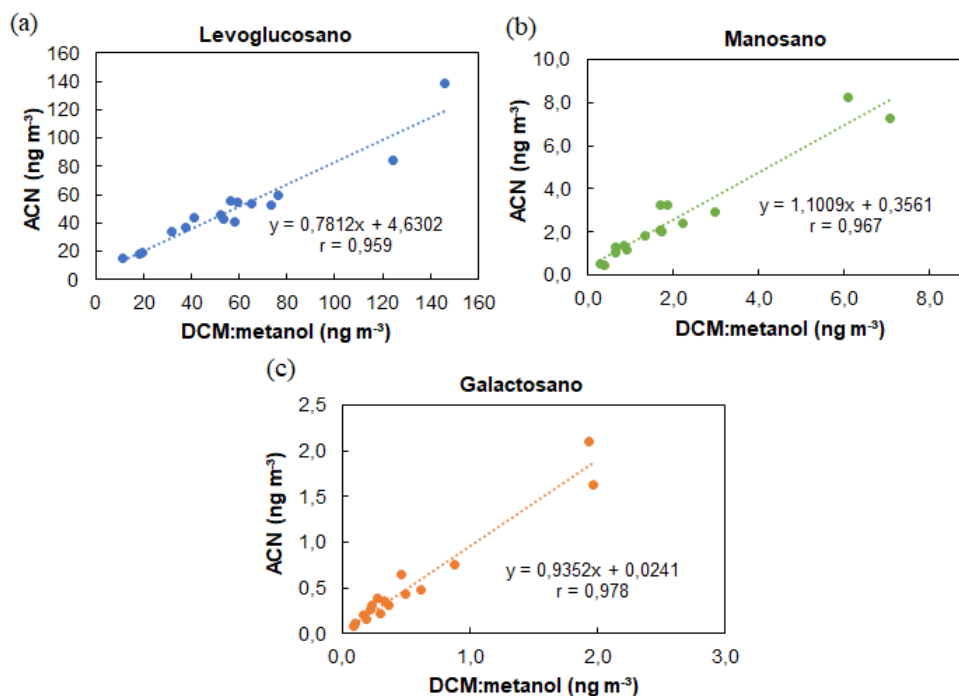
Fonte: a própria autora.

Assim como para os HPA e derivados, as curvas analíticas dos anidroaçúcares foram construídas com padrões que passaram pelo processo de extração. As curvas analíticas apresentaram boa linearidade no intervalo de trabalho, variando de 0,01 a 2,5 µg mL<sup>-1</sup> ( $r = 0,997$ ) para o manosano, de 0,01 a 1,0 µg mL<sup>-1</sup> ( $r = 0,992$ ) para o galactosano, e de 0,01 a 10 µg mL<sup>-1</sup> ( $r = 0,994$ ) para o levoglucosano.

O teste de exatidão do método de extração com acetonitrila foi realizado comparando as concentrações de 16 amostras de MP<sub>1,0</sub> extraídas por esse método e pelo método utilizando uma mistura de diclorometano e metanol, solventes normalmente empregados na análise de açúcares. Os métodos apresentaram boa

concordância, conforme demonstrado pelos coeficientes angulares e de correlação próximos a 1,0 apresentados na Figura 19.

**Figura 19** - Concentrações dos anidroaçúcares (a) levoglucosano, (b) manosano e (c) galactosano determinadas por CG-EM após a extração com diclorometano (DCM) e metanol versus a extração com acetonitrila (ACN).



Fonte: a própria autora.

Esse resultado demonstrou a capacidade de expandir a aplicação do método de extração de HPA otimizado com acetonitrila para também a extração de levoglucosano, manosano e galactosano. Dessa forma, o mesmo extrato utilizado para determinação dos HPA por CG-EM pôde ser posteriormente derivatizado e utilizado para a determinação desses anidroaçúcares também por CG-EM. Isso foi importante para o trabalho, pois tornou possível a análise dos filtros correspondentes às frações de MP<sub>2,5-10</sub> e MP<sub>1,0-2,5</sub> que precisaram ser extraídos inteiramente usando apenas um método de extração por não possuírem distribuição homogênea de partículas.

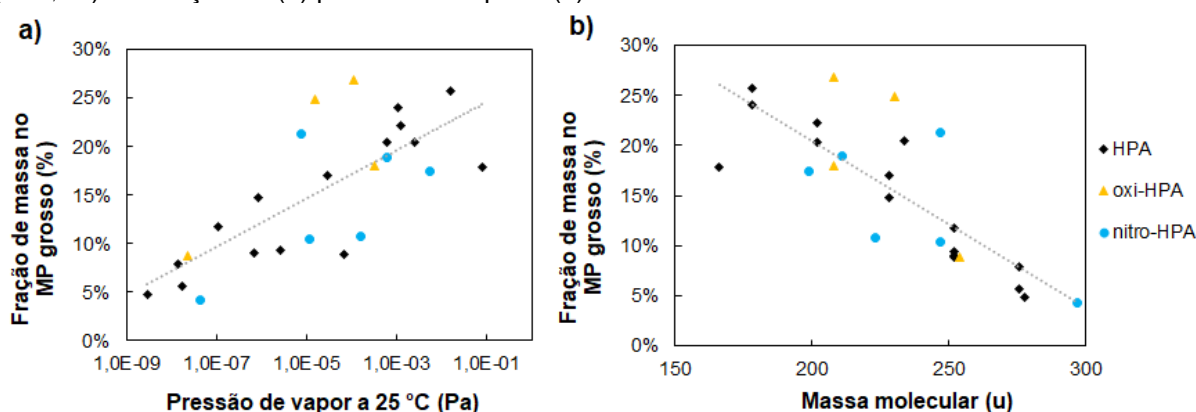
## 4.2 Distribuição dos HPA, oxi-HPA, nitro-HPA e anidroaçúcares no material particulado

### 4.2.1 Distribuição dos HPA e derivados de acordo com sua massa molecular e pressão de vapor

Embora estejam principalmente associados ao MP fino, os HPA e seus derivados podem migrar das partículas finas para as grossas por volatilização e sorção (ZHANG et al., 2020). Devido à sua semivolatilidade, as proporções de HPA, oxi-HPA e nitro-HPA nos modos grosso e fino são influenciadas pela temperatura ambiente, proximidade da fonte de emissão e propriedades físico-químicas como a massa molecular (MM) e a pressão de vapor ( $P_v$ ) (KEYTE; HARRISON; LAMMEL, 2013).

Neste trabalho, os compostos de baixa MM (3-4 anéis aromáticos) apresentaram uma maior proporção no modo grosso (9-27%), em comparação com os compostos com 5 ou mais anéis aromáticos (4-12%), que foram mais abundantes no modo fino. As frações de massa de HPA, oxi-HPA e nitro-HPA no modo grosso correlacionaram positivamente com a  $P_v$  ( $\rho = 0,736$ ,  $p < 0,05$ ,  $n = 25$ ) e negativamente com a MM ( $\rho = -0,798$ ,  $p < 0,05$ ) (Figura 20).

**Figura 20** - Mediana das frações de massa dos HPA, oxi-HPA e nitro-HPA determinadas no MP grosso (MP<sub>2,5-10</sub>) em função da (a) pressão de vapor e (b) massa molecular.



Fonte: a própria autora.

Os HPA de elevada MM geralmente têm menor  $P_v$ , portanto, o tempo necessário para a partição das partículas finas para as grossas é maior do que para os HPA de baixa MM. A partição também é influenciada pela temperatura ambiente,

mas não foi encontrada correlação entre a fração de massa no modo grosso e a temperatura ambiente, para nenhum composto, o que provavelmente se deve a pequenas variações de temperatura durante o ano na região de estudo.

Sabe-se que o destino ambiental e os efeitos na saúde dos HPA no MP dependem fortemente do tamanho do MP (ZHANG et al., 2020). Os HPA de elevada MM, que em geral tem maior potencial cancerígeno do que os HPA de baixa MM, tendem a se ligar a partículas mais finas e, conseqüentemente, podem penetrar mais profundamente no sistema respiratório humano, aumentando o risco à saúde humana. Além disso, as partículas finas têm tempos de residência atmosférica mais longos e podem ser transportadas por longas distâncias.

#### 4.2.2 Distribuição dos HPA e derivados no material particulado fracionado

As frações  $MP_{10-18}$  e  $MP_{>18}$  representaram, em média, apenas 4% do total de compostos aromáticos determinados em todas as frações, portanto não foram objeto de maiores investigações neste trabalho.

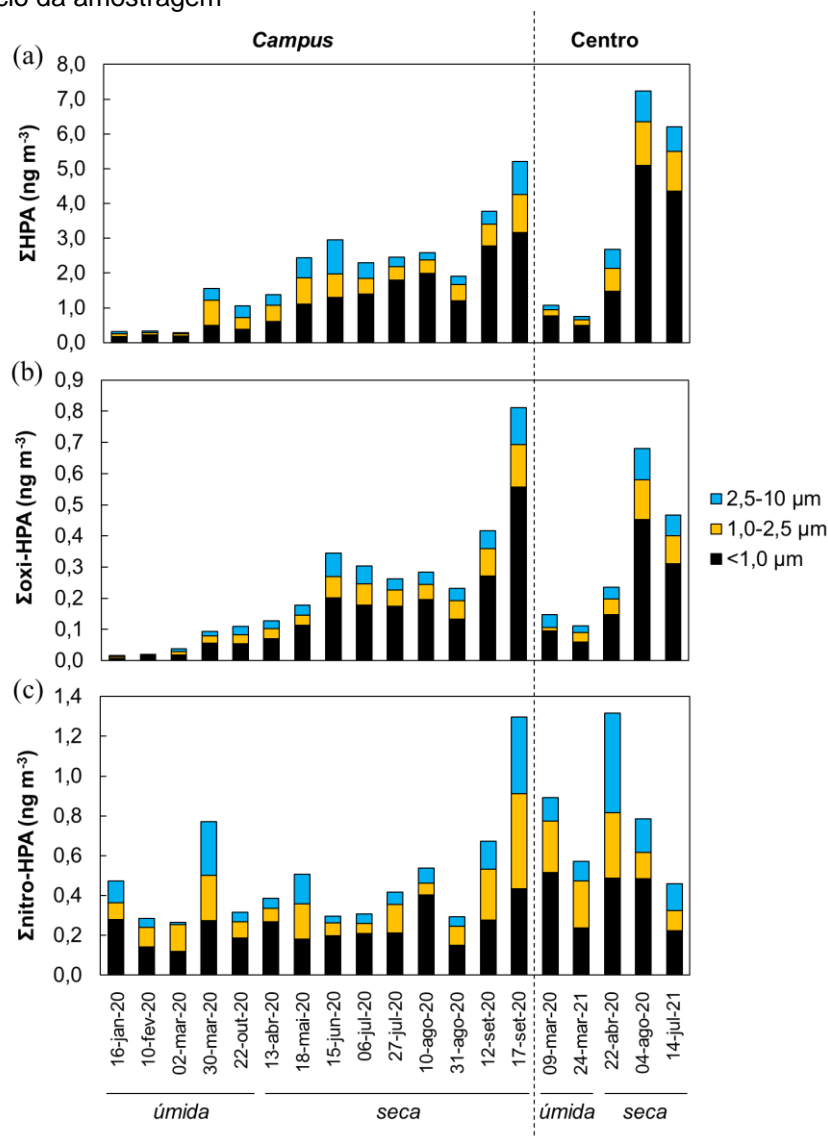
No  $MP < 10 \mu m$  ( $MP_{1,0} + MP_{1,0-2,5} + MP_{2,5-10}$ ), a soma das concentrações dos 15 HPA ( $\Sigma HPA$ ) variou de 0,29 a 7,2  $ng m^{-3}$ , com uma mediana de  $2,3 \pm 1,8 ng m^{-3}$  ( $n = 19$ ; Figura 21a). As contribuições foram maiores nas frações  $MP_{1,0}$  ( $63 \pm 21\%$ ) e  $MP_{1,0-2,5}$  ( $23 \pm 9\%$ ) do que na fração  $MP_{2,5-10}$  ( $13 \pm 10\%$ ). Isso era esperado, dada a influência das emissões de MP fino na queima de biomassa e de combustíveis fósseis na região de estudo (URBAN et al., 2012).

A soma das concentrações dos 4 oxi-HPA ( $\Sigma oxi-HPA$ ) foi aproximadamente uma ordem de grandeza menor que  $\Sigma HPA$ , variando de 0,02 a 0,81  $ng m^{-3}$ , com mediana de  $0,23 \pm 0,21 ng m^{-3}$  ( $n = 19$ ; Figura 21b). Assim como observado para os HPA, os oxi-HPA foram mais abundantes nas frações  $MP_{1,0}$  ( $63 \pm 10\%$ ) e  $MP_{1,0-2,5}$  ( $21 \pm 7\%$ ) do que na fração  $MP_{2,5-10}$  ( $17 \pm 7\%$ ). Além de serem emitidos diretamente nos processos de combustão, os oxi-HPA podem ser formados a partir dos HPA originais por foto-oxidação na atmosfera (WALGRAEVE et al., 2010).

A soma das concentrações dos 6 nitro-HPA ( $\Sigma nitro-HPA$ ) variou de 0,27 a 1,31  $ng m^{-3}$ , com mediana de  $0,46 \pm 0,41 ng m^{-3}$  e maiores contribuições nas frações  $MP_{1,0}$  ( $51 \pm 19\%$ ) e  $MP_{1,0-2,5}$  ( $29 \pm 15\%$ ) do que em  $MP_{2,5-10}$  ( $17 \pm 12\%$ ) (Figura 21c). Já era esperado que uma proporção maior de nitro-HPA estivesse associada às partículas finas, uma vez que esses compostos são gerados pela combustão incompleta e

pirólise de combustíveis fósseis e biomassa, bem como pela oxidação heterogênea dos HPA (BANDOWE; MEUSEL, 2017).

**Figura 21** - Concentrações da soma dos (a) HPA, (b) oxi-HPA e (c) nitro-HPA no MP coletado em Ribeirão Preto no campus (n = 14) e no centro da cidade (n = 5), em que a data apresentada corresponde ao início da amostragem



Fonte: a própria autora.

As concentrações de  $\Sigma\text{HPA}$  determinadas na soma de todas as frações foram semelhantes às observadas no  $\text{MP}_{10}$  coletado na cidade de São Carlos de 2015 a 2018 (médias anuais entre 0,98 e 2,03  $\text{ng m}^{-3}$ ; CARVALHO et al., 2023), bem como no  $\text{MP}_{2,5}$  coletado em Araraquara em 2014 (média de 2,1  $\text{ng m}^{-3}$ ; GONÇALVES et al., 2017). Esses valores de  $\Sigma\text{HPA}$  relatados recentemente são cerca de 2 a 8 vezes menores do que os observados para a mesma região em anos anteriores (2008-2010),

---

quando a colheita manual representava uma proporção importante da produção de cana-de-açúcar (SILVA et al., 2010; SOUZA et al., 2014).

As concentrações de  $\Sigma$ HPA encontradas neste trabalho também foram semelhantes às relatadas no  $MP_{10}$  coletado no arco de desmatamento na Amazônia, onde a queima de biomassa é notória (média: 2,0-3,4  $ng\ m^{-3}$ ; DE OLIVEIRA ALVES et al., 2015). As emissões de HPA durante a queima de biomassa são influenciadas pelo tipo de biomassa queimada, bem como pelo tipo de incêndio, se latente (sem chama) ou ardente (com chama alta), o que pode explicar a semelhança na concentração de HPA, apesar da disparidade de áreas queimadas (ALVES et al., 2011). Já na cidade de São Paulo, com aproximadamente 12 milhões de habitantes, a concentração média da soma dos HPA foi de 18,4  $ng\ m^{-3}$  no  $MP_{2,5}$ , isto é, maior do que as médias discutidas anteriormente, devido às elevadas emissões veiculares (PEREIRA et al., 2017).

Os perfis temporais de  $\Sigma$ HPA e  $\Sigma$ oxi-HPA foram semelhantes (Figura 21a e Figura 21b), com concentrações menores na estação úmida e maiores na estação seca. Uma forte correlação positiva significativa foi observada entre essas duas classes de compostos no  $MP < 2,5\ \mu m$  ( $\rho = 0,932$ ,  $p < 0,01$ ), indicando fontes semelhantes e/ou que os oxi-HPA foram formados a partir da oxidação dos HPA originais na atmosfera. Em contraste, a concentração de  $\Sigma$ nitro-HPA não mostrou uma tendência clara e não se correlacionou com  $\Sigma$ HPA ou  $\Sigma$ oxi-HPA, indicando que diferentes fontes contribuíram para a emissão ou formação secundária dos nitro-HPA.

As concentrações medianas de  $\Sigma$ HPA e  $\Sigma$ oxi-HPA no  $MP < 2,5\ \mu m$  coletado no centro da cidade (2,1 e 0,20  $ng\ m^{-3}$ , respectivamente) não foram significativamente diferentes daquelas do *campus* (1,8 e 0,17  $ng\ m^{-3}$ , respectivamente), apesar do intenso tráfego de veículos (incluindo ônibus) nas proximidades do local de amostragem do centro, evidenciando que as fontes de queima de biomassa podem afetar áreas com grande densidade populacional da cidade de Ribeirão Preto. Em contraste, a concentração média de  $\Sigma$ nitro-HPA para o centro da cidade (0,62  $ng\ m^{-3}$ ) foi aproximadamente o dobro do valor para o *campus* (0,38  $ng\ m^{-3}$ ), apesar de essa diferença não ter sido estatisticamente significativa (teste de Mann-Whitney,  $p = 0,058$ ), sugerindo que as fontes veiculares, especialmente de veículos a diesel, foram importantes na emissão dos nitro-HPA presentes nas amostras.

Um fator relevante que provavelmente influenciou as concentrações determinadas neste trabalho é a restrição de mobilidade imposta pelas autoridades

---

de forma a conter a pandemia de COVID-19, que teve início em março de 2020. Estudos realizados em diversos países, como Reino Unido, Índia e Croácia, relataram uma diminuição significativa na concentração de HPA no ar e no MP<sub>2,5</sub> que foi relacionada à diminuição das emissões devido ao *lockdown* (AMBADE et al., 2021; JAKOVLJEVIĆ et al., 2021; ROSA et al., 2024). De acordo com a busca bibliográfica realizada, no Brasil tal estudo comparativo com os HPA ainda não foi publicado, porém há diversos trabalhos que avaliaram o impacto das restrições da pandemia com a emissão de MP. Em Araraquara, cidade próxima à região de Ribeirão Preto, foi observado que a concentração de MP<sub>10</sub> não diminuiu durante o período pandêmico, e pelo ao contrário, foi observado um aumento em relação aos anos anteriores, o que foi atribuído ao elevado número de focos de incêndio na região (CARVALHO et al., 2023a).

#### 4.2.3 Distribuição dos anidroaçúcares no material particulado fracionado

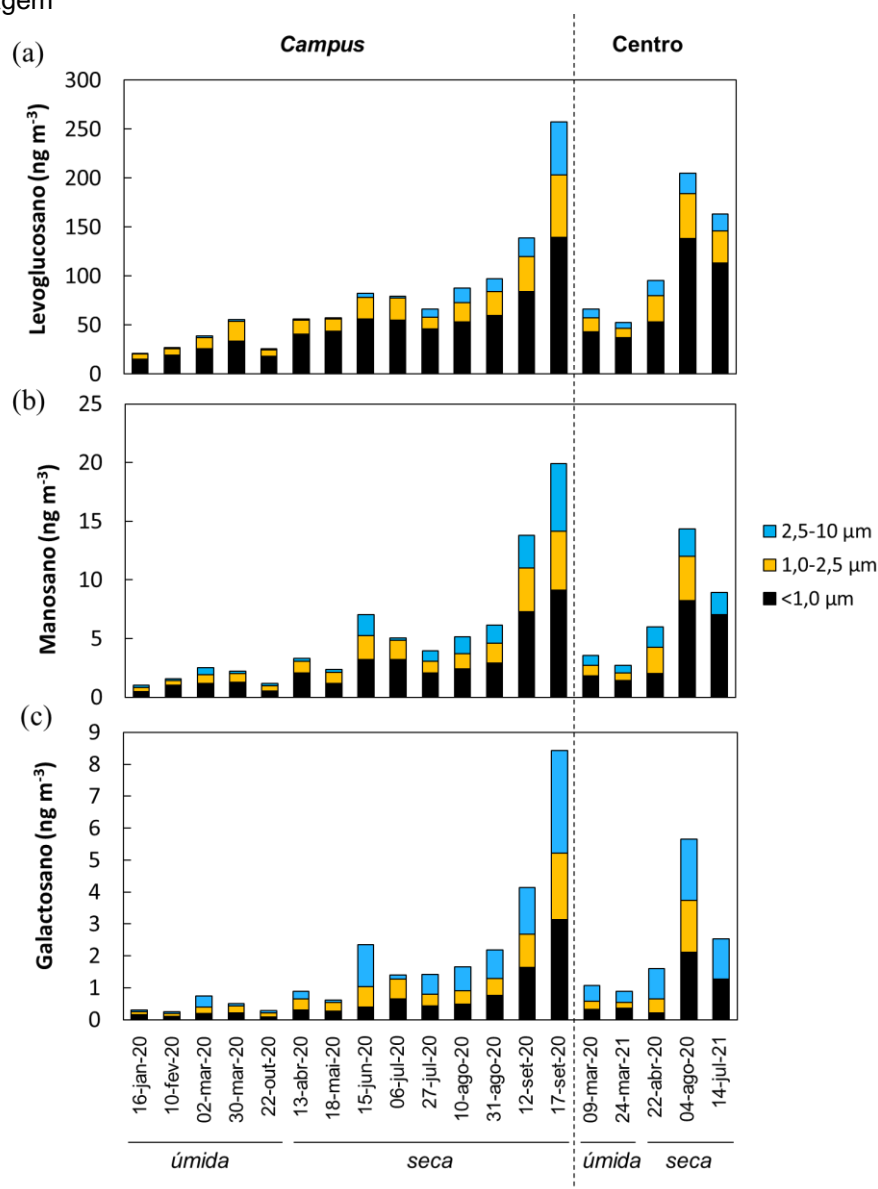
A concentração de levoglucosano no MP < 10 µm (MP<sub>1,0</sub> + MP<sub>1,0-2,5</sub> + MP<sub>2,5-10</sub>) variou de 21,3 a 257 ng m<sup>-3</sup> e foi cerca de dez vezes maior que a concentração de seus isômeros (Figura 22). A concentração de manosano variou de 1,0 a 19,9 ng m<sup>-3</sup> e a de galactosano de 0,2 a 8,4 ng m<sup>-3</sup>. Essas concentrações estão na parte inferior da faixa relatada para amostras de MP total de Araraquara e Ourinhos coletadas por 24 h, entre 2010 e 2012, que foi de 12 a 382, 2 a 76, e 2 a 53 ng m<sup>-3</sup> para levoglucosano, manosano e galactosano, respectivamente (n = 73; URBAN et al., 2014). Essa diferença provavelmente se deve ao fato de que o número de focos de incêndio no estado de São Paulo em 2010 foi de 20 a 35% maior que em 2020 e 2021, e era um período em que ainda se queimava a palha da cana-de-açúcar antes da colheita manual, que representava 37% da colheita total, enquanto em 2020 e 2021, a colheita manual correspondeu a apenas 1,5% (CONAB, 2022).

A concentração dos anidroaçúcares na fração fina (MP<sub>1,0-2,5</sub> + MP<sub>1,0</sub>) foi maior que na fração grossa (MP<sub>2,5-10</sub>), correspondendo a 91, 81 e 65% do total, para levoglucosano, manosano e galactosano, respectivamente. Uma maior proporção desses açúcares já era esperada na fração fina, uma vez que esses compostos são emitidos pela queima de biomassa (URBAN et al., 2012). Os perfis temporais dos anidroaçúcares foram semelhantes entre si (Figura 22), com concentrações menores na estação úmida e maiores na estação seca, quando ocorre o maior o número de



queimadas. Na fração fina, levoglucosano, manosano e galactosano correlacionaram significativamente ( $p < 0,01$ ) com o número de focos de incêndio no estado de São Paulo, com  $p = 0,824$ ,  $0,815$  e  $0,877$ , respectivamente (Apêndice B).

**Figura 22** - Concentrações de levoglucosano, manosano e galactosano no MP coletado em Ribeirão Preto no campus ( $n = 14$ ) e no centro da cidade ( $n = 5$ ), em que a data apresentada corresponde ao início da amostragem



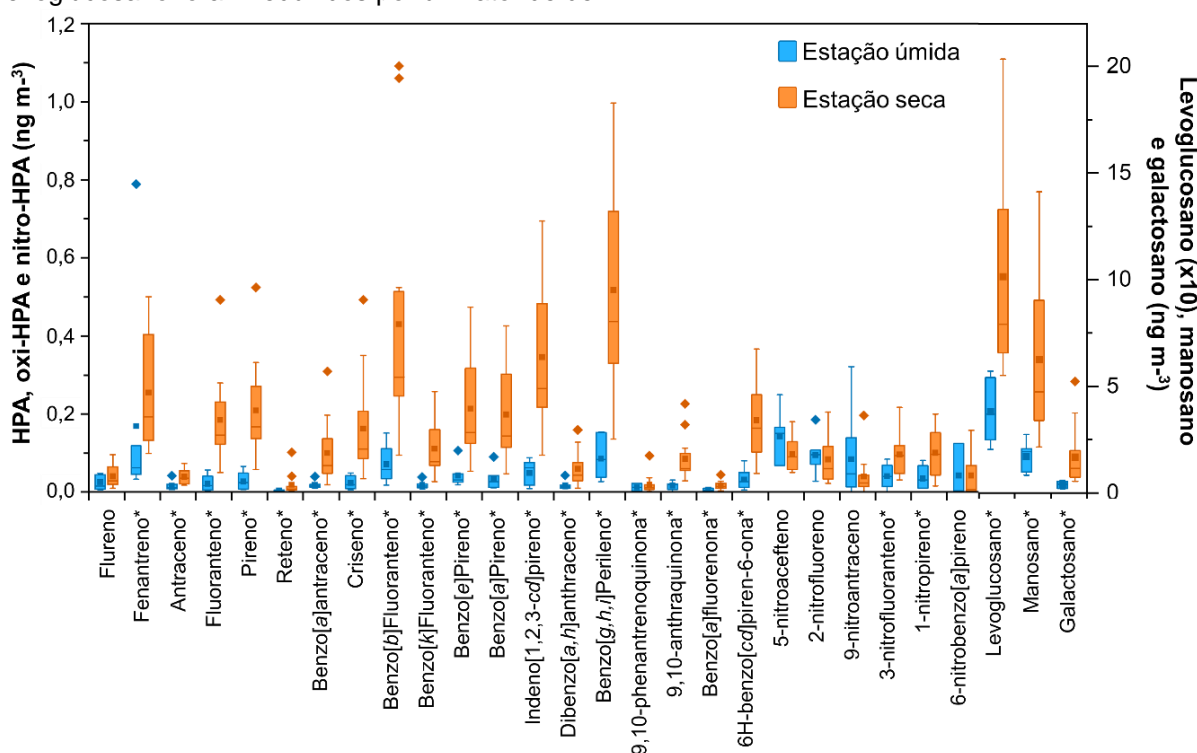
Fonte: a própria autora.

### 4.3 Distribuição sazonal e identificação das fontes de emissão dos compostos policíclicos aromáticos e anidroaçúcares no material particulado

#### 4.3.1 Sazonalidade

Considerando ambos os sítios amostrais, as concentrações de 18 dos 19 HPA e oxi-HPA analisados foram significativamente maiores na estação seca do que na estação úmida (Figura 23). Dentre os nitro-HPA, apenas o 3-nitrofluoranteno e o 1-nitropireno apresentaram concentrações significativamente maiores na estação seca.

**Figura 23** - Diagramas de caixa das concentrações de HPA, oxi-HPA, nitro-HPA e anidroaçúcares no MP<sub>2,5</sub> coletado no campus e no centro de Ribeirão Preto, durante a estação úmida (n = 7) e seca (n = 12). A linha do meio na caixa representa a mediana; a caixa inferior é o primeiro quartil; a caixa superior é o terceiro quartil; as barras de erro indicam valores mínimos e máximos; (■) média; (♦) outliers. O asterisco (\*) ao lado do nome do composto indica uma diferença significativa entre as medianas para cada estação (teste de Mann-Whitney; p < 0,05). Observe que os valores mostrados para levoglucosano foram reduzidos por um fator de dez



Fonte: a própria autora.

As concentrações do 2-nitrofluoreno e do 9-nitroantraceno foram mais elevadas no MP<sub>2,5</sub> do que de seus respectivos HPA equivalentes não-substituídos, tanto na estação seca quanto na estação chuvosa. Uma possível razão para isso é o fato de que esses nitro-HPA têm maior massa molecular e menor pressão de vapor (2-

---

nitrofluoreno:  $5,9 \times 10^{-4}$  Pa; 9-nitroantraceno:  $1,6 \times 10^{-4}$  Pa a  $25^\circ\text{C}$ ) do que os HPA não-substituídos (fluoreno:  $8,0 \times 10^{-2}$  Pa; antraceno:  $1,1 \times 10^{-3}$  Pa a  $25^\circ\text{C}$ ). Portanto, é mais provável que estejam em maiores concentrações na fase particulada em comparação com seus HPA não-substituídos, que são relativamente voláteis (SOUZA et al., 2014). Além disso, interações polares específicas dos nitro-HPA com material orgânico no MP podem contribuir para a maior fração de nitro-HPA na fase particulada (BANDOWE; MEUSEL, 2017).

As concentrações de levoglucosano, assim como seus isômeros manosano e galactosano, também foram mais elevadas na estação seca do que na estação chuvosa (Figura 23), fornecendo evidências adicionais da influência importante da queima de biomassa na região de estudo. Outros marcadores químicos, como espécies iônicas solúveis em água e a razão de diagnóstico entre carbono orgânico e carbono elementar (CO/CE), também são amplamente usados como traçadores de queima de biomassa (JANTA et al., 2020). A concentração de espécies como potássio e carbono orgânico dissolvido em água de chuva e no MP coletado na mesma região de estudo mostrou um grande aumento durante a estação seca, quando a maioria dos incêndios de biomassa ocorre (COELHO et al., 2011; GODOY-SILVA; NOGUEIRA; CAMPOS, 2017; GONÇALVES et al., 2017). Além disso, Gonçalves e colaboradores (2017) observaram uma boa correlação entre potássio e levoglucosano no  $\text{MP}_{2,5}$ . Neste trabalho, selecionamos o levoglucosano e seus isômeros como traçadores de queima de biomassa devido à sua alta especificidade e relativa estabilidade atmosférica (URBAN et al., 2012; JANTA et al., 2020). Além disso, o fato de ter sido possível usar o mesmo extrato orgânico para determinar HPA e levoglucosano simplificou a análise.

As concentrações de reteno determinadas no  $\text{MP}_{2,5}$  neste trabalho ( $<\text{LD}$  a  $0,10 \text{ ng m}^{-3}$ ) foram cerca de uma ordem de magnitude inferiores às relatadas nas amostras de MP total coletadas em 2010/2011 em Araraquara ( $11,3 \pm 11,0 \text{ ng m}^{-3}$ ; URBAN et al., 2016). O reteno é emitido principalmente pela queima de biomassa, e as baixas concentrações desse HPA encontradas neste trabalho pode ser devido a uma mudança no tipo de queima e/ou no tipo de biomassa queimada. Uma combustão ardente (*flaming*), mais rápida e intensa, apresenta diferente perfil de emissão que uma combustão fumegante (*smoldering*), que é mais lenta, e da mesma forma, diferentes tipos de plantas quando queimadas também geram diferentes perfis de emissão de HPA (ALVES et al., 2019). Um indicativo do perfil de emissão é a razão

---

entre levoglucosano e seu isômero manosano, que varia principalmente de acordo com o tipo de biomassa queimada (PIO et al., 2008). A razão encontrada neste trabalho foi de  $19 \pm 5$  ( $n = 19$ ), diferente da razão encontrada nas amostras de 2010/11, que foi de  $9 \pm 5$  ( $n = 105$ ; URBAN et al., 2014), indicando que no ano de 2020 o tipo de queima foi diferente. A queima do bagaço da cana-de-açúcar para gerar energia elétrica dentro das usinas também pode ter influenciado as emissões, uma vez que em 2020 a quantidade de energia gerada por essa prática foi 73% maior do que em 2010 (MME, 2023).

As concentrações e a composição das partículas na atmosfera podem ser afetadas pelas variáveis meteorológicas (TAI; MICKLEY; JACOB, 2010). Como esperado, durante o período de amostragem, a umidade relativa local foi menor na estação seca, enquanto os números de focos de incêndio no estado de São Paulo foram maiores do que na estação chuvosa (teste de Mann-Whitney,  $p < 0.05$ ). A temperatura e a velocidade do vento não diferiram significativamente entre as estações (Tabela 16).

**Tabela 16** - Parâmetros meteorológicos, número de dias sem chuva anteriores às amostragens, e número de focos de incêndio acumulados no estado de São Paulo durante as amostragens nas estações úmida e seca em Ribeirão Preto.

	<b>Estação úmida</b> (n = 7)		<b>Estação seca</b> (n = 12)	
	Mín. – Máx.	Mediana	Mín. – Máx.	Mediana
Temperatura média (°C)	23,2 - 26,6	25,1	19,9 - 27,4	22,1
Umidade relativa média (%)*	66,0 - 85,1	72,1	35,2 - 79,8	54,4
Velocidade do vento média (m s <sup>-1</sup> )	0,71 - 1,67	0,95	0,82 - 1,67	0,98
Radiação solar diária média (MJ m <sup>-2</sup> )*	15,7 - 22,4	20,8	15,4 - 21,2	17,3
Dias anteriores sem chuva*	0 - 6	0	2 - 55	15
Focos de incêndio acumulados no estado de São Paulo*	7 - 34	15	38 - 852	104

O asterisco (\*) ao lado do parâmetro meteorológico indica que houve diferença significativa entre as medianas de cada estação (teste de Mann-Whitney;  $p < 0.05$ ).

Foi realizada a correlação de Spearman entre todas as espécies analisadas e também com as variáveis meteorológicas (Apêndice B). As concentrações da maioria dos HPA, particularmente aqueles cujas medianas foram significativamente diferentes entre as estações seca e chuvosa, foram negativamente correlacionadas com a umidade relativa do ar, enquanto correlações positivas foram obtidas com levoglucosano e o número de focos de incêndio. Não foram encontradas correlações

---

com a radiação solar e a temperatura. Esses resultados sugerem que a sazonalidade observada foi influenciada principalmente pela chuva, umidade relativa do ar e queima de biomassa na região. Como a queima ocorreu com maior frequência durante a estação seca, houve maiores emissões para a atmosfera, agravadas pela baixa remoção das partículas por deposição úmida, como já observado em outras cidades tropicais brasileiras (ALVES et al., 2015; GALVÃO et al., 2018; CARVALHO et al., 2023b). Na região sul do Brasil, onde o clima é temperado, as maiores concentrações de HPA durante o inverno foram explicadas por temperaturas mais baixas e menores valores de altura da camada limite, que impedem a dispersão de poluentes (AGUDELO-CASTAÑEDA; TEIXEIRA, 2014).

#### 4.3.2 Identificação das fontes de emissão

As contribuições de diferentes fontes de emissão de MP podem ser identificadas e quantificadas por diversos métodos, como fatoração de matriz positiva (PMF, do inglês *positive matrix factorization*), análise de componentes principais (PCA, do inglês *principal factor analysis*) e balanço químico de massa (CMB, do inglês *chemical mass balance*) (GALVÃO; DE CASSIA FERONI; D'AZEREDO ORLANDO, 2021). O CMB requer conhecimento detalhado das fontes e perfis de emissão nas áreas receptoras, que atualmente não estão disponíveis nos locais estudados. PMF e PCA requerem apenas observações ambientais (incluindo as incertezas das medidas para o PMF), portanto seriam mais adequados para o nosso estudo. Várias tentativas foram realizadas para obter um modelo satisfatório com o PMF, porém este resultou em modelos não ajustados. Isto provavelmente deve-se ao número limitado de amostras ( $n = 19$ ) em relação ao número de compostos determinados ( $n = 28$ ), além da alta colinearidade (forte correlação linear entre a maioria das variáveis). A eficácia do PMF também pode ser comprometida quando as emissões têm uma correlação temporal ou quando a meteorologia tem um impacto relevante na variabilidade do MP (GIANINI et al., 2013). Na região de estudo, a sazonalidade tem um forte efeito na composição do MP e, portanto, o modelo PMF pode não representar as reais fontes de emissão.

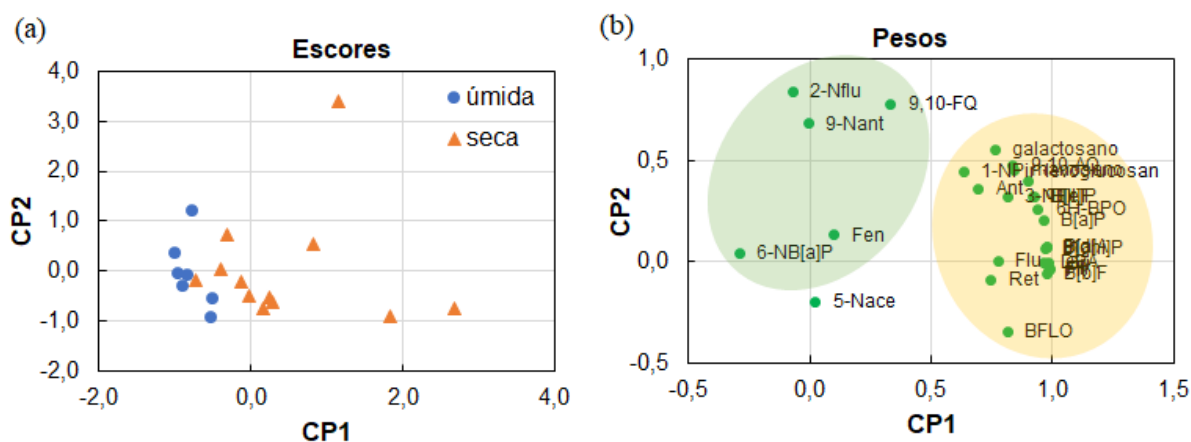
Portanto, a PCA foi selecionada para simplificar a complexidade dos dados enquanto retém as tendências e padrões que podem auxiliar na elucidação das possíveis fontes de emissão dos HPA nos locais de amostragem. Embora a PCA

---

tenha limitações para resolver relações fortemente não lineares entre as variáveis e para capturar toda a complexidade das contribuições das fontes, é uma técnica útil amplamente aplicada para identificar as principais fontes (LARA et al., 2022), que no nosso caso, é suficiente para atingir os objetivos aqui propostos.

A partir da PCA, foram extraídas três componentes principais (CP) capazes de explicar 84,8% da variabilidade dos dados, sendo que a primeira e a segunda componentes (CP1 e CP2) responderam por 65,3% e 10,8% da variabilidade, respectivamente. O gráfico de escores, que representa as relações de similaridade entre as amostras, indicou claramente a separação entre os dois grupos de amostras correspondentes às estações úmida e seca, impulsionada principalmente pela CP1 (Figura 24a). O gráfico de pesos para CP1 e CP2 (correlação entre os componentes principais e as variáveis originais), mostrado na Figura 24b, indica quais analitos que mais contribuíram para os agrupamentos observados no gráfico de escores.

**Figura 24** - (a) Gráfico de escores e (b) gráfico de pesos para CP1 x CP2, obtidos da análise de componentes principais das 19 amostras de MP<sub>2,5</sub>.



Fonte: a própria autora.

A PC1 apresentou altos pesos para os anidroaçúcares levoglucosano, manosano e galactosano, que são marcadores específicos de queima de biomassa (Tabela 17). A maioria dos HPA e oxi-HPA também apresentou altos pesos em PC1, sugerindo que esses compostos compartilharam uma fonte com os marcadores de queima de biomassa.

Um segundo grupo de variáveis foi separado do grupo principal em CP1 (Figura 24b). Considerando os compostos neste grupo, 2-nitrofluoreno, 9-nitroantraceno e 6-nitrobenzo[a]pireno foram relatados em partículas de emissões de combustão de diesel (PAPUTA-PECK et al., 1983; IARC, 2012). Além disso, o 2-nitrofluoreno foi o

composto policíclico aromático mais abundante encontrado no MP<sub>1,0</sub> e MP<sub>2,5</sub> diretamente emitidos por motores movidos a diesel misturado com biocombustíveis (biodiesel e etanol), amplamente utilizados no Brasil (PAIM et al., 2023). O fenantreno é um HPA leve que pode ser emitido pela queima de biomassa e/ou veículos movidos a diesel (SIMONEIT, 2002; RAVINDRA; SOKHI; VAN GRIEKEN, 2008). Houve uma correlação positiva significativa entre 9,10-fenantrenoquinona e fenantreno ( $\rho = 0,755$ ,  $p < 0,01$ ), o que pode ser explicado pelo fato de que a 9,10-fenantrenoquinona pode ser emitida diretamente e/ou ser formada a partir da oxidação do fenantreno (WANG; ATKINSON; AREY, 2007). Essas observações foram indicativas de uma contribuição importante das emissões da combustão de diesel na CP2.

**Tabela 17** - Pesos obtidos na análise de componentes principais (CP) das 19 amostras de MP<sub>2,5</sub>

CP	1	2	3
% variância	65,3	10,8	8,7
% acumulada	65,3	76,1	84,8
<i>Compostos</i>			
Fluoreno	0,741	-0,232	-0,071
Fenantreno	0,197	0,528	0,712
Antraceno	0,792	0,377	0,269
Fluoranteno	0,949	-0,223	0,133
Pireno	0,954	-0,228	0,112
Reteno	0,717	-0,155	0,235
Benzo[a]antraceno	0,963	-0,164	0,004
Criseno	0,954	-0,217	0,075
Benzo[b]fluoranteno	0,931	-0,276	0,063
Benzo[k]fluoranteno	0,960	0,057	-0,122
Benzo[e]pireno	0,966	0,048	-0,142
Benzo[a]pireno	0,978	-0,063	-0,087
Indeno[1,2,3-cd]pireno	0,966	-0,152	0,025
Dibenzo[a,h]antraceno	0,925	-0,264	-0,024
Benzo[g,h,i]perileno	0,955	-0,179	-0,008
9,10-fenantrenoquinona	0,527	0,761	-0,047
9,10-antraquinona	0,924	0,238	-0,148
Benzo[a]fluorenona	0,728	-0,368	0,394
6H-benzo[cd]piren-6-ona	0,965	-0,026	-0,131
5-nitroacenafteno	0,007	0,028	0,449
2-nitrofluoreno	0,128	0,783	-0,321
9-nitroantraceno	0,106	0,333	-0,771
3-nitrofluoranteno	0,882	0,225	0,130
1-nitropireno	0,741	0,415	0,139
6-nitrobenzo[a]pireno	-0,206	0,528	0,708
Levoglucosano	0,966	0,163	-0,089
Manosano	0,919	0,196	-0,167
Galactosano	0,863	0,293	-0,234

Fonte: a própria autora.

O composto 5-nitroacenafteno apresentou pesos próximos de zero em CP1 e CP2. Poucos estudos relataram concentrações ambientais desse nitro-HPA, que em estudos controlados em câmaras foi observado como um produto de reações em fase

gasosa iniciadas por radicais OH<sup>·</sup> (AREY et al., 1989; BAMFORD; BAKER, 2003). A CP3 explicou 8,7% da variância total e teve pesos baixos, portanto nenhuma fonte específica pôde ser associada a essa componente.

A avaliação de sazonalidade do MP<sub>2,5</sub> revelou que os HPA mais abundantes na estação úmida foram fenantreno (18%), benzo[ghi]perileno (15%), benzo[b]fluoranteno (12%), benzo[e]pireno (7,4%) e indeno[1,2,3-cd]pireno (6,9%). Na estação seca, os mais abundantes foram benzo[ghi]perileno (19%), benzo[b]fluoranteno (14%), indeno[1,2,3-cd]pireno (12%), pireno (7,9%) e fluoranteno (6,9%). Dentre estes, benzo[b]fluoranteno e indeno[1,2,3-cd]pireno são classificados como “possivelmente cancerígenos” para humanos (grupo 2B), com evidências suficientes de carcinogenicidade em animais experimentais (IARC, 2010). Os oxi-HPA mais abundantes em ambas as estações foram 6*H*-benzo[cd]piren-6-ona e 9,10-antraquinona, correspondendo a 43 e 28%, respectivamente, da concentração total de oxi-HPA na estação chuvosa, e por 61 e 27%, respectivamente, na estação seca. O composto 6*H*-benzo[cd]piren-6-ona foi relatado como mutagênico e um forte promotor tumoral em linhas celulares humanas (CLERGÉ et al., 2019). Entre os nitro-HPA, 5-nitroacenafteno (31%), 2-nitrofluoreno (21%) e 9-nitroantraceno (15%) foram os mais abundantes na estação úmida, enquanto 1-nitropireno (22%), 5-nitroacenafteno (21%) e 3-nitrofluoranteno (20%) foram os mais abundantes na estação seca. O 1-nitropireno é classificado como provavelmente cancerígeno para humanos (Grupo 2A), enquanto 2-nitrofluoreno e 5-nitroacenafteno são possivelmente cancerígenos para humanos (Grupo 2B) (OEHHA, 2011; IARC, 2012).

Dessa forma, é evidente que o MP caracterizado neste trabalho contém compostos orgânicos potencialmente perigosos à saúde humana, indicando a necessidade de se avaliar melhor os riscos de sua exposição.

#### 4.4 Avaliação do risco de câncer

A atividade carcinogênica da mistura de HPA foi expressa como concentrações equivalentes a benzo[a]pireno (B[a]P<sub>eq</sub>), que variaram de 0,13 a 3,0 ng m<sup>-3</sup> (n = 19) no MP<sub>2,5</sub>, sendo a mediana para a estação seca (0,82 ng m<sup>-3</sup>) aproximadamente quatro vezes maior que a mediana para a estação úmida (0,22 ng m<sup>-3</sup>). Esses resultados, ainda que com valores relativamente baixos, indicam uma maior atividade carcinogênica do MP principalmente associada à queima de biomassa.



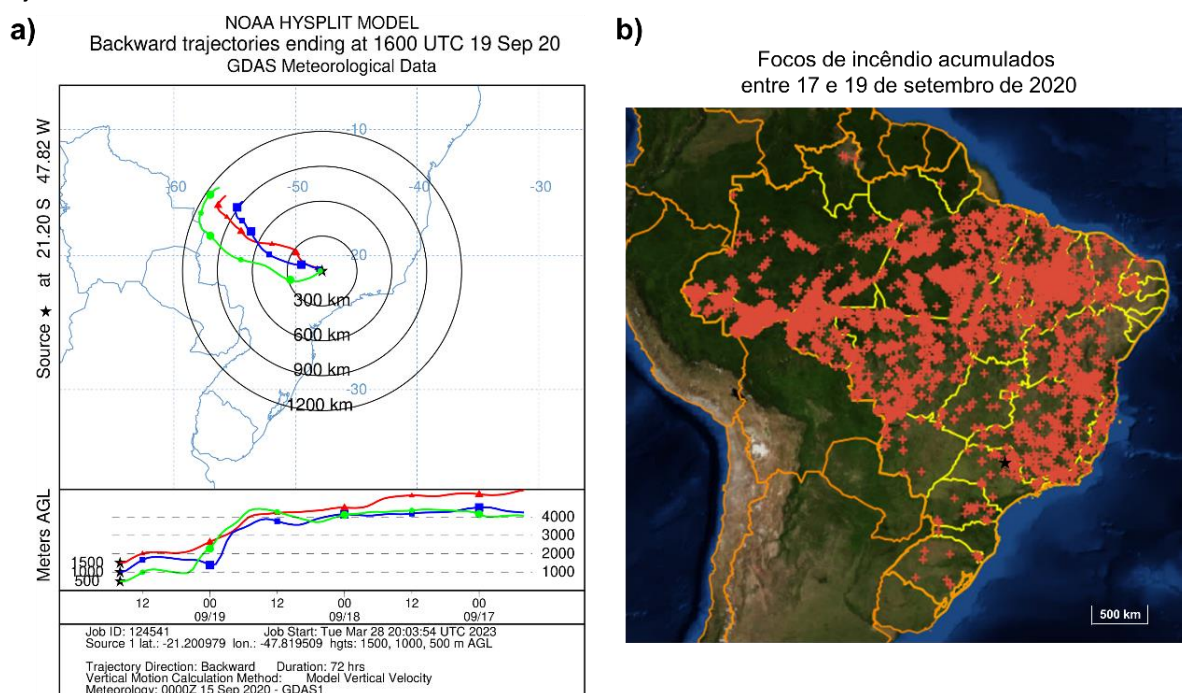
---

A concentração de B[a]P<sub>eq</sub> também foi determinada no MP após um evento extremo ocorrido em 18 de setembro de 2020, quando foram registrados 10 focos de incêndio no perímetro do município de Ribeirão Preto, resultando na queima de mais de 10 ha de vegetação e plantações de cana-de-açúcar (<https://g1.globo.com/sp/ribeirao-preto-franca/noticia/2020/09/19/queimada-com-redemoinho-destroi-area-superior-a-10-campos-de-futebol-em-ribeirao-preto-diz-corpo-de-bombeiros.ghtml>). Na manhã seguinte, uma intensa camada de neblina cobriu a cidade e uma amostragem de MP total foi realizada durante 6 horas (7:35 – 13:50). A concentração de levoglucosano obtida foi de 1.225 ng m<sup>-3</sup>, 15 vezes maior que a concentração mediana determinada para a estação seca. A concentração de B[a]P<sub>eq</sub> para esta amostra foi de 18,8 ng m<sup>-3</sup>, que foi ~23 vezes maior que a mediana de B[a]P<sub>eq</sub> determinada no MP<sub>2,5</sub> coletado na estação seca, evidenciando que os riscos à saúde podem ser bastante aumentados devido a eventos extremos.

Além do grande número de incêndios locais, foi observado um aumento geral nos níveis de MP em todo o estado de São Paulo entre os dias 18 e 19 de setembro, associado aos incêndios florestais na região centro-oeste do país (Figura 25) (CETESB, 2020). Ventos fracos nos níveis baixos da atmosfera, juntamente com a diminuição da camada de mistura, resultaram em uma concentração média de MP<sub>2,5</sub> (24 h) de 113 µg m<sup>-3</sup> em Ribeirão Preto, 7,5 vezes superior ao valor diretriz estabelecido pela Organização Mundial da Saúde (CETESB, 2020; WHO, 2021). Em 19 de setembro de 2020, Ribeirão Preto apresentou a pior qualidade do ar entre todas as cidades monitoradas no estado de São Paulo, mostrando que a queima de biomassa ainda pode ser considerada um fator de risco relevante para a saúde da população que vive na região.

---

**Figura 25** - (a) Trajetórias de massas de ar de três dias chegando em Ribeirão Preto (marcada com ★) em três altitudes (500, 1.000 e 1.500 m) no dia 19 de setembro de 2020, no momento que a amostragem de MP total terminou. (B) Focos de incêndio registrados em todo país durante o mesmo período das trajetórias de massas de ar.



Fonte: NOAA (<http://ready.arl.noaa.gov/hypub-bin/trajsrc.pl>) e INPE (<http://queimadas.dqi.inpe.br/queimadas/bdqueimadas#>).

O risco de se contrair câncer de pulmão ao longo da vida foi estimado usando o benzo[a]pireno como um composto representativo da mistura de HPA (AQUILINA; HARRISON, 2023), e variou de  $9,4 \times 10^{-7}$  a  $3,7 \times 10^{-5}$ , o que corresponde a um excesso de aproximadamente 0,1 a 3,7 casos de câncer de pulmão por 100.000 pessoas. Esses valores estimados de risco de câncer foram semelhantes aos calculados com base nas concentrações de benzo[a]pireno relatadas na região amazônica (0,2 a 5,0 casos de câncer de pulmão por 100.000 pessoas; DE OLIVEIRA ALVES et al., 2015), mas foram de 1 a 2 ordens de magnitude menores do que aqueles calculados com base em dados relatados para a megacidade de São Paulo, onde há altas emissões veiculares e industriais (6 a 200 casos de câncer de pulmão por 100.000 pessoas; CAUMO et al., 2022).

Algumas limitações relacionadas à estimativa do risco de câncer devem ser mencionadas. Compostos com alto potencial tóxico, como nitro-HPA e HPA com massa molecular  $> 300$  u, incluindo os isômeros de dibenzopirenos, não foram incluídos no cálculo das concentrações de  $B[a]P_{eq}$ , de acordo com os fatores relativos propostos pela USEPA. Portanto, os valores de risco de câncer calculados aqui

provavelmente estão subestimados. Além disso, avaliar o risco de câncer relacionado à exposição aos HPA usando um único marcador, ou então usando uma abordagem baseada na soma dos potenciais de apenas alguns HPA, pode não representar com precisão o risco real à saúde. Misturas complexas de HPA devem ser preferencialmente estudadas como um todo, pois dessa forma inclui-se todos os compostos e as interações entre eles (DREIJ et al., 2017; AQUILINA; HARRISON, 2023). Assim, a etapa seguinte do trabalho buscou avaliar potenciais efeitos tóxicos das misturas complexas de HPA obtidas da extração do material particulado, utilizando células humanas.

#### 4.5 Toxicidade *in vitro* dos extratos de material particulado

Os efeitos citotóxicos e genotóxicos do MP foram avaliados expondo células HepG2 (células de fígado humano) a três diferentes extratos orgânicos de amostras de MP<sub>1,0</sub>. Esta fração foi escolhida para os estudos de toxicidade pois se trata da fração mais fina amostrada e possui a maior capacidade de penetrar pelo sistema respiratório humano, alcançar a corrente sanguínea e ter um efeito sistêmico (HEAL; KUMAR; HARRISON, 2012). Esses extratos foram ajustados para ter a mesma concentração final, equivalente a 1 m<sup>3</sup> de ar amostrado em 1 mL do meio contendo as células (Tabela 18).

**Tabela 18** - Concentrações de HPA, oxi-PAH, nitro-HPA e levoglucosano determinadas nas amostras utilizadas nos ensaios *in vitro*

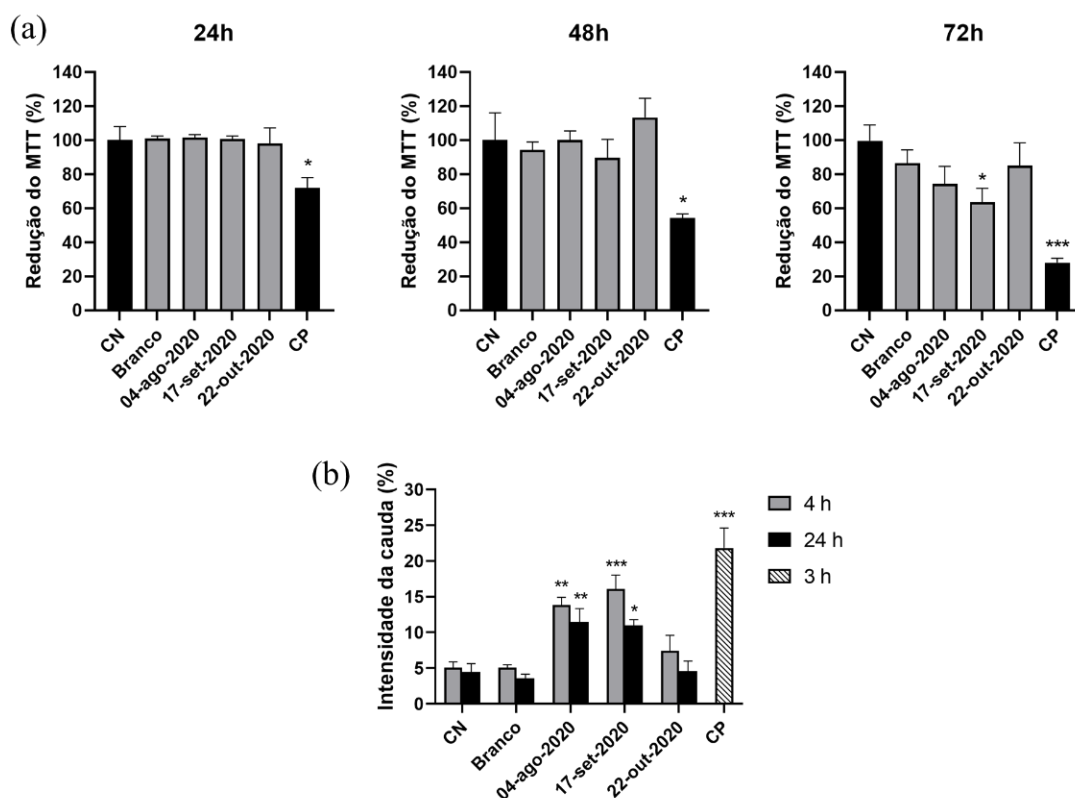
Amostra (MP < 1 µm)	ΣHPA (ng m <sup>-3</sup> )	Σoxi-HPA (ng m <sup>-3</sup> )	Σnitro-HPA (ng m <sup>-3</sup> )	B[a]P <sub>eq</sub> (ng m <sup>-3</sup> )	Levoglucosano (ng m <sup>-3</sup> )
<i>Estação seca</i>					
04-ago-2020	5,10	0,45	0,48	3,00	138
17-set-2020	3,17	0,56	0,44	1,59	139
<i>Estação úmida</i>					
22-out-2020	0,38	0,05	0,19	0,25	18,3

Fonte: a própria autora.

O ensaio do MTT foi usado para determinar a viabilidade das células HepG2 após a exposição aos extratos. Não foram observadas alterações significativas na viabilidade celular após 24 e 48 horas de exposição a nenhuma das amostras testadas (Figura 26a). No entanto, após 72 horas, a viabilidade celular diminuiu significativamente para 64% ( $p < 0,05$ ) após a exposição ao extrato da amostra coletada em 17 de setembro de 2020, indicando que este extrato foi potencialmente

citotóxico para as células HepG2. Surpreendentemente, esta amostra apresentou concentrações menores de  $\Sigma$ HPA e  $B[a]P_{eq}$  do que a amostra coletada em 4 de agosto de 2020, que resultou em uma diminuição na viabilidade celular que não foi estatisticamente significativa. Isso pode ser explicado pelo fato de que os efeitos causados pelos HPA não são simplesmente baseados em efeitos aditivos da mistura, mas podem resultar de interações desconhecidas entre os componentes da mistura (JARVIS et al., 2013). Além disso, no extrato orgânico estão presentes outros compostos químicos desconhecidos que podem ter influenciado essa diferença.

**Figura 26** - a) Porcentagem de redução de MTT pelas células HepG2 após exposição a extratos de  $MP_{1,0}$  a  $1\text{ m}^3$  ar equivalente por mL por 24, 48 e 72 h. CCCP ( $10\ \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi usado como controle positivo (CP). (b) Intensidade da cauda dos nucleoides de HepG2 após exposição a extratos de  $MP_{1,0}$  a  $1\text{ m}^3$  ar equivalente por mL por 4 e 24 h, avaliada por ensaio cometa. Neste caso, MMS ( $0,13\ \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi usado como controle positivo (CP). Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão ( $n = 3$ ), com  $***p < 0,001$ ,  $**p < 0,01$  e  $*p < 0,05$ , quando comparados ao controle negativo de DMSO (CN)



Fonte: a própria autora.

A indução de quebras no DNA nas células HepG2 foi avaliada usando o ensaio do cometa. Os dois extratos correspondentes às amostras coletadas durante a estação seca causaram danos ao DNA 4 horas após a exposição, com um aumento significativo de ~3 vezes em relação ao controle negativo ( $p < 0,01-0,001$ ; Figura 26b).

Por outro lado, o extrato da estação úmida não causou um aumento significativo no dano ao DNA em comparação com o controle negativo. Corroborando com os resultados do ensaio MTT, a amostra coletada em 17 de setembro de 2020 teve um efeito 16% maior do que a coletada em 4 de agosto de 2020, apesar das concentrações mais baixas de  $\Sigma$ HPA e B[a]P<sub>eq</sub>, indicando a importância da interação entre os componentes presentes no MP.

Os extratos de MP da estação seca tiveram maiores contribuições da queima de biomassa, como evidenciado pelas maiores concentrações de levoglucosano, quando comparados ao extrato da estação úmida. Portanto, a maior genotoxicidade pode estar associada ao impacto da queima de biomassa como fonte de substâncias químicas perigosas no MP de Ribeirão Preto, como observado anteriormente nos efeitos dos extratos de MP da região amazônica em células pulmonares humanas (ALVES et al., 2015; GALVÃO et al., 2018).

Após 24 horas de exposição, tempo suficiente para o recrutamento de mecanismos de reparo celular, o dano no DNA detectado pelo ensaio do cometa nos extratos da estação seca permaneceu significativamente mais alto do que no controle negativo, alcançando um aumento de ~2,5 vezes ( $p < 0,05-0,01$ ; Figura 26b). Isso indica que esses extratos de MP induziram danos persistentes ao DNA e podem ter prejudicado o sistema de reparo das células. Estudos anteriores mostraram que a exposição ao MP pode induzir quebras nas fitas de DNA e desregular a expressão de proteínas de reparo em diferentes linhagens celulares humanas (QUEZADA-MALDONADO et al., 2021 e referências citadas). Defeitos nas vias de reparo de DNA podem causar instabilidade genômica, predispondo à mutagênese, especialmente se o dano for persistente e se acumular (HANAHAN; WEINBERG, 2011). No entanto, ainda há poucas informações disponíveis sobre o equilíbrio entre dano no DNA e capacidade de reparo, bem como as vias de reparo que podem ser mais afetadas pela exposição ao MP (QUEZADA-MALDONADO et al., 2021), sendo necessárias mais investigações sobre o dano genotóxico e as alterações nas vias de reparo do DNA causadas pelo MP.

---

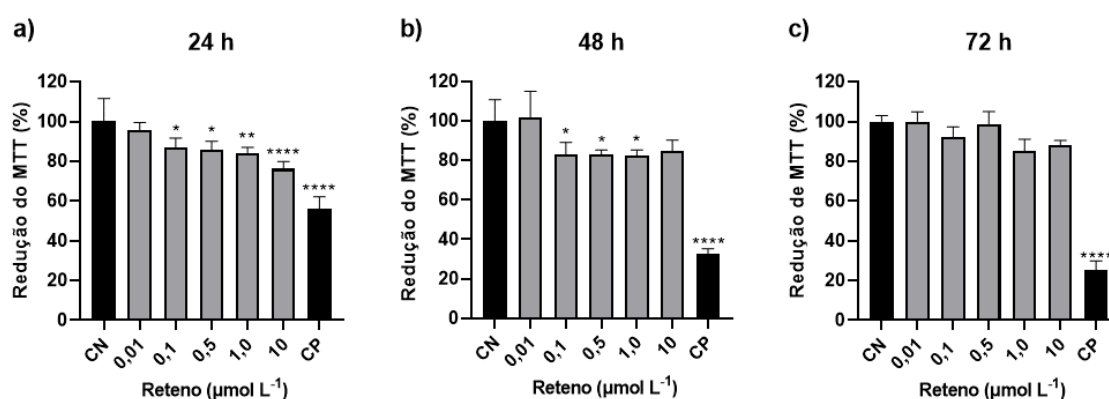
## 4.6 Toxicidade *in vitro* do reteno

O estudo da toxicidade do reteno é de particular importância, uma vez que este HPA pode estar presente em altas concentrações no MP emitido pela queima de biomassa e, apesar da sua abundância, poucos dados foram relatados até agora sobre o seu potencial risco para a saúde humana. Dessa forma, aspectos da toxicidade do reteno em células HepG2 foram avaliados. Essa linhagem celular apresenta maior capacidade metabólica do que as linhagens celulares anteriormente utilizadas por outros autores (ALVES et al., 2017; SARMA; BLAIS; CHAN, 2017; PEIXOTO et al., 2019).

### 4.6.1 Citotoxicidade

O ensaio do MTT foi utilizado para determinar a viabilidade das células HepG2 após exposição ao reteno. A viabilidade celular diminuiu de maneira concentração-dependente após 24 h de exposição, atingindo uma diminuição de 24% para a concentração de 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  ( $p < 0,0001$ ; Figura 27a).

**Figura 27** - Porcentagem da redução do MTT pelas células HepG2 após a exposição ao reteno em diferentes concentrações por (a) 24 h, (b) 48 h e (c) 72 h. CCCP (10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi usado como controle positivo (CP). Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão ( $n = 3$ ), com \*\*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ , quando comparados ao controle negativo de DMSO (CN)



Fonte: a própria autora.

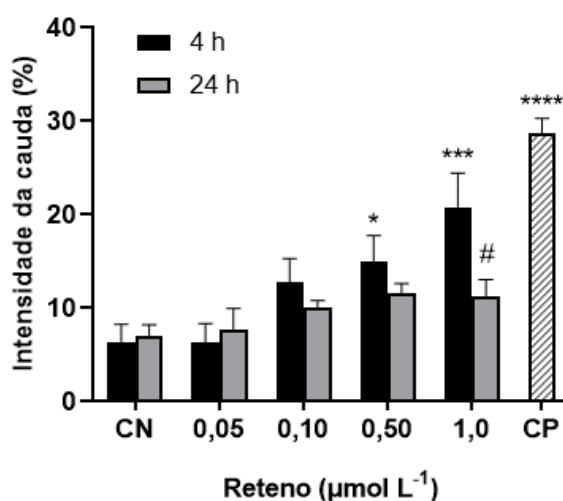
Após 48 h de exposição, uma clara dependência da concentração não foi mais observada (Figura 27b), e após 72 h a viabilidade não se alterou significativamente para nenhuma concentração testada em comparação com o controle negativo (Figura

27c). Embora a redução na viabilidade celular tenha sido significativa para algumas concentrações após 24 e 48 h, a faixa de viabilidade ficou entre 76-99% para todos os experimentos, o que indicou que o reteno não é citotóxico para HepG2 nas concentrações testadas e nos intervalos de tempo testados.

#### 4.6.2 Genotoxicidade

A indução de quebras na cadeia de DNA pelo reteno em células HepG2 foi avaliada utilizando o ensaio cometa. Danos no DNA concentração-dependentes foram observados 4 h após a exposição, com um aumento significativo de 2 a 3 vezes para as concentrações de 0,5 e 1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$  em comparação com o controle negativo ( $p < 0,05 - 0,001$ ; Figura 28), respectivamente. No entanto, o dano no DNA não foi persistente, pois as médias de intensidade da cauda diminuíram e não foram significativamente diferentes do controle negativo em quaisquer concentrações testadas após 24 h de exposição (Figura 28).

**Figura 28** - Intensidade da cauda dos nucleoides de HepG2 após a exposição ao reteno por 4 e 24 h determinada pelo ensaio cometa. MMS (0,13  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi usado como controle positivo (CP). Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão ( $n = 3$ ), com \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$  e \* $p < 0,05$ , quando comparados ao controle negativo de DMSO (CN). A média indicada com (#) foi significativamente diferente da mesma concentração após 4 h de exposição ( $\#p < 0,05$ )

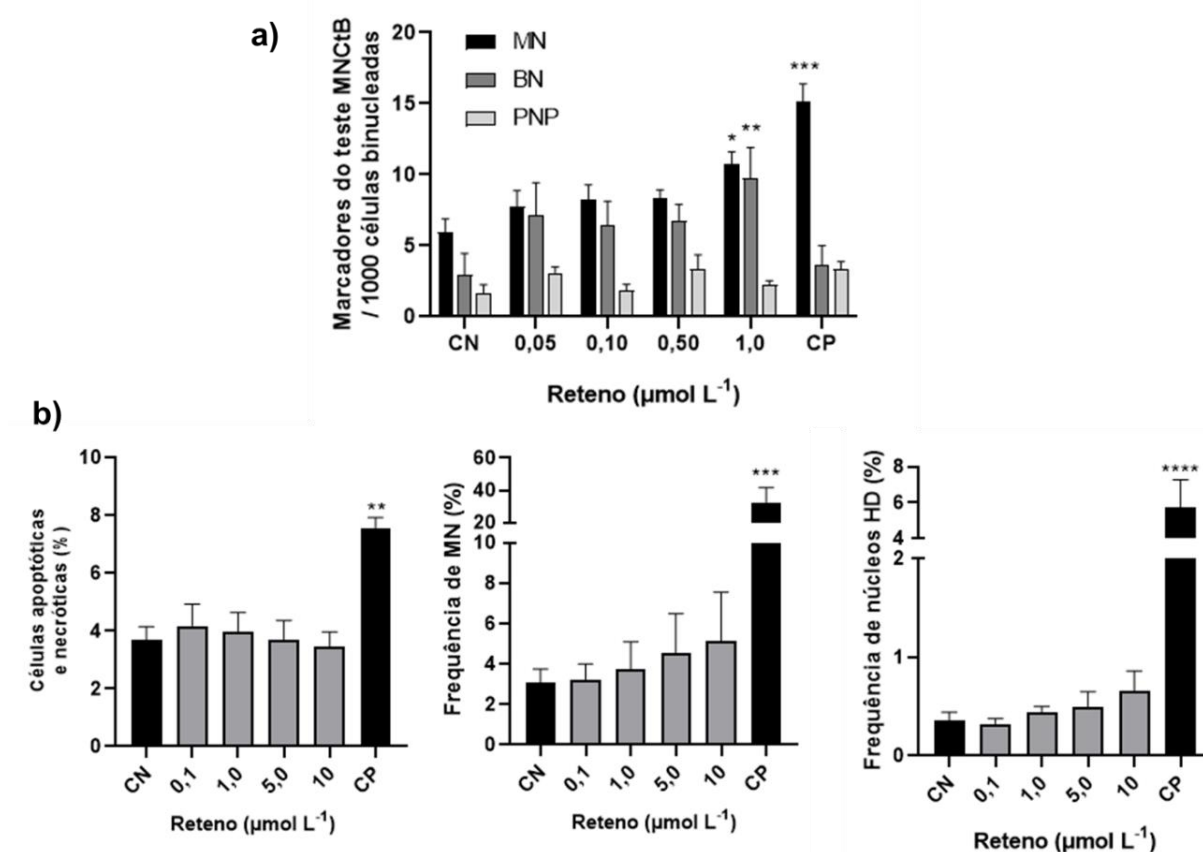


Fonte: a própria autora.

O impacto do reteno na integridade cromossômica das células HepG2 foi avaliado por dois métodos: pelo teste de micronúcleo com bloqueio da citocinese pela citocalasina B (MNCtB) e o teste de micronúcleo baseado em citometria de fluxo. No

método MNCTB, o reteno não induziu diferenças significativas no índice de divisão nuclear (IDN) ( $p > 0,05$ ), mas aumentou significativamente a frequência de micronúcleos (MN) e brotos nucleares (BN) na concentração mais alta em 1,8 e 3,3 vezes ( $p < 0,05-0,01$ ) em comparação com o controle negativo, respectivamente (Figura 29a). Não foram observados efeitos significativos na frequência de pontes nucleoplasmáticas (PNP).

**Figura 29** - a) Frequência de micronúcleos (MN), brotos nucleares (BN) e pontes nucleoplasmáticas (PNP) em células HepG2 expostas ao reteno por 48 h avaliadas pelo teste de micronúcleo com bloqueio da citocinese pela citocalasina B (MNCTB). MMS ( $0,13 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi utilizado como controle positivo (CP). (b) Frequência de células apoptóticas e necróticas, de MN e de núcleos hipodiploides (HD) em células HepG2 expostas ao reteno por 72 h avaliadas pelo teste de micronúcleo por citometria de fluxo. Etoposídeo ( $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi utilizado como controle positivo (CP). Os dados representam média  $\pm$  EP ( $n = 3$ ) com \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  em comparação com o controle negativo de DMSO (CN).



Fonte: a própria autora.

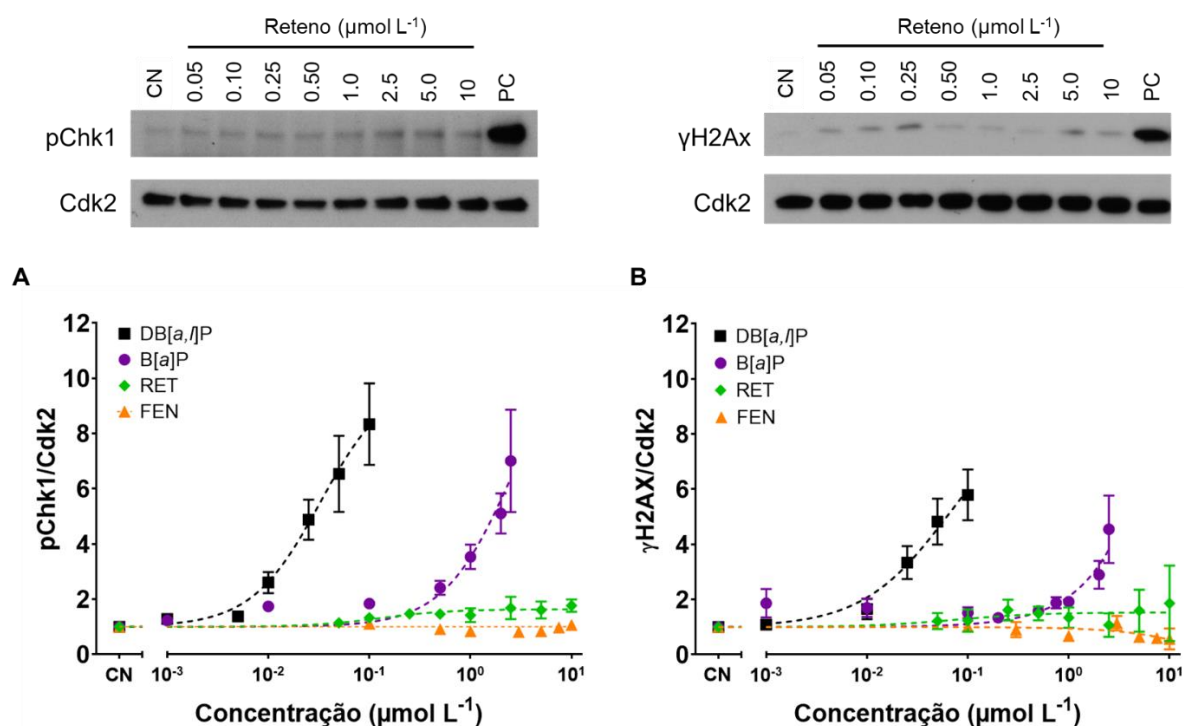
O teste de micronúcleo por citometria de fluxo permitiu a determinação de células apoptóticas e necróticas, além da quantificação da frequência de MN e de núcleos hipodiploides (HD). A exposição ao reteno não aumentou o número de células



apoptóticas e necróticas em comparação com o controle negativo (Figura 29b), corroborando com os resultados do ensaio MTT. Foi observado um aumento dependente da concentração de MN e núcleos HD, porém esse aumento não foi significativo em comparação ao controle negativo, devido à elevada variação dos dados (Figura 29b).

A formação de danos no DNA desencadeia o recrutamento de proteínas de sinalização e reparo de DNA. As células foram expostas a diversas concentrações de retene, até  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  por 48 h, e os níveis de Chk1 fosforilada em Ser317 (pChk1) e H2AX em Ser139 ( $\gamma$ H2AX) foram determinados por Western Blotting. O retene não induziu significativamente os níveis de pChk1 e  $\gamma$ H2AX em comparação com o controle negativo (Figura 30).

**Figura 30** - Curvas de concentração-resposta com base nos níveis de (A) pChk1 e (B)  $\gamma$ H2AX em células HepG2 expostas ao retene (RET) por 48 h. Os dados representam a média  $\pm$  erro padrão ( $n \geq 3$ ). Os dados para o dibenz[*a,h*]pireno (DB[*a,h*]P), benzo[*a*]pireno (B[*a*]P) e fenantreno (FEN) foram obtidos de Dreij et al. (2017) e Galvão et al. (2022). Blots representativos estão mostrados na parte superior. B[*a*]P  $3 \mu\text{mol/L}$  foi usado como controle positivo (CP). CN = controle negativo com DMSO. Cdk2 foi usado como controle.



Fonte: a própria autora.

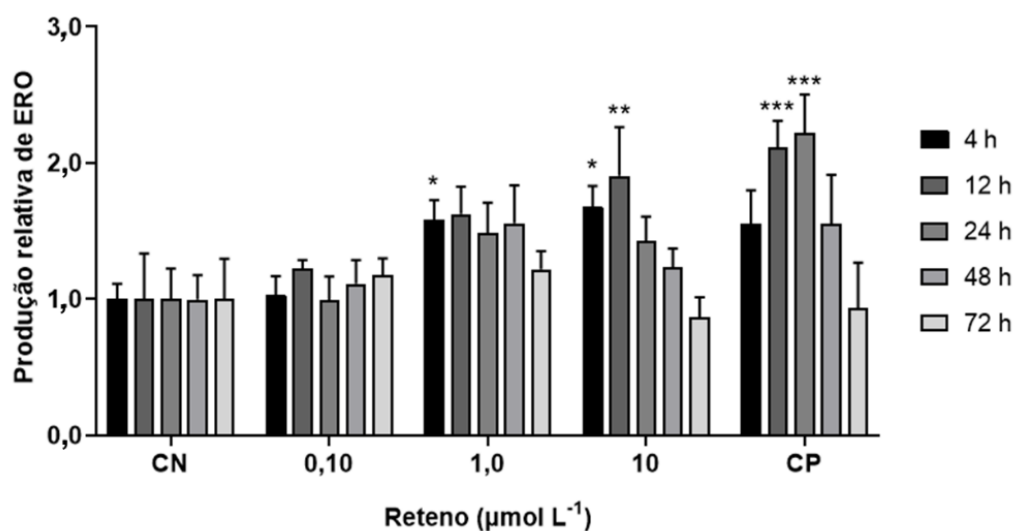
Ao comparar os resultados com dados anteriores para os HPA com alto potencial carcinogênico dibenzo[*a,h*]pireno (DB[*a,h*]P) e benzo[*a*]pireno (B[*a*]P) e o HPA não-carcinogênico fenantreno usando a mesma metodologia, observou-se que o efeito do reteno foi semelhante ao do fenantreno e menos potente do que o DB[*a,h*]P e o B[*a*]P (DREIJ et al., 2017; GALVÃO et al., 2022). Devido ao efeito do reteno nos níveis de pChk1 e  $\gamma$ H2AX ser inferior a duas vezes o controle negativo, os dados não foram apropriados para modelagem e não foi possível calcular um fator de potência relativa (RPF) para o reteno. O baixo potencial do reteno está de acordo com um estudo recente em que o fator de potência relativa foi estimado em 0,004 por um modelo computacional de relação estrutura e atividade (QSAR) (GBEDDY et al., 2020), valor próximo ao do fenantreno e pireno (0,001) (NISBET; LAGOY, 1992).

#### **4.6.3 Produção de espécies reativas de oxigênio**

Danos no DNA podem ser induzidos como resultado de um ataque por espécies reativas de oxigênio (ERO) formadas durante o metabolismo de xenobióticos. Portanto, a geração de ERO intracelular pelo reteno foi avaliada utilizando o ensaio MitoSOX. A concentração mais baixa de reteno ( $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) não induziu significativamente a produção de ERO em nenhum dos intervalos de tempo estudados (Figura 31). Para as concentrações mais elevadas, foi observada uma clara dependência da produção de ERO com o tempo de exposição, sendo que a maior indução ocorreu em intervalos de tempo precoces (4 e 12 h), atingindo até 1,9 vezes após 12 h para a concentração de  $10 \mu\text{mol L}^{-1}$  ( $p < 0,01$ ), e depois diminuindo em intervalos de tempo superiores (Figura 31).

---

**Figura 31** - Produção relativa de espécies reativas de oxigênio (ERO) avaliada utilizando o ensaio MitoSOX em células HepG2 expostas ao reteno em diferentes concentrações por 4, 12, 24, 48 e 72 h. B[a]P (1,5  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi utilizado como controle positivo (CP). Os dados representam média  $\pm$  EP ( $n \geq 3$ ) com \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  em comparação com o controle negativo de DMSO (CN).



Fonte: a própria autora.

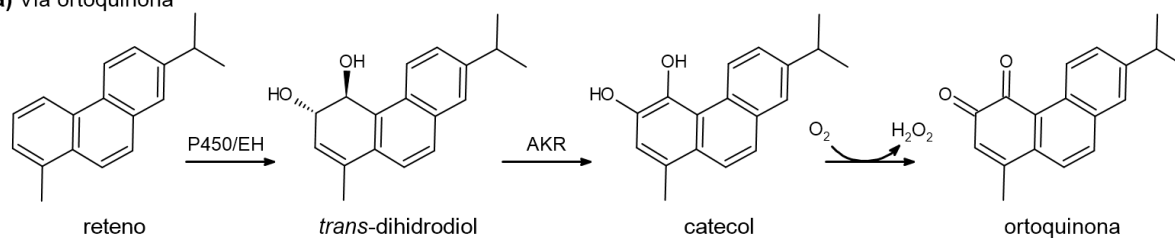
Esses resultados diferem do que foi observado em estudos utilizando células pulmonares A549, nos quais o reteno reduziu a viabilidade celular somente após 72 h de exposição, aumentou as quebras da cadeia de DNA após 24 h e induziu a produção de ERO após 24 e 72 h (ALVES et al., 2017; PEIXOTO et al., 2019). Nestes estudos com células pulmonares, a maior concentração utilizada foi de 30  $\text{ng mL}^{-1}$ , que corresponde à concentração de 0,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  utilizada neste trabalho. A maioria dos efeitos observados aqui foram mais evidentes em concentrações mais elevadas, isto é, de 1,0 e 10  $\mu\text{mol/L}$ . Essas observações sugerem que as células A549 são mais sensíveis à exposição ao reteno do que as células HepG2. Além disso, as concentrações de 0,05 e 0,1  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de reteno aumentaram a frequência de MN em 1,7 e 2,2 vezes nas células A549, respectivamente (PEIXOTO et al., 2019), enquanto nas células HepG2 foi observado um aumento de 1,8 vezes apenas para a concentração de 1,0  $\mu\text{mol L}^{-1}$ .

Os efeitos precoces observados nas células hepáticas quando comparados às células pulmonares podem estar relacionados à rápida metabolização do reteno pelas células HepG2 (HUANG et al., 2017). Este pode não ser o caso das células pulmonares A549, que têm uma capacidade metabólica comparativamente menor que as células HepG2, exibindo uma atividade limitada do citocromo P450 (CYP)

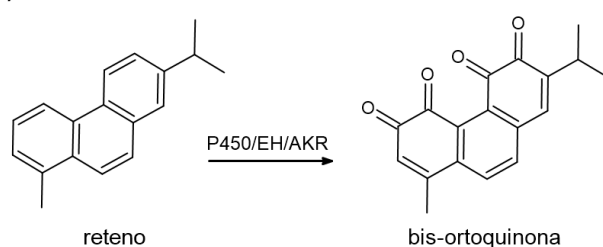
(GARCIA-CANTON et al., 2013). A principal via de ativação metabólica do reteno nas células HepG2 envolve a formação de ortoquinonas (HUANG et al., 2017). As enzimas da fase I e da fase II envolvidas nesta via ainda não foram totalmente identificadas, mas foi levantada a hipótese por Huang et al. (2017) de que as enzimas CYP1A1 e epóxido hidrolase (EH) são responsáveis pela formação de *trans*-dihidrodióis nos anéis terminais de reteno em células HepG2 (Figura 32a). Os *trans*-dihidrodióis podem ainda ser convertidos em catecóis por aldo-ceto redutases (AKR), como a AKR1C1, AKR1C2 e AKR1C3, também presentes em células HepG2. Os catecóis se auto-oxidam em ortoquinonas, desencadeando o ciclo redox e a formação de ERO intracelular (SHULTZ et al., 2011), o que provavelmente contribui para a genotoxicidade.

**Figura 32** - Esquema das vias de metabolização do reteno propostas por Huang et al. (2012)

a) Via ortoquinona



b) Via bis-eletrófilo



Fonte: Figura elaborada com o programa ChemSketch pela própria autora, baseado em Huang et al. (2012).

Evidências de ativação metabólica em ambos os anéis terminais para formar bis-ortoquinonas também foram relatadas, embora em menor extensão do que as mono-ortoquinonas (Figura 32b; HUANG et al., 2017). Esses bis-eletrófilos têm o potencial para realizar ligações cruzadas (*crosslinks*) entre o DNA e proteínas, representando um potencial mecanismo adicional para a genotoxicidade do reteno.

As células A549 exibem um nível mais baixo de indução da expressão do CYP1A1 em resposta aos HPA em comparação com as células HepG2 (GENIES et al., 2013). Portanto, uma formação mais eficiente de *trans*-dihidrodióis de reteno nas

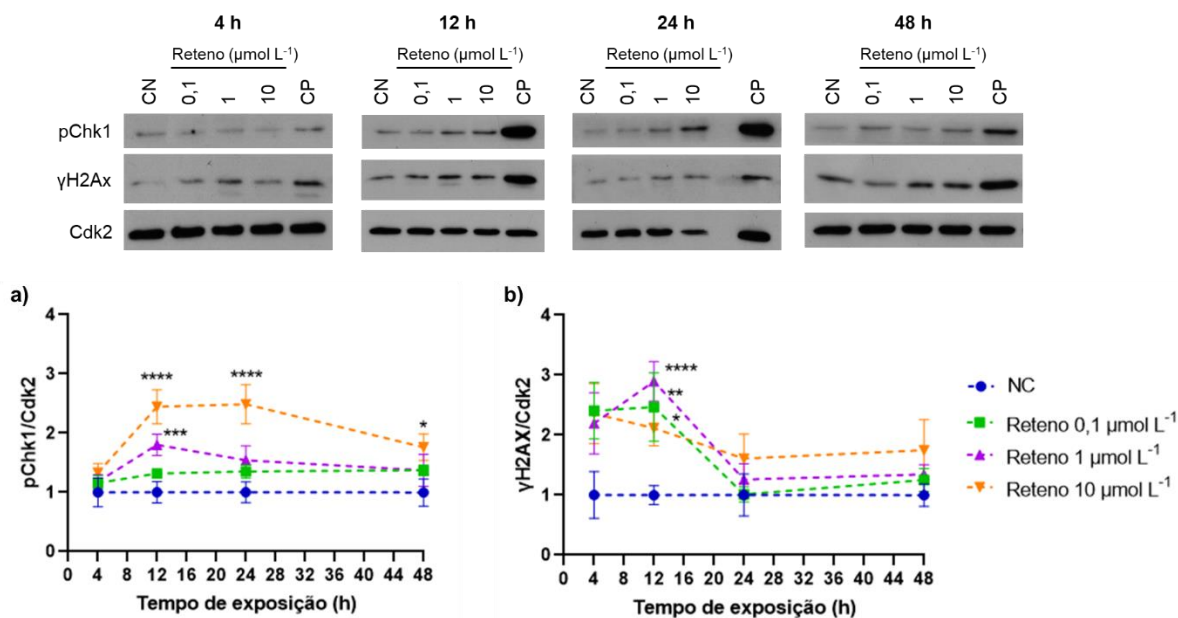
células hepáticas pode acontecer. No entanto, as células A549 induzem níveis mais elevados de AKR, particularmente AKRC1, do que as células HepG2 em resposta aos HPA (PALACKAL et al., 2002; GENIES et al., 2013), favorecendo a conversão de *trans*-dihidrodióis em ortoquinonas. Assim, o metabolismo CYP do reteno nas células HepG2 pode ser mais rápido, mas a formação de quinonas pode ser mais eficiente nas células A549, explicando a maior sensibilidade desta última linhagem celular ao estresse oxidativo causado pelo reteno. Já foi relatado que as células A549 são mais sensíveis do que as células HepG2 ao estresse oxidativo causado por outros tipos de compostos, como toxinas vegetais e retardantes de chama organofosforados (AN et al., 2016; SAXENA; PHATAK; CHAUHAN, 2022).

Além disso, as células HepG2 expressam níveis mais elevados de enzimas de fase II do que as células A549 em resposta ao B[a]P, incluindo a glutathione transferase GSTP1 e a UDP-glucuronosiltransferase UGT1A6 (GENIES et al., 2013; SHI et al., 2016). Isto sugere que o metabolismo de fase II das células HepG2 poderia eliminar os metabólitos do reteno de forma mais eficiente do que as células A549, justificando assim o efeito rápido, porém aparentemente transitório do reteno nas células hepáticas.

A sinalização da resposta ao dano no DNA causado pelo reteno foi avaliada a partir de duas proteínas: a *checkpoint* quinase 1 (Chk1) e a histona variante H2AX. Foi observado que o nível da Chk1 ativada (pChk1) nas células HepG2 aumentou após 12 e 24 h de exposição ao reteno nas concentrações de 1 e 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$ , e diminuiu após 48 h, sugerindo que o dano ao DNA foi reparado (Figura 33a). Já o nível da histona H2AX ativada ( $\gamma\text{H2AX}$ ) aumentou logo nas primeiras 4 h horas de exposição, atingindo o pico após 12 h, e em contraste com pChk1, uma diminuição já foi observada após 24 h de exposição (Figura 33b).

---

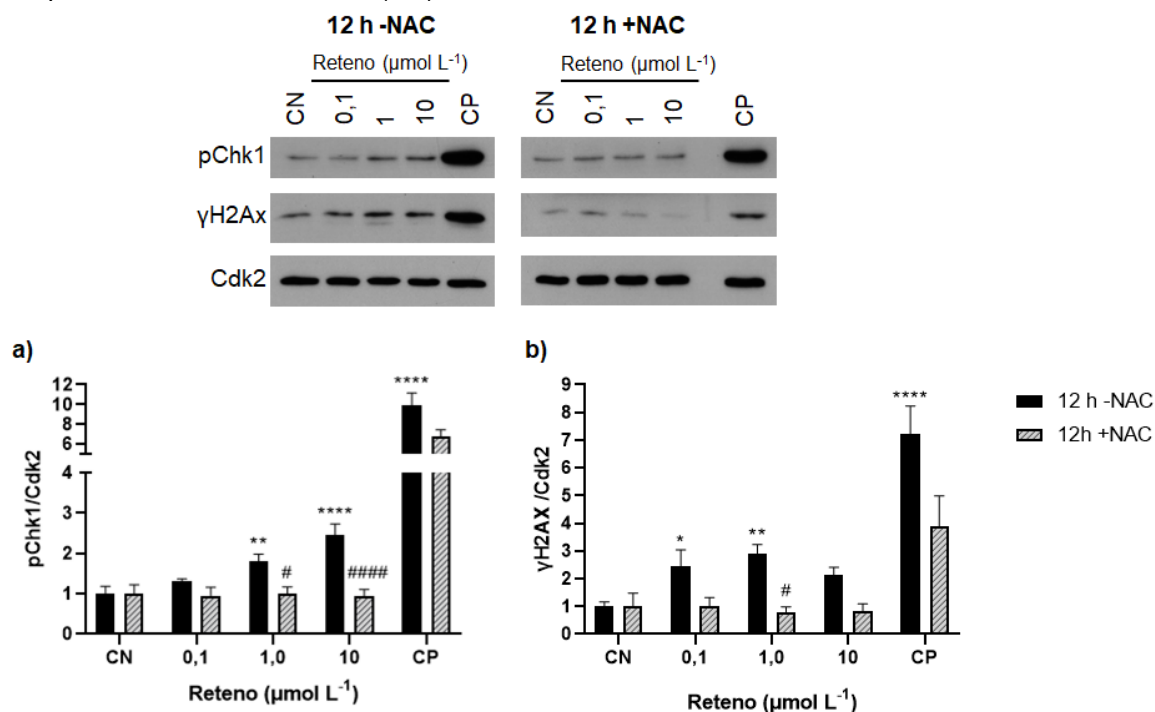
**Figura 33** - Níveis de (a) pChk1 e  $\gamma$ H2AX nas células HepG2 após exposição ao reteno em diferentes concentrações e intervalos de tempo. B[a]P ( $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi usado como controle positivo (CP). Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão ( $n = 3$ ), com  $***p < 0,001$ ,  $**p < 0,01$  e  $*p < 0,05$ , quando comparados ao controle negativo de DMSO (CN)



Fonte: a própria autora.

Os níveis dessas proteínas foram avaliados novamente após 12 h de exposição, mas com a presença do antioxidante NAC no meio celular (Figura 34), uma vez que esse foi o tempo de exposição com o máximo de resposta para as proteínas de sinalização de dano no DNA e para a produção de ERO. Foi observado que o pré-tratamento com NAC reduziu significativamente os níveis de pChk1 e  $\gamma$ H2AX, indicando que o estresse oxidativo gerado pela presença de ERO é um mecanismo importante do dano no DNA causado pelo reteno em células HepG2.

**Figura 34** - Níveis de (a) pChk1 e  $\gamma$ H2AX nas células HepG2 após exposição ao reteno em diferentes concentrações e intervalos de tempo na ausência e na presença de NAC (-NAC e +NAC, respectivamente). B[a]P ( $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ ) foi usado como controle positivo (CP). Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão ( $n = 3$ ), com  $***p < 0,001$ ,  $**p < 0,01$  e  $*p < 0,05$ , quando comparados ao DMSO controle (CN)



Fonte: a própria autora.

Quando as células HepG2 foram expostas ao reteno por intervalos de tempo diferentes, os níveis de pChk1 e  $\gamma$ H2AX aumentaram até 24 h de exposição ao reteno seguido por uma diminuição, indicando o processo de ativação e conclusão da resposta e reparo do dano no DNA. A resposta de  $\gamma$ H2AX foi mais rápida que a de pChk1, começando após 4 h, o que foi consistente com o ensaio cometa e os resultados do mitoSOX. A fosforilação de H2AX é um evento precoce na resposta celular às quebras da fita dupla do DNA (FERNANDEZ-CAPETILLO et al., 2004). A formação de ERO induzida pela ativação do reteno em ortoquinonas pode causar quebras de fita dupla do DNA (PENNING, 2017), desencadeando uma resposta precoce e aguda. Isto também foi confirmado pela redução observada dos níveis de  $\gamma$ H2AX na presença do antioxidante NAC.

Em contraste com  $\gamma$ H2AX, a pChk1 apresentou uma resposta tardia ao reteno, começando após 12 h e diminuindo após 48 h para um nível que ainda era significativamente superior ao controle negativo, o que indicou um nível de ativação mais persistente. Chk1 é uma quinase que é predominantemente ativada através da fosforilação pela quinase apical ATR em resposta ao estresse gerado por forquilhas

de replicação de DNA paralisadas (GAILLARD; GARCÍA-MUSE; AGUILERA, 2015). Além das lesões de DNA induzidas por ERO, as ortoquinonas provenientes dos HPA também podem se ligar covalentemente ao DNA, resultando em adutos volumosos (PENNING, 2017). Portanto, é provável que a formação de adutos estáveis derivados dos metabólitos do reteno também possa causar estresse de replicação e indução de pChk1. Além disso, os metabólitos bis-ortoquinona do reteno poderiam formar ligações cruzadas de proteínas e DNA que representariam um impedimento para as forquilhas de replicação. No entanto, não se sabe até que ponto e que tipo de interações covalentes ocorrem entre os metabólitos do reteno e o DNA (HUANG et al., 2017). Uma resposta defeituosa ao estresse de replicação pode levar à instabilidade genômica, que pode ser observada como ganho ou perda cromossômica (GAILLARD; GARCÍA-MUSE; AGUILERA, 2015), o que está de acordo com o aumento observado na formação de micronúcleos após a exposição ao reteno.

Resultados contrastantes de mutagenicidade entre *S. Typhimurium* e modelos de células de mamíferos foram relatados anteriormente para HPA e outros compostos orgânicos (KIRKLAND et al., 2007; FOWLER et al., 2018; DA SILVA JUNIOR et al., 2021), que podem estar associados a diferenças no tipos de mutações detectadas e no metabolismo dos modelos. A mistura S9 de fígado de rato geralmente usada no teste de Ames contém níveis mais elevados de enzimas CYP1A e 2B em comparação a outras formas CYP, e as enzimas da fase II são principalmente inativas na mistura S9, pois seus cofatores não são adicionados (KIRKLAND et al., 2007). Portanto, a partir dos resultados aqui apresentados sugere-se que a ativação metabólica do reteno em células HepG2 gera metabólitos que produzem ERO e causam estresse replicativo, processos que causam danos ao DNA e instabilidade genômica, indicando um potencial risco à saúde humana.

---



## **5 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Esta tese teve como principal objetivo investigar o impacto da queima de biomassa na emissão de alguns compostos policíclicos aromáticos (HPA) e na toxicidade *in vitro* do material particulado (MP) atmosférico coletado em Ribeirão Preto, município que faz parte de uma região metropolitana com 1,74 milhão de habitantes, localizado em uma região canavieira do estado de São Paulo.

Neste trabalho, observou-se a necessidade de um método de extração que tornasse possível a extração simultânea de HPA, oxi-HPA, nitro-HPA e dos anidroaçúcares marcadores de queima de biomassa a partir de amostras coletadas com um amostrador de pequeno volume, isto é, com pouca massa de MP disponível para a extração. Além disso, buscava-se um método que utilizasse uma quantidade mínima de solventes orgânicos.

O método de extração foi então otimizado utilizando planejamento fatorial de experimentos, e posteriormente validado para a aplicação nas amostras ambientais. O novo método permitiu uma economia de até 97% no volume de solvente, sem a necessidade do uso de diclorometano, um produto químico potencialmente perigoso para saúde humana e ao meio ambiente. O método apresentou boa exatidão e precisão, com baixos limites de quantificação, sendo uma excelente alternativa para análise de amostras de MP coletadas tanto por amostradores de grande volume como de pequeno volume.

Com um método satisfatório otimizado e validado, amostras de MP fracionado coletadas em dois locais de Ribeirão Preto foram analisadas. Os resultados mostraram que a queima de biomassa é uma importante fonte de compostos potencialmente mutagênicos e carcinogênicos para a atmosfera da cidade. No estado de São Paulo, apesar das políticas públicas de redução da queima da palha da cana-de-açúcar antes da colheita manual, os incêndios agrícolas e florestais ainda acontecem, principalmente durante a estação seca, quando as condições climáticas criam um ambiente favorável para sua ocorrência. A queima de biomassa representou 65% das fontes de compostos policíclicos aromáticos, seguida pela combustão de diesel (11%). A queima de biomassa foi importante em ambos sítios de amostragem (urbano e semiurbano) para a emissão de HPA e oxi-HPA no MP, enquanto veículos movidos a diesel foram mais relevantes para a emissão dos nitro-HPA.

As concentrações de HPA e o risco de câncer estimado a partir da concentração de B[a]P encontrados neste trabalho foram próximos àqueles relatados para o MP coletado no arco de desmatamento da Amazônia brasileira, apesar da

---

disparidade entre as áreas queimadas. A atividade carcinogênica das amostras de MP de Ribeirão Preto, avaliada como concentração de B[a]P<sub>eq</sub>, foi 4 vezes maior na estação seca do que na estação úmida, e foi aumentada cerca de 23 vezes após um incêndio local. Daí a necessidade de aprofundar o estudo toxicológico, ainda insipiente na região. As células de fígado humana HepG2 foram selecionadas para os estudos pois contêm muitas das enzimas funcionais envolvidas no metabolismo de várias substâncias químicas tóxicas, incluindo dos HPA. Apenas as amostras de MP coletadas na estação seca foram citotóxicas para as células HepG2 após 72 h de exposição e causaram danos ao DNA das células após intervalos de exposição de 4 e 24 h. Apesar do tempo de 24 h ser suficiente para o recrutamento do sistema de reparo do DNA, o dano no DNA detectado pelo ensaio do cometa permaneceu significativo, indicando um efeito genotóxico persistente. Como perspectiva, sugere-se o estudo mais aprofundado a nível molecular, sobre o tipo de dano genotóxico e as alterações nas vias de reparo do DNA que são causadas pelo MP, para assim melhor compreender os mecanismos envolvidos.

As elevadas concentrações do reteno em áreas de queimadas relatadas na literatura motivaram o aprofundamento do entendimento sobre a toxicidade deste composto, que é ainda pouco estudado e não faz parte dos HPA priorizados pela agência ambiental dos Estados Unidos. Nossos resultados demonstraram a geração de espécies reativas e o estresse replicativo como importantes mecanismos de genotoxicidade do reteno. Essas descobertas enfatizam a importância de pesquisas contínuas sobre a toxicidade do reteno, uma vez que ele pode contribuir para os efeitos nocivos do MP na saúde humana.

A atividade carcinogênica aumentada durante a estação seca e após eventos de incêndio local juntamente com os resultados dos testes de citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro* destacam a necessidade urgente de medidas para prevenir e mitigar eventos de queima, especialmente no contexto do aumento de incêndios florestais impulsionado pelas mudanças climáticas globais. Dessa forma, políticas públicas são necessárias, desde o nível local, focando em maior arborização da cidade, conscientização da população e fiscalização, até o nível nacional e internacional, buscando minimizar as emissões de gases de efeito estufa e assim desacelerando o aquecimento global.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

---

- 
- ABBAFATI, C. et al. Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. **The Lancet**, v. 396, n. 10258, p. 1223–1249, 2020.
- ABBAS, I. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives in airborne particulate matter: sources, analysis and toxicity. **Environmental Chemistry Letters**, v. 16, n. 2, p. 439–475, jun. 2018.
- AGUDELO-CASTAÑEDA, D. M.; TEIXEIRA, E. C. Seasonal changes, identification and source apportionment of PAH in PM<sub>1.0</sub>. **Atmospheric Environment**, v. 96, p. 186–200, 2014.
- ALVES, C. Aerossóis atmosféricos: Perspectiva histórica, fontes, processos químicos de formação e composição orgânica. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 859–870, 2005.
- ALVES, C. A. et al. Emission of trace gases and organic components in smoke particles from a wildfire in a mixed-evergreen forest in Portugal. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 8, p. 1466–1475, 2011.
- ALVES, C. A. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their derivatives (oxygenated-PAHs, nitrated-PAHs and azaarenes) in size-fractionated particles emitted in an urban road tunnel. **Atmospheric Research**, v. 180, p. 128–137, 2016.
- ALVES, C. A. et al. Gaseous and speciated particulate emissions from the open burning of wastes from tree pruning. **Atmospheric Research**, v. 226, n. March, p. 110–121, 2019.
- ALVES, N. de O. et al. Biomass burning in the Amazon region: Aerosol source apportionment and associated health risk assessment. **Atmospheric Environment**, v. 120, p. 277–285, 2015.
- ALVES, N. de O. et al. Biomass burning in the Amazon region causes DNA damage and cell death in human lung cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.
- AMBADE, B. et al. Emission reduction of black carbon and polycyclic aromatic hydrocarbons during COVID-19 pandemic lockdown. **Air Quality, Atmosphere and Health**, v. 14, n. 7, p. 1081–1095, 2021.
- AN, J. et al. The cytotoxicity of organophosphate flame retardants on HepG2, A549 and Caco-2 cells. **Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering**, v. 51, n. 11, p. 980–988, 2016.
- ANDERSSON, J. T.; ACHTEN, C. Time to Say Goodbye to the 16 EPA PAHs? Toward an Up-to-Date Use of PACs for Environmental Purposes. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v. 35, n. 2–4, p. 330–354, 2015.
- AOAC INTERNATIONAL. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. **AOAC Official Methods of Analysis**, p. 9, 2016.
- AQUILINA, N. J.; HARRISON, R. M. Evaluation of the cancer risk from PAHs by inhalation: are current methods fit for purpose? **Environment International**, v. 177, p. 107991, 2023.
- ARBEX, M. A. et al. Impact of outdoor biomass air pollution on hypertension hospital admissions. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 64, n. 7, p. 573–579, 2010.
- ARBEX, M. A. et al. The effect of air pollution on pneumonia-related emergency department visits in a region of extensive sugar cane plantations: A 30-month time-series study. **Journal of Epidemiology and Community Health**, v. 68, n. 7, p. 669–674, 2014.
-

- 
- AREY, J. et al. Nitroarene products from the gas-phase reactions of volatile polycyclic aromatic hydrocarbons with the OH radical and N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. **International Journal of Chemical Kinetics**, v. 21, n. 9, p. 775–799, 1989.
- AUDEBERT, M. et al. Comparative potency approach based on H2AX assay for estimating the genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 260, n. 1, p. 58–64, 2012.
- AVLASEVICH, S. L. et al. In Vitro Micronucleus Scoring by Flow Cytometry: Differential Staining of Micronuclei Versus Apoptotic and Necrotic Chromatin Enhances Assay Reliability. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 66, n. June 2005, p. 56–66, 2006.
- BAMFORD, H. A.; BAKER, J. E. Nitro-polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations and sources in urban and suburban atmospheres of the Mid-Atlantic region. **Atmospheric Environment**, v. 37, n. 15, p. 2077–2091, 2003.
- BANDOWE, B. A. M.; MEUSEL, H. Nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons (nitro-PAHs) in the environment – A review. **Science of the Total Environment**, v. 581–582, p. 237–257, 2017.
- BARRÓN CUENCA, J. et al. In vitro cytotoxicity and genotoxicity of single and combined pesticides used by Bolivian farmers. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 63, n. 1, p. 4–17, 2022.
- BELOCONI, A.; VOUNATSOU, P. Revised EU and WHO air quality thresholds : Where does Europe stand ? **Atmospheric Environment**, v. 314, n. September, p. 120110, 2023.
- BERANEK, D. T. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with monofunctional alkylating agents. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 231, n. 1, p. 11–30, 1990.
- BERNARDES, M. F. F. **Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade dos herbicidas tebutiuram e trifluralina e de seus efeitos na expressão de genes de resposta ao estresse celular**. 2016. Tese (doutorado). Universidade de São Paulo, 2016.
- BRASIL. Resolução CONAMA Nº 491, de 19 de novembro de 2018. **Dispõe sobre padrões de qualidade do ar**. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 21 nov. 2018. Seção 1, p. 155.
- BRYCE, S. M. et al. In vitro micronucleus assay scored by flow cytometry provides a comprehensive evaluation of cytogenetic damage and cytotoxicity. **Mutation Research**, v. 630, n. 1–2, p. 78–91, 2007.
- BURMA, S. et al. ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 45, p. 42462–42467, 2001.
- CANÇADO, J. E. D. et al. The impact of sugar cane-burning emissions on the respiratory system of children and the elderly. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 5, p. 725–729, 2006.
- CARVALHO, J. et al. What Can We Learn about Improvements in Air Quality During the COVID-19 Pandemic? A Case Study in Four Cities Located in the Same State but with Different Emission Profiles. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 35, n. 2, e-20230110, p. 1–14, 2023a.
- CARVALHO, J. S. et al. Source apportionment and health impact assessment of atmospheric particulate matter in the city of São Carlos, Brazil. **Chemosphere**, p. 138450, 2023b.
-

- 
- CAUMO, S. et al. Particulate matter-bound organic compounds: levels, mutagenicity, and health risks. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 21, p. 31293–31310, 2022.
- CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Frota Regiões do Estado**. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/veicular/wp-content/uploads/sites/6/2023/09/Frota-Circulante-Estado-de-Sao-Paulo-2022.xlsx>>. Acesso em 20 out. 2023.
- CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Relatório de Qualidade do Ar no Estado de São Paulo-2020**. Disponível em: <<http://cetesb.sp.gov.br/ar/publicacoes-relatorios/>>. Acesso em 20 out. 2023.
- CHERUYIOT, N. K. et al. An overview: Polycyclic aromatic hydrocarbon emissions from the stationary and mobile sources and in the ambient air. **Aerosol and Air Quality Research**, v. 15, n. 7, p. 2730–2762, 2015.
- CIAGRO - Centro Integrado De Informações Agrometeorológicas. **Rede meteorológica automática - Dados horários**. Disponível em: <<http://www.ciiagro.org.br/ema/>>. Acesso em: 15 mar. 2023.
- CLERGÉ, A. et al. Oxy-PAHs: occurrence in the environment and potential genotoxic/mutagenic risk assessment for human health. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 49, n. 4, p. 302–328, 2019.
- CLIMATE-DATA.ORG. **Historical average temperature**. Disponível em: <<https://en.climate-data.org/>>. Acesso em: 7 fev. 2023.
- COBELO, I. et al. The impact of wildfires on air pollution and health across land use categories in Brazil over a 16-year period. **Environmental Research**, v. 224, n. December 2022, p. 115522, 2023.
- COELHO, C. H. et al. Wet deposition of major ions in a rural area impacted by biomass burning emissions. **Atmospheric Environment**, v. 45, n. 30, p. 5260–5265, 2011.
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, 2022/2023, 2o levantamento**. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>>. Acesso em: 20 out. 2023.
- CONNERY, A. H. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons. **Cancer Research**, v. 42, p. 4875–4917, 1982.
- DA SILVA JUNIOR, F. C. et al. A look beyond the priority: A systematic review of the genotoxic, mutagenic, and carcinogenic endpoints of non-priority PAHs. **Environmental Pollution**, v. 278, 2021.
- DAI, Y.; GRANT, S. New Insights into Checkpoint Kinase 1 (Chk1) in the DNA Damage Response (DDR) Signaling Network: Rationale for Employing Chk1 Inhibitors in Cancer Therapeutics. **Clinical cancer research**, v. 16, n. 2, p. 376–383, 2011.
- DREIJ, K. et al. Cancer Risk Assessment of Airborne PAHs Based on in Vitro Mixture Potency Factors. **Environmental Science and Technology**, v. 51, n. 15, p. 8805–8814, 2017.
- FENECH, M. The in vitro micronucleus test. **Mutation Research**, v. 455, p. 81–95, 2000.
- FENG, S. et al. The health effects of ambient PM<sub>2.5</sub> and potential mechanisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 128, p. 67–74, 2016.
- FERNANDEZ-CAPETILLO, O. et al. H2AX: The histone guardian of the genome. **DNA Repair**, v. 3, n. 8–9, p. 959–967, 2004.
-

- 
- FERREIRA, R. S. et al. Multivariate optimization of extraction variables of PAH in particulate matter (PM<sub>10</sub>) in Indoor/outdoor air at campos dos goytacazes, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 32, n. 3, p. 618–625, 2021.
- FINLAYSON-PITTS, B. J.; PITTS JR, J. N. **Chemistry of the upper and lower atmosphere: theory, experiments, and applications**. Academic Press, New York, 1999.
- FOWLER, P. et al. A review of the genotoxic potential of 1,4-naphthoquinone. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 834, n. June, p. 6–17, 2018.
- FRANCO, A. et al. Occurrence of polycyclic aromatic hydrocarbons derivatives and mutagenicity study in extracts of PM<sub>10</sub> collected in São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 23, n. 1–2, p. 1–10, 2010.
- FRESHNEY, R. I. **Culture of Animal Cells - A Manual of Basic Technique and Specialized Applications**. 6th ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2010.
- FUZZI, S. et al. Particulate matter, air quality and climate: Lessons learned and future needs. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 15, n. 14, p. 8217–8299, 2015.
- GAILLARD, H.; GARCÍA-MUSE, T.; AGUILERA, A. Replication stress and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 5, p. 276–280, 2015.
- GALVÃO, E. S.; DE CASSIA FERONI, R.; D'AZEREDO ORLANDO, M. T. A review of the main strategies used in the interpretation of similar chemical profiles yielded by receptor models in the source apportionment of particulate matter. **Chemosphere**, v. 269, p. 128746, 2021.
- GALVÃO, M. F. de O. et al. Biomass burning particles in the Brazilian Amazon region: Mutagenic effects of nitro and oxy-PAHs and assessment of health risks. **Environmental Pollution**, v. 233, p. 960–970, 2018.
- GALVÃO, M. F. de O. et al. Determination of whole mixture-based potency factors for cancer risk assessment of complex environmental mixtures by in vitro testing of standard reference materials. **Environment International**, v. 166, n. April, 2022.
- GARCIA-CANTON, C. et al. Metabolic characterization of cell systems used in in vitro toxicology testing: Lung cell system BEAS-2B as a working example. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 6, p. 1719–1727, 2013.
- GBEDDY, G. et al. Application of quantitative structure-activity relationship (QSAR) model in comprehensive human health risk assessment of PAHs, and alkyl-, nitro-, carbonyl-, and hydroxyl-PAHs laden in urban road dust. **Journal of Hazardous Materials**, v. 383, p. 121154, 2020.
- GENIES, C. et al. The extreme variety of genotoxic response to benzo[a]pyrene in three different human cell lines from three different organs. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–11, 2013.
- GIANINI, M. F. D. et al. Source apportionment of PM<sub>10</sub>, organic carbon and elemental carbon at Swiss sites: An intercomparison of different approaches. **Science of the Total Environment**, v. 454–455, p. 99–108, 2013.
- GODOY-SILVA, D.; NOGUEIRA, R. F. P.; CAMPOS, M. L. A. M. A 13-year study of dissolved organic carbon in rainwater of an agro-industrial region of São Paulo State (Brazil) heavily impacted by biomass burning. **Science of the Total Environment**, v. 609, p. 476–483, 2017.
-



- GOEDTKE, L. et al. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Activate the Aryl Hydrocarbon Receptor and the Constitutive Androstane Receptor to Regulate Xenobiotic Metabolism in Human Liver Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, 372, 2021.
- GONÇALVES, C. et al. Organic compounds in PM<sub>2.5</sub> emitted from fireplace and woodstove combustion of typical Portuguese wood species. **Atmospheric Environment**, v. 45, p. 4533-4545, 2011.
- GONÇALVES, C. et al. Size-segregated aerosol chemical composition from an agro-industrial region of São Paulo state, Brazil. **Air Quality, Atmosphere and Health**, v. 10, n. 4, p. 483–496, 2017.
- GUO, H. et al. Particle-associated polycyclic aromatic hydrocarbons in urban air of Hong Kong. **Atmospheric Environment**, v. 37, n. 38, p. 5307–5317, 2003.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
- HARRISON, R. M.; YIN, J. Particulate matter in the atmosphere: which particle properties are important for its effects on health? **Science of the Total Environment**, v. 249, p. 85–101, 2000.
- HEAL, M. R.; KUMAR, P.; HARRISON, R. M. Particles, air quality, policy and health. **Chemical Society Reviews**, v. 41, p. 6606–6630, 2012.
- HEYDER, J. Deposition of inhaled particles in the human respiratory tract and consequences for regional targeting in respiratory drug delivery. **Proceedings of the American Thoracic Society**, v. 1, n. 4, p. 315–320, 2004.
- HEYTLER, P. G. [58] Uncouplers of oxidative phosphorylation. **Methods in Enzymology**, v. 55, p. 462–472, 1979.
- HONG, S. et al. Greenland ice evidence of hemispheric lead pollution two millennia ago by Greek and Roman civilizations. **Science**, v. 265, n. 5180, p. 1841–1843, 1994.
- HOSSAINI, R. et al. The increasing threat to stratospheric ozone from dichloromethane. **Nature Communications**, v. 8, n. May, p. 1–9, 2017.
- HUANG, M. et al. Potential Metabolic Activation of a Representative C<sub>4</sub>-Alkylated Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Retene (1-Methyl-7-isopropyl-phenanthrene) Associated with the Deepwater Horizon Oil Spill in Human Hepatoma (HepG2) Cells. **Chemical Research in Toxicology**, v. 30, n. 4, p. 1093–1101, 2017.
- HUANG, M.; BLAIR, I. A.; PENNING, T. M. Identification of Stable Benzo[a]pyrene-7,8-dione-DNA Adducts in Human Lung Cells. **Chemical Research in Toxicology**, v. 26, p. 685–692, 2013.
- IARC – International Agency for Research on Cancer. **Diesel and gasoline engine exhausts and some nitroarenes**. IARC monographs, v. 105, p. 714, 2012. Disponível em: <<https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Diesel-And-Gasoline-Engine-Exhausts-And-Some-Nitroarenes-2013>>. Acesso em: 19 out. 2023.
- IARC – International Agency for Research on Cancer. **Outdoor Air Pollution** - Volume 109 - Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans.
- IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Panorama das cidades. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/ribeirao-preto/panorama>>. Acesso em: 14 mar. 2023.
- ICH - International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use. **Validation of Analytical Procedures: text and methodology Q2(R1)**.

- IDOWU, O. et al. Beyond the obvious: Environmental health implications of polar polycyclic aromatic hydrocarbons. **Environment International**, v. 123, p. 543–557, fev. 2019.
- INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. **Monitoramento de Focos ativos por estado**. Disponível em: <[http://www.inpe.br/queimadas/portal/estatistica\\_estados](http://www.inpe.br/queimadas/portal/estatistica_estados)>. Acesso em: 12 abr. 2023a.
- INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. **Banco de Dados de queimadas**. Disponível em: <<http://www.inpe.br/queimadas/bdqueimadas>>. Acesso em: 15 mar. 2023b.
- IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. **Pure & Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.
- JACOBSON, M. Z. Chapter 4 - Urban Air Pollution. In: **Air Pollution and Global Warming: History, Science, and Solutions**. 2nd ed. Cambridge University Press, 2012. p. 73–99.
- JAKOVLJEVIĆ, I. et al. Influence of lockdown caused by the COVID-19 pandemic on air pollution and carcinogenic content of particulate matter observed in Croatia. **Air Quality, Atmosphere and Health**, v. 14, n. 4, p. 467–472, 2021.
- JAMESON, C. W. Polycyclic aromatic hydrocarbons and associated occupational exposures. In: BAAN, R.; STEWART, B.; STRAIF, K. (Ed.). **Tumour Site Concordance and Mechanisms of Carcinogenesis**. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2019. p. 59–64.
- JANTA, R. et al. Ambient PM<sub>2.5</sub>, polycyclic aromatic hydrocarbons and biomass burning tracer in Mae Sot District, western Thailand. **Atmospheric Pollution Research**, v. 11, n. 1, p. 27–39, 1 jan. 2020.
- JARVIS, I. W. H. et al. Persistent activation of DNA damage signaling in response to complex mixtures of PAHs in air particulate matter. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 266, n. 3, p. 408–418, 2013.
- JARVIS, I. W. H. et al. Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures and implications for cancer risk assessment. **Toxicology**, v. 321, n. 1, p. 27–39, 2014.
- JOSHI, D. R.; ADHIKARI, N. An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity. **Journal of Pharmaceutical Research International**, v. 28, n. 3, p. 1–18, 2019.
- JUNG, K. H. et al. Assessment of Benzo(a)pyrene-equivalent Carcinogenicity and mutagenicity of residential indoor versus outdoor polycyclic aromatic hydrocarbons exposing young children in New York city. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 5, p. 1889–1900, 2010.
- KEITH, L. H. The Source of U.S. EPA's Sixteen PAH Priority Pollutants. **Polycyclic Aromatic Compounds**, v. 35, n. 2–4, p. 147–160, 2015.
- KELLY, F. J.; FUSSELL, J. C. Size, source and chemical composition as determinants of toxicity attributable to ambient particulate matter. **Atmospheric Environment**, v. 60, p. 504–526, 2012.
- KEYTE, I. J.; HARRISON, R. M.; LAMMEL, G. Chemical reactivity and long-range transport potential of polycyclic aromatic hydrocarbons – a review. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 9333, 2013.
- KIM, K. H. et al. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. **Environment International**, v. 60, p. 71–80, 2013.

- 
- KIRKLAND, D. J. et al. In vitro approaches to develop weight of evidence (WoE) and mode of action (MoA) discussions with positive in vitro genotoxicity results. **Mutagenesis**, v. 22, n. 3, p. 161–175, 2007.
- KNASMÜLLER, S. et al. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 402, n. 1–2, p. 185–202, 1998.
- KRUMAL, K.; MIKUSKA, P.; VECERA, Z. Characterization of organic compounds in winter PM1 aerosols in a small industrial town. **Atmospheric Pollution Research**, v. 8, p. 930–939, 2017.
- KUEMPEL, E. D. et al. Advances in Inhalation Dosimetry Models and Methods for Occupational Risk Assessment and Exposure Limit Derivation. **Journal of Occupational and Environmental Hygiene**, v. 12, p. S18–S40, 2015.
- LARA, S. et al. Investigation of PAHs, nitrated PAHs and oxygenated PAHs in PM10 urban aerosols. A comprehensive data analysis. **Chemosphere**, v. 294, n. January, 2022.
- LE BIHANIC, F. et al. In vivo micronucleus screening in zebrafish by flow cytometry. **Mutagenesis**, v. 31, n. 6, p. 643–653, 2016.
- LI, N.; XIA, T.; NEL, A. E. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 44, n. 9, p. 1689–1699, 2008.
- LI, T. et al. A comprehensive understanding of ambient particulate matter and its components on the adverse health effects based from epidemiological and laboratory evidence. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 19, n. 1, p. 1–25, 2022.
- LI, Z. et al. Characterization of PM2.5-bound polycyclic aromatic hydrocarbons in Atlanta and seasonal variations at urban, suburban, and rural ambient air monitoring sites. **Atmospheric Environment**, v. 43, p. 4187–4193, 2009.
- LIMA, Y. da L. et al. Poluição atmosférica e clima: refletindo sobre os padrões de qualidade do ar no Brasil. **Revista Geonorte**, v. 2, n. 5, p. 555–564, 2012.
- MACHADO, M. C. S. et al. Particle-associated polycyclic aromatic hydrocarbons and their dry deposition fluxes from a Bus-Station in the Rio de Janeiro Metropolitan area, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 9, p. 1565–1573, 2009.
- MALLAH, M. A. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbon and its effects on human health: An overview. **Chemosphere**, v. 296, n. October 2021, 2022.
- MARQUES, L. F. C. S. et al. Particle-Associated polycyclic aromatic hydrocarbons in a suburban region of Rio de Janeiro, Brazil, with industrial and traffic emissions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 3, p. 518–529, 2009.
- MEDEIROS, P. M.; SIMONEIT, B. R. T. Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1141, n. 2, p. 271–278, 2007.
- MME – Ministério de Minas e Energia. Matriz energética nacional 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/mme/pt-br/assuntos/secretarias/sntep/publicacoes/balanco-energetico-nacional/ben-2023/matriz-energetica-nacional-2023>. Acesso em: 22 jan. 2024.
- MÖLLER, D. Atmospheric hydrogen peroxide: Evidence for aqueous-phase formation from a historic perspective and a one-year measurement campaign. **Atmospheric Environment**, v. 43, n. 37, p. 5923–5936, 2009.
-

- MONKS, P. S. et al. Atmospheric composition change - global and regional air quality. **Atmospheric Environment**, v. 43, n. 33, p. 5268–5350, 2009.
- MOORTHY, B.; CHU, C.; CARLIN, D. J. Polycyclic aromatic hydrocarbons: From metabolism to lung cancer. **Toxicological Sciences**, v. 145, n. 1, p. 5–15, 2015.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- NISBET, I. C. T.; LAGOY, P. K. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 16, n. 3, p. 290–300, 1992.
- OEHHA - Office of Environmental Health Hazard Assessment. Chemical-specific Summaries of the Information Used to Derive Unit Risk and Cancer Potency Values. Appendix B, 2011. Disponível em: <<https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Diesel-And-Gasoline-Engine-Exhausts-And-Some-Nitroarenes-2013>>. Acesso em: 19 out. 2023.
- OMS – Organização Mundial da Saúde. **WHO global air quality guidelines**. Particulate matter (PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub>), ozone, nitrogen dioxide, sulfur dioxide and carbon monoxide, 2021.
- OMS – Organização Mundial da Saúde. **Ambient (outdoor) air pollution**. Disponível em: <[https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health)>. Acesso em: 10 jan. 2023.
- PAIM, J. N. et al. Emissions of PAHs, Nitro-PAHs and Quinones (Oxy-PAHs) Associated to PM<sub>1.0</sub> and PM<sub>2.5</sub> Emitted by a Diesel Engine Fueled with Diesel-Biodiesel-Ethanol Blends. **Atmosphere**, v. 14, n. 4, p. 1–20, 2023.
- PALACKAL, N. T. et al. Activation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiol proximate carcinogens by human aldo-keto reductase (AKR1C) enzymes and their functional overexpression in human lung carcinoma (A549) cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 27, p. 24799–24808, 2002.
- PAPUTA-PECK, M. C. et al. Determination of Nitrated Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Particulate Extracts by Capillary Column Gas Chromatography with Nitrogen Selective Detection. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 12, p. 1946–1954, 1983.
- PASTOR-BELDA, M. et al. Bioaccumulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons for Forensic Assessment Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry. **Chemical Research in Toxicology**, v. 32, n. 8, p. 1680–1688, 2019.
- PEIXOTO, M. S. et al. Oxidative stress, mutagenic effects, and cell death induced by retene. **Chemosphere**, v. 231, p. 518–527, 2019.
- PENNING, T. M. Genotoxicity of: Ortho -quinones: Reactive oxygen species versus covalent modification. **Toxicology Research**, v. 6, n. 6, p. 740–754, 2017.
- PEREIRA-FILHO, E. R. **Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados**. São Carlos: EdUFSCar, 2015.
- PEREIRA, G. M. et al. Particulate pollutants in the Brazilian city of São Paulo: 1-year investigation for the chemical composition and source apportionment. **Atmospheric Chemistry and Physics**, v. 17, n. 19, p. 11943–11969, 2017.
- PEREIRA, P. A. P.; DE ANDRADE, J. B.; MIGUEL, A. H. Determination of 16 Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Particulate Matter by HRGC-MS after Extraction by Sonication. **Analytical Sciences**, v. 17, n. 10, p. 1229–1231, 2001.

- PEREIRA, F. M. V.; PEREIRA-FILHO, E. R. Aplicação de programa computacional livre em planejamento de experimentos: um tutorial. **Química Nova**, v. 41, n. 9, p. 1061–1071, 2018.
- PIO, C. A. et al. Chemical composition of atmospheric aerosols during the 2003 summer intense forest fire period. **Atmospheric Environment**, v. 42, n. 32, p. 7530–7543, 2008.
- QUEZADA-MALDONADO, E. M. et al. Airborne particulate matter induces oxidative damage, DNA adduct formation and alterations in DNA repair pathways. **Environmental Pollution**, v. 287, n. February, 2021.
- RAMDAHL, T. Retene - a molecular marker of wood combustion in ambient air. **Nature**, 1983.
- RAPPAZZO, K. M. et al. A case-crossover analysis of the relationship of air pollution with out-of-hospital sudden unexpected death in Wake County, North Carolina (2013–2015). **Science of the Total Environment**, v. 694, p. 133744, 2019.
- RAVINDRA, K.; SOKHI, R.; VAN GRIEKEN, R. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: Source attribution, emission factors and regulation. **Atmospheric Environment**, v. 42, n. 13, p. 2895–2921, 2008.
- RAY, P. D.; FRY, R. C. The Cell: The Fundamental Unit in Systems Biology. In: *Systems Biology in Toxicology and Environmental Health*. Elsevier Inc., 2015. p. 11–42.
- RÉ-POPPI, N.; SANTIAGO-SILVA, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons and other selected organic compounds in ambient air of Campo Grande City, Brazil. **Atmospheric Environment**, v. 39, n. 16, p. 2839–2850, 2005.
- RIBEIRO, L. R.; MARQUES, E. K. A importância da mutagênese ambiental na carcinogênese humana. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Ed.). **Mutagênese ambiental**. 1. ed. Canoas: Ed. ULBRA, 2003. p. 21–48.
- ROSA, A. H. et al. Neural network for evaluation of the impact of the UK COVID-19 national lockdown on atmospheric concentrations of PAHs and PBDEs. **Environmental Pollution**, v. 341, n. October 2023, 2024.
- SALDIVA, P. H. et al. Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in Sao Paulo, Brazil. **Archives of environmental health**, 1995.
- SALVADORI, D. M. F.; RIBEIRO, L. R.; FENECH, M. Teste do micronúcleo em células humanas in vitro. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Ed.). **Mutagênese ambiental**. 1a ed ed. Canoas: Ed. ULBRA, 2003. p. 356.
- SAMBUROVA, V.; ZIELINSKA, B.; KHLYSTOV, A. Do 16 polycyclic aromatic hydrocarbons represent PAH air toxicity? **Toxics**, v. 5, n. 3, p. 29–33, 2017.
- SANTOS, A. G. et al. A simple, comprehensive, and miniaturized solvent extraction method for determination of particulate-phase polycyclic aromatic compounds in air. **Journal of Chromatography A**, v. 1435, p. 6–17, 2016.
- SARMA, S. N.; BLAIS, J. M.; CHAN, H. M. Neurotoxicity of alkylated polycyclic aromatic compounds in human neuroblastoma cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 80, n. 5, p. 285–300, 2017.
- SAXENA, N.; PHATAK, P.; CHAUHAN, V. Differential toxicity of abrin in human cell lines of different organ origin. **Toxicology in Vitro**, v. 78, n. February 2021, p. 105250, 2022.
- SCARAMBONI, C. et al. Optimization of a Low Volume Extraction Method to Determine Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Aerosol Samples. **Frontiers in Environmental Science**, v. 9, n. November, p. 1–11, 2021.

- 
- SCARAMBONI, C. et al. Reactive oxygen species-dependent transient induction of genotoxicity by retene in human liver HepG2 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 91, n. May, 2023.
- SCARAMBONI, C. et al. Particulate matter from a tropical city in southeast Brazil: Impact of biomass burning on polycyclic aromatic compounds levels, health risks, and in vitro toxicity. **Chemosphere**, v. 350, p. 141072, 2024.
- SEINFELD, J. H.; PANDIS, S. N. **Atmospheric chemistry and physics: from air pollution to climate change**. 2nd ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2006.
- SHANG, Y. et al. Airborne quinones induce cytotoxicity and DNA damage in human lung epithelial A549 cells: The role of reactive oxygen species. **Chemosphere**, v. 100, p. 42–49, 2014.
- SHEN, H. et al. Global Atmospheric Emissions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from 1960 to 2008 and Future Predictions. **Environmental Science and Technology**, v. 47, p. 6415–6424, 2013.
- SHI, Q. et al. Inflammation-associated extracellular  $\beta$ -glucuronidase alters cellular responses to the chemical carcinogen benzo[a]pyrene. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 9, p. 2261–2273, 2016.
- SHULTZ, C. A. et al. Specificity of human aldo-keto reductases, NAD(P)H: Quinone oxidoreductase, and carbonyl reductases to redox-cycle polycyclic aromatic hydrocarbon diones and 4-hydroxyequilenin-o-quinone. **Chemical Research in Toxicology**, v. 24, n. 12, p. 2153–2166, 2011.
- SILVA, F. S. et al. PM 2.5 and PM10 : The influence of sugarcane burning on potential cancer risk. **Atmospheric Environment**, v. 44, n. 39, p. 5133–5138, 2010.
- SILVA, R. M.; LOPES, A. G.; SANTOS, C. A. G. Deforestation and fires in the Brazilian Amazon from 2001 to 2020 : Impacts on rainfall variability and land surface temperature. **Journal of Environmental Management**, v. 326, n. October 2022, p. 116664, 2023.
- SIMONEIT, B. R. T. et al. Levoglucosan, a tracer for cellulose in biomass burning and atmospheric particles. **Atmospheric Environment**, v. 33, n. 2, p. 173–182, 1999.
- SIMONEIT, B. R. T. Biomass burning — a review of organic tracers for smoke from incomplete combustion. **Applied Geochemistry**, 17, 129–162, 2002.
- SONG, L. et al. Ambient concentrations and deposition rates of selected reactive nitrogen species and their contribution to PM2.5 aerosols at three locations with contrasting land use in southwest China. **Environmental Pollution**, v. 233, n. 2, p. 1164–1176, 2018.
- SONG, Y. M. et al. Dimethyl sulfoxide reduces hepatocellular lipid accumulation through autophagy induction. **Autophagy**, v. 8, n. 7, p. 1085–1097, 2012.
- SOUZA, K. F. et al. Diurnal and nocturnal measurements of PAH, nitro-PAH, and oxy-PAH compounds in atmospheric particulate matter of a sugar cane burning region. **Atmospheric Environment**, v. 83, p. 193–201, 2014.
- STEIN, A. F. et al. NOAA's HYSPLIT atmospheric transport and dispersion modeling system. **Bulletin of the American Meteorological Society**, v. 96, n. December, p. 2059–2077, 2015.
- STRINGER, L. C. et al. Climate change impacts on water security in global drylands. **One Earth**, v. 4, p. 851–864, 2021.
- SUCIU, L. G.; MASIELLO, C. A.; GRIFFIN, R. J. Anhydrosugars as tracers in the Earth system. **Biogeochemistry**, v. 146, n. 6, p. 209-256.
-

- 
- SULLI, G.; DI MICCO, R.; DI FAGAGNA, F. D. A. Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 10, p. 709–720, 2012.
- SUN, Q.; HONG, X.; WOLD, L. E. Cardiovascular effects of ambient particulate air pollution exposure. **Circulation**, v. 121, n. 25, p. 2755–2765, 2010.
- TAI, A. P. K.; MICKLEY, L. J.; JACOB, D. J. Correlations between fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) and meteorological variables in the United States: Implications for the sensitivity of PM<sub>2.5</sub> to climate change. **Atmospheric Environment**, v. 44, n. 32, p. 3976–3984, 2010.
- TICE, R. R. et al. Single Cell Gel / Comet Assay : Guidelines for In Vitro and In Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 35, n. 3, p. 206–21, 2000.
- TURAP, Y. et al. Concentration characteristics, source apportionment, and oxidative damage of PM<sub>2.5</sub>-bound PAHs in petrochemical region in Xinjiang, NW China. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 23, p. 22629–22640, 2018.
- UNICA - União da Indústria de Cana-de-Açúcar. **Relatório final da safra 2021/2022** Região Centro-Sul. Disponível em: <[www.unicadata.com.br](http://www.unicadata.com.br)>. Acesso em: 19 out. 2023.
- URBAN, R. C. et al. Use of levoglucosan, potassium, and water-soluble organic carbon to characterize the origins of biomass-burning aerosols. **Atmospheric Environment**, v. 61, p. 562–569, 2012.
- URBAN, R. C. et al. Sugar markers in aerosol particles from an agro-industrial region in Brazil. **Atmospheric Environment**, v. 90, p. 106–112, 2014.
- URBAN, R. C. **Material particulado de regiões canavieiras: caracterização química, identificação de marcadores, implicações ambientais e na saúde**. 2014. Tese (doutorado). Universidade de São Paulo, 2014.
- URBAN, R. C. et al. Organic aerosols in a Brazilian agro-industrial area: Speciation and impact of biomass burning. **Atmospheric Research**, v. 169, p. 271–279, 2016.
- US-EPA – United States Environmental Protection Agency. **National Ambient Air Quality Standards (NAAQS) for PM**. Disponível em: <<https://www.epa.gov/pm-pollution/national-ambient-air-quality-standards-naaqs-pm>>. Acesso em: 12 out. 2023.
- USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Method 3550C - Ultrasonic extraction**. 2007.
- USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Exposure Factors Handbook**: 2011 Edition.
- USEPA – United States Environmental Protection Agency. **Development of a Relative Potency Factor (RPF) Approach for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Mixtures** (External Review Draft).
- VALLABANI, N. V. S. et al. Toxicity evaluation of particles formed during 3D-printing : Cytotoxic , genotoxic , and inflammatory response in lung and macrophage models. **Toxicology**, v. 467, n. December 2021, 2022.
- VAN DROOGE, B. L. et al. Origin of polycyclic aromatic hydrocarbons and other organic pollutants in the air particles of subway stations in Barcelona. **Science of the Total Environment**, v. 642, p. 148–154, 2018.
- VAN DROOGE, B. L.; BALLESTA, P. P. Seasonal and daily source apportionment of polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations in PM<sub>10</sub> in a semirural
-

- 
- European area. **Environmental Science and Technology**, v. 43, n. 19, p. 7310–7316, 2009.
- VICENTE, A. et al. Organic speciation of aerosols from wildfires in central Portugal during summer 2009. **Atmospheric Environment**, v. 57, p. 186–196, 2012.
- VICENTE, A. et al. Hydrocarbons in particulate samples from wildfire events in central Portugal in summer 2010. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 53, p. 122–131, 2017.
- WALGRAEVE, C. et al. Oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter: Molecular characterization and occurrence. **Atmospheric Environment**, v. 44, n. 15, p. 1831–1846, 2010.
- WANG, L.; ATKINSON, R.; AREY, J. Formation of 9,10-phenanthrenequinone by atmospheric gas-phase reactions of phenanthrene. **Atmospheric Environment**, v. 41, n. 10, p. 2025–2035, 2007.
- WARD, I. M.; CHEN, J. Histone H2AX Is Phosphorylated in an ATR-dependent Manner in Response to Replicational Stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 51, p. 47759–47762, 2001.
- WEI, C. et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their derivatives (alkyl-PAHs, oxygenated-PAHs, nitrated-PAHs and azaarenes) in urban road dusts from Xi'an, Central China. **Chemosphere**, v. 134, p. 512–520, 2015.
- YU, Y. et al. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Not Declining in Arctic Air Despite Global Emission Reduction. **Environmental Science and Technology**, v. 53, n. 5, p. 2375–2382, 2019.
- ZHANG, H. et al. Characteristics and Influencing Factors of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Emitted from Open Burning and Stove Burning of Biomass: A Brief Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 19, n. 7, 2022.
- ZHANG, L. et al. Size distribution of particulate polycyclic aromatic hydrocarbons in fresh combustion smoke and ambient air: A review. **Journal of Environmental Sciences (China)**, v. 88, p. 370–384, 2020.
- ZHANG, Y.; TAO, S. Global atmospheric emission inventory of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) for 2004. **Atmospheric Environment**, v. 43, n. 4, p. 812–819, 2009.
-



**APÊNDICE A**

---

---

**Tabela A** – Dados de data de horário das amostragens, volume de ar amostrado, temperatura do ar média, umidade relativa do ar média, radiação solar média, número de dias prévios sem chover e número de focos de incêndio no Estado de São Paulo

Data e hora do início da amostragem	Data e hora do final da amostragem	Volume de ar amostrado (m <sup>3</sup> )	Temperatura média (°C)	Umidade relativa média (%)	Radiação solar (MJ m <sup>-2</sup> )	Número de dias sem chover	Número de focos de incêndio
<i>Campus</i>							
16/01/2020 11:10	22/01/2020 10:15	245	25,6	81,0	22,4	1	12
10/02/2020 18:16	15/2/20 12:52	232	23,6	85,1	15,7	0	7
02/03/2020 18:30	08/03/2020 10:00	273	23,2	72,1	22,4	0	34
30/03/2020 17:00	03/04/2020 12:50	186	25,1	76,9	18,2	0	15
13/04/2020 17:45	18/04/2020 15:50	239	21,3	79,8	15,7	12	39
18/05/2020 11:10	23/05/2020 11:05	239	22,0	65,3	16,7	2	38
15/06/2020 12:50	20/06/2020 14:00	237	20,3	68,5	15,4	5	64
06/07/2020 10:25	11/07/2020 09:40	210	21,9	57,8	17,8	7	90
27/07/2020 09:55	01/08/2020 10:47	245	22,2	58,1	16,7	28	118
10/08/2020 12:15	15/08/2020 11:50	261	24,4	43,8	16,9	42	399
31/08/2020 14:10	05/09/2020 16:00	238	26,1	41,5	21,2	6	275
12/09/2020 12:00	17/09/2020 15:15	242	27,4	35,2	20,8	18	852
17/9/2020 16:45	20/09/2020 10:00	123	26,5	44,7	17,6	24	117
22/10/2020 09:00	27/10/2020 09:00	204	24,7	70,0	20,8	0	12
<i>Centro da cidade</i>							
09/03/2020 10:45	12/03/2020 09:00	121	25,5	68,1	22,0	6	27
22/04/2020 12:20	25/04/2020 16:00	136	23,6	61,4	19,2	5	40
04/08/2020 08:45	07/08/2020 08:45	111	19,9	47,1	18,9	55	102
24/03/2021 13:45	27/03/2021 11:20	133	26,6	66,0	20,2	2	20
14/07/2021 09:10	17/07/2021 09:30	144	21,5	51,0	16,2	30	107

Fontes: CIIAGRO (2023); INPE (2023b).

**APÉNDICE B**

---

---

Tabela B – Correlações de Spearman entre as concentrações de HPA, oxi-HPA, nitro-HPA, anidroaçúcares e parâmetros meteorológicos

	Flu	Fen	Ant	Flt	Pir	Ret	B[a]A	Cri	B[b]F	B[k]F	B[e]P	B[a]P	Ind	DBA	B[ghi]P
Flu	1,000														
Fen	0,065	1,000													
Ant	0,384	0,865**	1,000												
Flt	0,632**	0,414	0,695**	1,000											
Pir	0,633**	0,418	0,696**	0,998**	1,000										
Ret	0,342	0,616**	0,784**	0,702**	0,704**	1,000									
B[a]A	0,651**	0,361	0,688**	0,965**	0,967**	0,732**	1,000								
Cri	0,672**	0,444	0,728**	0,958**	0,956**	0,774**	0,970**	1,000							
B[b]F	0,614**	0,430	0,723**	0,970**	0,968**	0,779**	0,981**	0,982**	1,000						
B[k]F	0,598**	0,456*	0,716**	0,930**	0,933**	0,789**	0,946**	0,932**	0,953**	1,000					
B[e]P	0,563**	0,430	0,705**	0,937**	0,940**	0,800**	0,953**	0,942**	0,967**	0,979**	1,000				
B[a]P	0,623**	0,453	0,737**	0,970**	0,974**	0,744**	0,982**	0,965**	0,984**	0,968**	0,974**	1,000			
Ind	0,614**	0,453	0,725**	0,986**	0,988**	0,719**	0,974**	0,963**	0,979**	0,960**	0,968**	0,993**	1,000		
DBA	0,618**	0,237	0,621**	0,847**	0,851**	0,719**	0,935**	0,916**	0,921**	0,847**	0,882**	0,904**	0,872**	1,000	
B[ghi]P	0,588**	0,414	0,725**	0,970**	0,972**	0,739**	0,977**	0,944**	0,974**	0,960**	0,965**	0,988**	0,984**	0,893**	1,000

\* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$

**Tabela B – Correlações de Spearman entre as concentrações de HPA, oxi-HPA, nitro-HPA, anidroaçúcares e parâmetros meteorológicos (continuação)**

	Flu	Phe	Ant	Flt	Pyr	Ret	B[a]A	Chry	B[b]F	B[k]F	B[e]P	B[a]P	Ind	DBA	B[ghi]P
9,10-PQ	0,276	0,755**	0,667**	0,453	0,453	0,657**	0,367	0,491*	0,441	0,502*	0,475*	0,418	0,442	0,197	0,395
9,10-AQ	0,612**	0,454	0,702**	0,933**	0,930**	0,788**	0,919**	0,953**	0,926**	0,912**	0,912**	0,918**	0,921**	0,825**	0,904**
BFLO	0,453	0,322	0,406	0,752**	0,752**	0,550**	0,685**	0,689**	0,745**	0,735**	0,699**	0,721**	0,736**	0,531*	0,707**
6H-BPO	0,582**	0,391	0,693**	0,961**	0,963**	0,754**	0,975**	0,939**	0,965**	0,974**	0,981**	0,979**	0,975**	0,881**	0,984**
5-NAce	0,377	0,007	0,002	0,026	0,035	0,063	0,023	0,056	0,019	-0,016	0,016	-0,005	-0,018	-0,009	-0,026
2-NFlu	-0,132	0,186	0,193	-0,260	-0,258	0,289	-0,163	-0,075	-0,118	-0,065	-0,061	-0,170	-0,209	0,035	-0,204
9-NAnt	0,151	-0,313	0,000	0,062	0,058	0,130	0,200	0,165	0,163	0,118	0,174	0,142	0,095	0,455	0,135
3-NFlt	0,637**	0,596**	0,790**	0,856**	0,856**	0,643**	0,822**	0,868**	0,851**	0,798**	0,799**	0,833**	0,846**	0,700**	0,809**
1-NPyr	0,558**	0,647**	0,763**	0,735**	0,739**	0,674**	0,711**	0,796**	0,781**	0,740**	0,751**	0,747**	0,749**	0,640**	0,700**
6-NB[a]P	-0,421	0,593**	0,187	-0,117	-0,117	0,170	-0,221	-0,147	-0,128	-0,004	-0,053	-0,113	-0,089	-0,408	-0,134
LEV	0,486*	0,496*	0,732**	0,875**	0,874**	0,884**	0,909**	0,921**	0,916**	0,923**	0,940**	0,907**	0,896**	0,849**	0,888**
MAN	0,440	0,451	0,665**	0,879**	0,877**	0,835**	0,886**	0,888**	0,904**	0,933**	0,944**	0,900**	0,898**	0,793**	0,884**
GAL	0,504*	0,379	0,619**	0,874**	0,868**	0,756**	0,886**	0,888**	0,884**	0,888**	0,891**	0,881**	0,875**	0,795**	0,861**
Radiação solar	0,037	-0,335	-0,272	-0,335	-0,365	-0,130	-0,282	-0,246	-0,296	-0,391	-0,377	-0,370	-0,396	-0,123	-0,375
Umidade relativa	-0,549**	-0,277	-0,567**	-0,839**	-0,832**	-0,695**	-0,851**	-0,884**	-0,851**	-0,765**	-0,800**	-0,819**	-0,812**	-0,846**	-0,818**
Temperatura do ar	0,139	-0,265	-0,184	-0,246	-0,242	-0,100	-0,175	-0,154	-0,212	-0,244	-0,212	-0,239	-0,274	-0,040	-0,254
Dias sem chover	0,532*	0,408	0,637**	0,837**	0,837**	0,564**	0,859**	0,871**	0,873**	0,807**	0,821**	0,886**	0,872**	0,823**	0,843**
Nº focos de incêndio	0,401	0,339	0,561**	0,850**	0,840**	0,598**	0,834**	0,857**	0,849**	0,770**	0,802**	0,832**	0,839**	0,774**	0,813**

\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$

**Tabela B – Correlações de Spearman entre as concentrações de HPA, oxi-HPA, nitro-HPA, anidroaçúcares e parâmetros meteorológicos (continuação)**

	9,10-PQ	9,10-AQ	BFLO	6H-BPO	5-NAce	2-NFlu	9-NAnt	3-NFlt	1-NPyr	6-NB[a]P	LEV	MAN	GAL
9,10-PQ	1,000												
9,10-AQ	0,581**	1,000											
BFLO	0,421	0,620**	1,000										
6H-BPO	0,432	0,926**	0,689**	1,000									
5-NAce	0,322	0,061	0,135	0,023	1,000								
2-NFlu	0,215	-0,077	-0,362	-0,153	-0,098	1,000							
9-NAnt	-0,341	0,144	-0,271	0,169	-0,230	0,471*	1,000						
3-NFlt	0,642**	0,820**	0,612**	0,795**	0,182	-0,088	-0,062	1,000					
1-NPyr	0,731**	0,737**	0,603**	0,700**	0,254	0,151	-0,030	0,902**	1,000				
6-NB[a]P	0,532*	-0,081	0,222	-0,115	0,047	0,030	-0,720**	-0,004	0,121	1,000			
LEV	0,544**	0,940**	0,585**	0,925**	-0,016	0,068	0,225	0,760**	0,693**	-0,013	1,000		
MAN	0,544**	0,930**	0,654**	0,930**	-0,068	0,007	0,193	0,722**	0,672**	0,030	0,972**	1,000	
GAL	0,481*	0,954**	0,580**	0,905**	-0,060	-0,067	0,227	0,714**	0,623**	-0,096	0,944**	0,967**	1,000
Radiação solar	-0,233	-0,193	-0,399	-0,337	0,216	0,321	0,397	-0,384	-0,289	-0,340	-0,219	-0,293	-0,184
Umidade relativa	-0,368	-0,912**	-0,462*	-0,825**	-0,089	0,070	-0,257	-0,678**	-0,628**	0,259	-0,830**	-0,779**	-0,840**
Temperatura do ar	-0,057	-0,065	-0,490*	-0,205	0,244	0,363	0,359	-0,126	0,021	-0,406	-0,140	-0,200	-0,095
Dias sem chover	0,296	0,822**	0,591**	0,822**	-0,105	-0,181	0,221	0,718**	0,656**	-0,184	0,779**	0,797**	0,844**
Nº focos de incêndio	0,297	0,879**	0,491*	0,816**	-0,177	-0,174	0,160	0,705**	0,598**	-0,140	0,824**	0,815**	0,877**

\* =  $p < 0,05$ , \*\* =  $p < 0,01$ 

Fonte: a própria autora.

**APÊNDICE C**

---

---



# Optimization of a Low Volume Extraction Method to Determine Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Aerosol Samples

OPEN ACCESS

**Edited by:**

Anja H. Tremper,  
Imperial College London,  
United Kingdom

**Reviewed by:**

Sanja Potgieter,  
Manchester Metropolitan University,  
United Kingdom  
Silvia Mosca,  
Istituto sull'Inquinamento Atmosferico  
(IIA), Italy  
Orhan Sevimoğlu,  
Gebze Technical University, Turkey

**\*Correspondence:**

Roberta Cerasi Urban  
roberta.urban@ufscar.br

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work and share first  
authorship

**Specialty section:**

This article was submitted to  
Toxicology, Pollution and the  
Environment,  
a section of the journal  
Frontiers in Environmental Science

**Received:** 15 July 2021

**Accepted:** 05 October 2021

**Published:** 04 November 2021

**Citation:**

Scaramboni C, Neris JB,  
do Nascimento RdKS,  
Chiaranda da Rosa NL, Carvalho JS,  
Grosseli GM, Campos MLAM,  
Fadini PS and Urban RC (2021)  
Optimization of a Low Volume  
Extraction Method to Determine  
Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in  
Aerosol Samples.  
Front. Environ. Sci. 9:742251.  
doi: 10.3389/fenvs.2021.742251

Caroline Scaramboni<sup>1†</sup>, Jordan Brizi Neris<sup>2†</sup>, Rita de Kássia Silva do Nascimento<sup>2</sup>,  
Natasha Leandra Chiaranda da Rosa<sup>2</sup>, Jonatas Schadeck Carvalho<sup>2</sup>,  
Guilherme Martins Grosseli<sup>2</sup>, Maria Lucia Arruda Moura Campos<sup>1</sup>, Pedro Sérgio Fadini<sup>2</sup> and  
Roberta Cerasi Urban<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Chemistry Department, FFCLRP, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, <sup>2</sup>Chemistry Department, Federal University of São Carlos, São Paulo, Brazil

This work describes the optimization of an extraction method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their nitro- and oxy-PAH derivatives in atmospheric particulate matter (PM) samples, and demonstrates that this method is also effective for the determination of levoglucosan. The optimization of the extraction solvents was performed using a three-component mixture design with the solvents dichloromethane, methanol, and acetonitrile. The number of extractions, volume of solvent, and duration of extraction in an ultrasonic bath were optimized using a full factorial design followed by a central composite design. The analyses were performed by gas chromatography coupled with mass spectrometry. The optimized conditions of the method were three extractions using 4.0 ml of acetonitrile, with ultrasonication for 34 min. The proposed method presented good linearity ( $r > 0.990$ ) and acceptable precision for low (100 ng ml<sup>-1</sup>, RSD: 1–16%), medium (300 ng ml<sup>-1</sup>, RSD: 1–19%), and high (500 ng ml<sup>-1</sup>, RSD: 2–16%) concentrations of PAHs. The limits of quantification for different PAHs ranged from 10 to 50 ng ml<sup>-1</sup>, which were suitable for atmospheric PM. Assessment of the method using sample matrix spiking/recovery assays, as well as use of a reference method, showed good recoveries for levoglucosan and for most of the PAHs and their derivatives, except for the most volatile compounds, which were lost during the evaporation of the solvent. The results for PM samples extracted by the optimized method and the reference method were in good agreement. The proposed method required 97% less solvent than the reference method, shortened the analysis time by 85%, and proved to be accurate and precise for the determination of at least 27 PAHs and their derivatives present in PM samples collected with a low-volume sampler.

**Keywords:** PAH, oxy-PAH, nitro-PAH, particulate matter, design of experiments, green chemistry, levoglucosan



## 1 INTRODUCTION

Atmospheric particulate matter (PM) has been widely studied worldwide due to its impact on the environment, reduction of visibility, and effects on human health (Rodríguez-Urrego and Rodríguez-Urrego, 2020; Zheng et al., 2020). It is estimated that the number of deaths in the world due to long-term outdoor exposure to  $PM \leq 2.5 \mu m$  ( $PM_{2.5}$ ) was approximately 4.14 million in 2019 (Health Effects Institute, 2020). The high socio-environmental impact is linked to the physicochemical characteristics of PM, with these particles having different chemical compositions and sizes, depending on their formation processes (Alves, 2005; Harrison, 2020). It has been shown that  $PM_{2.5}$  has carcinogenic potential, mainly resulting in lung cancer (Khan et al., 2018; Senthil Kumar et al., 2018).

In general, PM consists of inorganic species (sulfates, nitrates, metals, etc.) and carbonaceous material that is a complex mixture of organic molecules and elemental carbon (Alves, 2005). Several studies have indicated that the carcinogenic potential of these particles is mainly due to the presence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their oxy- and nitro-PAH derivatives in the organic fraction of PM (Kelly and Fussell, 2012; de Oliveira Alves et al., 2017; de Oliveira Galvão et al., 2018; Nováková et al., 2020).

PAHs are a class of organic compounds that contain only carbon and hydrogen atoms, consist of two or more aromatic rings condensed together, and are formed during incomplete combustion or pyrolysis of organic material (Kim et al., 2013). Oxy- and nitro-PAHs have substitutions of one or more hydrogen atoms by carbonyl and nitro functional groups, respectively, and are either directly formed during combustion or are products of secondary reactions in the atmosphere (Abbas et al., 2018; Idowu et al., 2019).

The distribution of PAHs between the particulate and gaseous phases is determined by their vapor pressure, which decreases drastically with increasing molecular weight. Consequently, at room temperature, two-ring PAHs are mostly found in the gas phase, while carcinogenic five-ring PAHs, such as benzo [*a*] pyrene, are mostly adsorbed on airborne particles (IARC–International Agency for Research on Cancer, 2010; Kameda, 2011).

Biomass burning is a major source of PAH emissions, so the use of a chemical tracer capable of identifying this origin of PM is of great relevance (Urban et al., 2014). Levoglucosan is an anhydrosaccharide produced by the pyrolysis of cellulose at high temperatures ( $>300^\circ C$ ) and has been proposed as a specific tracer for biomass burning (Simoneit et al., 1999; Urban et al., 2012).

Existing methods reported in the literature for simultaneous extraction of levoglucosan and PAHs, prior to determination by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS), are scarce and involve additional experimental steps, such as fractionation, or use of a thermal desorption injection system (Van Drooge and Ballesta, 2009; Sevimoglu and Rogge, 2015; Turap et al., 2018; van Drooge et al., 2018).

It is evident that knowledge of the origins, characteristics, and concentrations of PAHs and their derivatives in atmospheric PM

is necessary for the purposes of monitoring and subsequent mitigation of the concentrations of these chemical species in the environment. Among the analytical methods most commonly used to identify and quantify PAHs are GC-MS and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-fluorescence) (Eiguren-Fernandez and Miguel, 2003). The use of other methods, such as HPLC-MS, is also possible and can be very efficient, but the associated costs may be prohibitive for many laboratories (Ohno et al., 2009).

HPLC-fluorescence is widely used for PAHs determination, due to its high sensitivity and excellent resolution (Liaud et al., 2015; Boongla et al., 2017). However, the use of the fluorescence detector necessitates the addition of a clean-up column to minimize matrix interferences, as well as a pre-column or on-line derivatization for nitro-PAHs, due to their low or zero fluorescence emission (Delhomme et al., 2007; Sun et al., 2020). These additional experimental steps in the sample preparation procedure increase the time and cost of the analysis.

The use of GC-MS for separation and quantification of PAHs and their derivatives can reduce the coefficients variation (Gratz et al., 2000). The combination of the two techniques (GC and MS) enables the detection and accurate quantification of the compounds, even when present in complex matrices (Abbas et al., 2018; Zhang et al., 2020).

The extraction methods reported in the literature for use with GC-MS usually involve the use of high volumes of organic solvents ( $>300$  ml) and lengthy extraction procedures to enable the detection and quantification of these molecules (Guo et al., 2003; Machado et al., 2009; Marques et al., 2009; Alves et al., 2011; de Oliveira Alves et al., 2015; Song et al., 2018). Several organic solvents have already been used individually or in mixtures to extract PAHs and derivatives from PM, such as acetone, acetonitrile, dichloromethane, hexane, methanol and toluene (Santos et al., 2016; Balducci et al., 2018; Ma et al., 2020; Nováková et al., 2020; Hong et al., 2021; Lim et al., 2021).

Extraction methods that use micro-volumes of solvent are only suitable for the analysis of aerosol samples collected by high-volume air samplers, where there is a large mass of PM deposited on the sampling filter (Santos et al., 2016). Therefore, an extraction method enabling reduction of organic solvent volumes, the use of low-volume samplers, and the simultaneous quantitative extraction of levoglucosan would be highly desirable.

Multivariate techniques such as factorial, central composite, Box-Behnken, Doehlert, and mixture designs have been used to optimize sample preparation procedures, offering advantages such as short optimization times, acquisition of a greater quantity of experimental data using a relatively small number of experiments, and lower reagent consumption (Ferreira et al., 2007; Santos et al., 2016; Gamela et al., 2020).

The objective of this study was to use design of experiments to optimize an extraction method using small solvent volumes for simultaneous determination of PAHs and their oxy- and nitro-derivatives by GC-MS, and to investigate its application for the simultaneous extraction of levoglucosan. This new procedure enables the use of organic solvents to be minimized, while maintaining good

accuracy and precision in the analysis of PM collected with low-volume air samplers.

## 2 EXPERIMENTAL

### 2.1 Standards

For the construction of analytical curves and for carrying out the recovery tests, a stock standard solution containing all the PAHs, nitro-PAHs, and oxy-PAHs at 1,000 ng ml<sup>-1</sup> (individual concentrations) was prepared in dichloromethane:toluene (1:1). A stock internal standard solution containing all the deuterated PAHs, nitro-PAHs, and oxy-PAHs at 1,000 ng ml<sup>-1</sup> was also prepared in dichloromethane:toluene (1:1). Solutions of levoglucosan and its internal standard, levoglucosan-C13, were prepared in methanol, both at a concentration of 100,000 ng ml<sup>-1</sup>. A complete list of the standards used is available in **Supplementary Tables S1, S2** shows the internal standards used for each analyte.

### 2.2 Aerosol Sampling

Aerosol samples used to test the accuracy and the application of the optimized method were collected in two cities, São Carlos and Ribeirão Preto, both located in São Paulo State, Brazil, where biomass burning is an important source of aerosol.

PM<sub>10</sub> was collected in the city center of São Carlos (-22.01973S, -47.89009W) on April 27th, 2017, during 24 h, using a high-volume sampler with a size-selective inlet for particles less than 10 μm in diameter (model GS-2310, Accuvol) fitted with a 509 cm<sup>2</sup> glass fiber membrane and operated at a flow rate of 1 m<sup>3</sup> min<sup>-1</sup>. This sample was used to perform the recovery test employing the sample matrix. A high-volume sample was chosen for this test, because the large area of the membrane made it possible to analyze three replicates of three different concentrations, as suggested by IUPAC—International Union of Pure and Applied Chemistry (2002).

For the accuracy test performed by comparison with a reference extraction method, two samples of fractionated PM were collected in parallel at the campus of the University of São Carlos (-21.97812S, -47.88422W), during 7 days from August 20th to 27th, 2020. The sampling was performed with two identical low-volume impactor samplers (MOUDI 100S4, MSP Corporation) with aerodynamic cutoffs for the individual stages of 18, 10, 2.5, and 1.0 μm. The samples were collected on quartz fiber membranes (47 mm diameter, Whatman), at a flow rate of 30 L min<sup>-1</sup>.

To test the application of the method, a fractionated particulate matter sample was collected using the 4-stage MOUDI impactor at the campus of the University of São Paulo in Ribeirão Preto (-21.16140S, -7.85768W), during 5 days from June 15th to 20th, 2020.

All the membranes containing the particulate matter were wrapped in aluminum foil, placed in plastic bags, and stored at -22°C until analyzed.

Blank tests performed with both types of membranes (glass and quartz fibers) resulted into low or below LOD signals for all

studied PAHs and levoglucosan, showing that different membrane types did not present a relevant matrix effect.

### 2.3 Analytical Instrumentation

Analyses were performed using a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (GCMS-QP2010, Shimadzu). Injections were performed using an autosampler (AOC-20i, Shimadzu). The column used was an SLB<sup>®</sup>-5 ms Capillary GC Column (Sigma-Aldrich) composed of 5% diphenyl and 95% dimethylpolysiloxane, with dimensions of L × I.D. 30 m × 0.25 mm, d<sub>f</sub> 0.25 μm.

The chromatographic parameters were as described by Santos et al. (2016), with minor changes. The GC oven was programmed as follows: 70°C (2 min); 30°C min<sup>-1</sup> to 200°C (5 min); and 5°C min<sup>-1</sup> to 320°C (3 min). The carrier gas was helium, at a constant flow rate of 1.0 ml min<sup>-1</sup>. The injector was operated at 300°C, in splitless mode, with 0.80 min sampling time. The mass spectrometer was operated in electron impact mode, with 70 eV ionization energy and source and interface temperatures of 250 and 320°C, respectively. The analyses were performed in selected ion monitoring (SIM) mode. For each PAH and derivative, at least two ions with different *m/z* were selected (**Supplementary Table S3**).

### 2.4 Extraction Procedure

The experimental optimization of the extraction procedure was performed using blank glass fiber membranes with area of 17.3 cm<sup>2</sup> (Gelman Sciences Inc.), which were spiked with standard solutions of PAHs, their nitro- and oxy-derivatives, and the deuterated internal standards, all to final concentrations of 1,000 ng ml<sup>-1</sup>. The spiked membranes were cut into small pieces directly into a glass vessel and were extracted with organic solvent, using an ultrasonic bath (Unique). When the extraction procedure was repeated, the extracts were combined and then evaporated down to approximately 0.5 ml, under reduced pressure, using a Büchi evaporator. The extract was filtered using a 0.22 μm pore size PTFE filter unit (Analítica), followed by complete evaporation under a gentle flow of nitrogen. The dried material was resuspended in 100 μl of acetonitrile (Supelco) and a 2 μl aliquot was injected into the GC-MS system. In order to obtain the recoveries of each PAH and derivative, the ratio between the peak areas of the analyte and its corresponding internal standard was compared to the corresponding value for a control solution that was directly injected into the GC-MS.

### 2.5 Experimental Optimization

Firstly, a three-component mixture design was used in order to identify the best extraction solvent, considering acetonitrile, dichloromethane, and methanol (Merck). These solvents were chosen due to their relatively high polarity, which allow for the extraction of more polar derivatives of PAHs, and due to their wider use in works that determined these compounds. Ten experiments were performed according to a simplex-centroid design with axial points. The experimental error was evaluated using three replicates at the central point, increasing the total number of experiments to twelve. In order to determine only the

effect of the solvents, the total volume of solvent was fixed at  $3 \times 5.0$  ml and the ultrasonication time was fixed at 30 min.

After selection of the optimal solvent, the parameters that had previously been fixed in the mixture design were then optimized using a full factorial design ( $2^3$ ) with a central point. Nine experiments were performed, varying the extraction solvent volume (3.0, 4.0, and 5.0 ml), the number of extractions (1, 2, and 3), and the sonication time (10, 20, and 30 min). Three replicates at the central point were performed and the total number of experiments was 11. A further refinement was performed using a central composite design in which two variables were tested at five different levels, considering the extraction solvent volume (2.6, 3.0, 4.0, 5.0, and 5.4 ml) and the sonication time (6, 10, 20, 30, and 34 min). A further four experiments were performed in the refinement process.

The recoveries of all the analytes were converted to values between zero (completely undesirable response) and 1 (desirable response), using a desirability function (Pereira-Filho, 2015). The desirability function considered the amplitude of the recovery range obtained (from 0 to 300%) and the desirable range (from 70 to 130%), and was calculated according to Eq. 1, where  $d_i$  represents the individual desirability for each PAH, and  $y$  represents the recovery.

$$d_i = \left\{ \begin{array}{l} \frac{y}{0.7} \text{ if } y < 0.7 \\ 1 \text{ if } 0.7 < y < 1.3 \\ \frac{3.0 - y}{3.0 - 1.3} \text{ if } y > 1.3 \end{array} \right\} \quad (1)$$

The individual desirability for each PAH ( $d_i$ ) was converted to the overall desirability (OD) for each experiment, according to Eq. 2, where  $k$  is the number of individual desirabilities.

$$OD = \sqrt[k]{d_1 d_2 \dots d_k} \quad (2)$$

The overall desirability value of each experiment was then used to calculate the effect of each condition on the model response, as well as to calculate the single regression model that represented the best extraction condition. The model was calculated using the freeware Octave [graphical user interface (GUI) version], with the computational routines proposed by Pereira and Pereira-Filho (2018).

## 2.6 Method Validation

### 2.6.1 Limits of Detection and Quantification

The limit of detection (LOD) was calculated using the signal-to-noise approach, by gradually decreasing the concentration of the analyte until achieving a signal-to-noise ratio between 3:1 and 2:1 (Jatinder, 2005). The LOD was calculated by directly injecting the standard solutions into the GC-MS system, so the concentration values obtained were related to the detectability power of the chromatographic instrumentation.

The limit of quantification (LOQ) was set as the lowest concentration of the analytical curve, which is the minimum level at which the analyte can be quantified with acceptable accuracy and precision (Jatinder, 2005).

### 2.6.2 Linearity

The analytical curves were obtained, in triplicate, by spiking blank glass fiber membranes with different volumes of a standard solution containing all the PAHs and derivatives, together with a fixed volume of the standard solution containing the internal standards (final concentration of  $200 \text{ ng ml}^{-1}$ ). The spiked membranes were submitted to the complete extraction process. The filtered extracts were injected into the GC-MS and the analytical curves were obtained by plotting the ratio between the areas of the analyte and the corresponding internal standard against the concentration.

### 2.6.3 Precision

The precision of the method was obtained by considering the repeatability of nine different determinations covering the analytical range. For this, the relative standard deviation (RSD) was calculated for three replicates at three different concentrations: low ( $100 \text{ ng ml}^{-1}$ ), medium ( $300 \text{ ng ml}^{-1}$ ) and high ( $500 \text{ ng ml}^{-1}$ ) (Jatinder, 2005).

### 2.6.4 Accuracy

The accuracy of the optimized method was assessed in two ways, using spiking/recovery of the sample matrix and a reference method (IUPAC—International Union of Pure and Applied Chemistry, 2002).

The recovery test using the sample matrix was performed by cutting the  $509 \text{ cm}^2$  membrane containing the  $\text{PM}_{10}$  sample into twelve  $17.3 \text{ cm}^2$  discs. Three of the discs were extracted and analyzed without spiking, while the other nine were spiked with standard solutions of the PAHs and the derivatives. Three discs were spiked with a final concentration of  $100 \text{ ng ml}^{-1}$  (lowest concentration of the analytical range), another three with  $300 \text{ ng ml}^{-1}$  (intermediate concentration), and the last three with  $500 \text{ ng ml}^{-1}$  (highest concentration). The percentage recovery was calculated by subtracting the concentration for the spiked sample from that for the sample that had not been spiked.

The accuracy test using the reference method (Alves et al., 2011; Urban et al., 2016) was performed using the fine fraction ( $<1.0 \mu\text{m}$ ) of the two fractionated PM samples collected in parallel with two identical low-volume samplers. One membrane was extracted using the optimized method and the other was extracted using the reference method described in detail by Urban et al. (2016). Briefly, the latter extraction was performed by refluxing the membrane with the collected sample for 24 h in a Soxhlet apparatus containing 300 ml of dichloromethane. The solvent phase was transferred to a clean round-bottom flask and the remaining membrane was extracted with 25 ml of methanol, for 10 min, in an ultrasonic bath. Another two extractions were performed with 25 ml of methanol. The combined dichloromethane and methanol extracts (375 ml) were concentrated to approximately 1 ml, under reduced pressure. The extract was filtered ( $0.22 \mu\text{m}$  PTFE membrane) and then completely evaporated under a gentle flow of ultrapure nitrogen. The dried material was resuspended in  $100 \mu\text{l}$  of acetonitrile and a  $2 \mu\text{l}$  aliquot was injected into the GC-MS system. The agreement between the

**TABLE 1** | Experimental conditions of the mixture design performed for the extraction solvent optimization, and the responses in terms of overall desirability (OD). The coded values are shown within parentheses.

Experiment	Volume of solvent (ml)			OD
	Dichloromethane	Methanol	Acetonitrile	
1	0.83 (0.167)	3.40 (0.667)	0.83 (0.167)	0.571
2	3.40(0.667)	0.83 (0.167)	0.83 (0.167)	0.670
3	0.00 (0)	2.50 (0.5)	2.50 (0.5)	0.637
4	0.00 (0)	5.00 (1)	0.00 (0)	0.587
5	0.00 (0)	0.00 (0)	5.00 (1)	0.761
6	0.83 (0.167)	0.83 (0.167)	3.40 (0.667)	0.765
7	2.50 (0.5)	2.50 (0.5)	0.00 (0)	0.601
8	2.50 (0.5)	0.00 (0)	2.50 (0.5)	0.743
9	5.00 (1)	0.00 (0)	0.00 (0)	0.711
10	1.70 (0.333)	1.70 (0.333)	1.70 (0.333)	0.635
11	1.70 (0.333)	1.70 (0.333)	1.70 (0.333)	0.570
12	1.70 (0.333)	1.70 (0.333)	1.70 (0.333)	0.752

methods was calculated using the ratio between the areas of the analyte and the corresponding internal standard obtained using the optimized method, divided by the ratio obtained using the reference method.

## 2.7 Levoglucosan Determination

Although the focus of this work is to analyse PAHs and their derivatives in PM samples, the optimized extraction method was applied to the determination of levoglucosan, given the importance of biomass burning as a source of PAHs.

For the recovery test, three blank quartz fiber membranes were spiked with both levoglucosan and levoglucosan-C13, to a final concentration of 1,000 ng ml<sup>-1</sup> of each standard, and the extraction was made using the optimized method.

Before injection into the GC-MS system, the dried extracts were derivatized for 3 h, at 70°C, with 40 µl of N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) containing 1% trimethylchlorosilane (TMCS, Sigma-Aldrich) and 10 µl of pyridine (Merck). After derivatization, a 950 µl volume of hexane was added to the derivatized extract, the mixture was homogenized, and 1 µl was injected into the GC-MS system. The chromatographic parameters for levoglucosan analysis were as described by Urban et al. (2012).

The recoveries were calculated by dividing the ratio between the peak areas of the sugar and the internal standard, obtained after extraction, by the ratio obtained for a control solution that was directly injected into the GC-MS after derivatization.

## 3 RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1 Optimization of the Extraction Method

The solvent was optimized using a mixture design. The experimental conditions for each component of the mixture design (real and coded values) are shown in **Table 1**, together with the overall desirability (OD).

Based on the data shown in **Table 1**, it was possible to calculate the cubic regression model using the computational routine “regression2,” proposed by Pereira and Pereira-Filho (2018).

The binary interaction coefficients for all possible pairs of components and the tertiary interaction coefficient for the three components simultaneously were not significant (confidence level = 95%). Thus, the model was recalculated with the individual coefficients, which remained significant after the recalculation (confidence level = 95%).

A short description of the analysis of variance (ANOVA) for the linear model calculated is presented in **Supplementary Table S4**. The Fisher distribution test (*F*-test) was used to examine the significance of the difference between the ANOVA parameters. The linear regression model was significant ( $F_{\text{calculated}} > F_{\text{critical}}$ ) and there was no lack of fit ( $F_{\text{calculated}} < F_{\text{critical}}$ ). The model was able to explain 63% of the variation ( $R^2 = 0.6280$ ), with a maximum explicable variation of 79% ( $R_{\text{max}}^2 = 0.7924$ ). Therefore, the regression model was able to satisfactorily describe the data behavior.

The linear equation obtained (**Eq. 3**) was used to calculate the optimal experimental conditions and to draw the response surface (**Figure 1**).

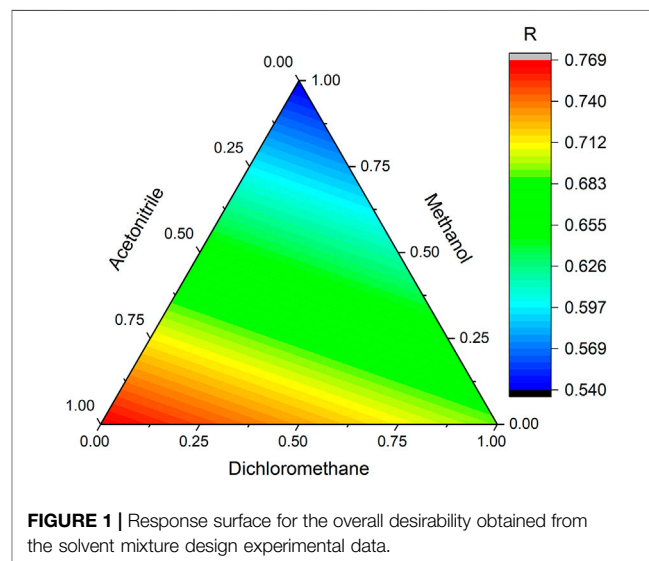
$$R = 0.692v_1 + 0.541v_2 + 0.768v_3 \quad (3)$$

where, *R* is the response (overall desirability),  $v_1$  corresponds to variable 1 (dichloromethane),  $v_2$  to variable 2 (methanol), and  $v_3$  to variable 3 (acetonitrile).

Methanol was the least favorable solvent, while acetonitrile was the most important solvent in the extraction. The proportion with the highest response (i.e., desirability closest to 1) was 100% acetonitrile, so this condition was chosen to continue the extraction optimization process.

The experimental conditions were codified between -1 and +1 in order to estimate the optimal conditions for the number of extractions, solvent volume, and sonication time, using the full factorial design (2<sup>3</sup>) with central point. The real and coded values, as well as the overall desirability values are shown in **Table 2**.

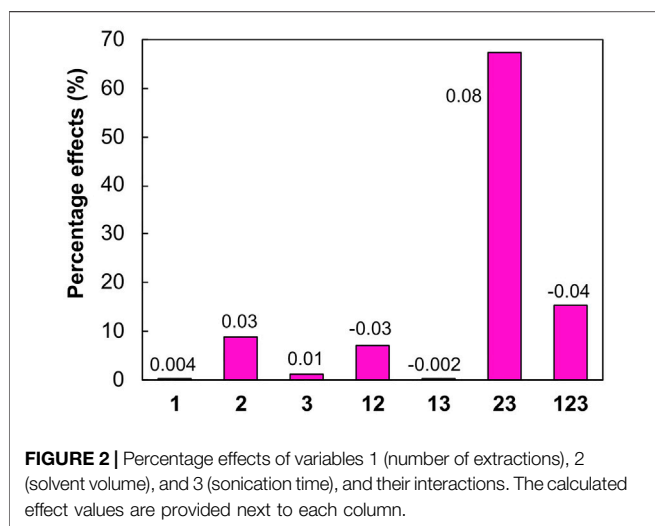
Based on the data shown in **Table 2**, it was possible to calculate the effects that the individual variables and their interactions had





**TABLE 2 |** Experimental conditions of the full factorial design (2<sup>3</sup>) with central point performed for optimization of the number of extractions, solvent volume, and sonication time, and the responses in terms of overall desirability (OD). The coded values are within parentheses.

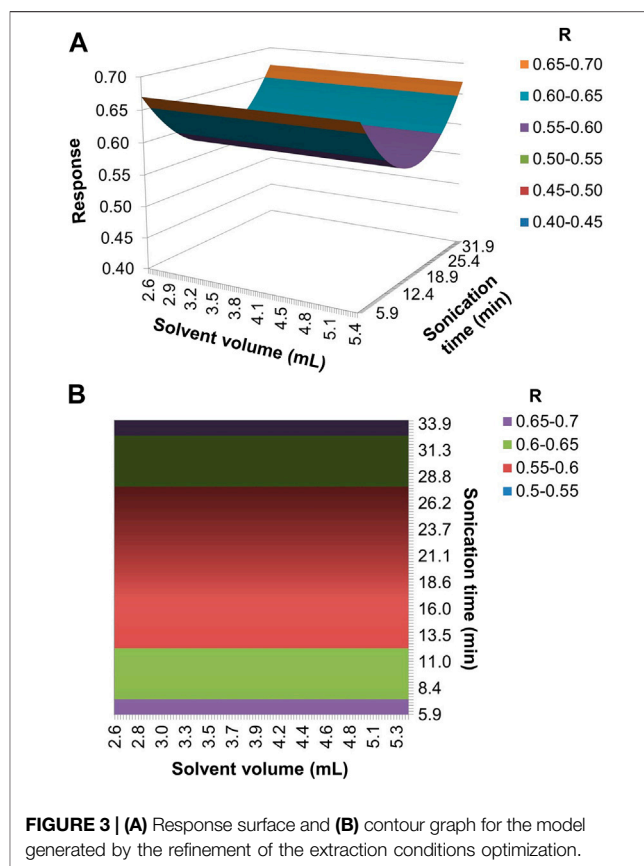
Experiment	Number of extractions	Solvent volume (ml)	Sonication time (min)	OD
1	1 (-1)	3.00 (-1)	10 (-1)	0.647
2	3 (1)	3.00 (-1)	10(-1)	0.640
3	1 (-1)	5.00 (1)	30 (1)	0.715
4	3 (1)	5.00 (1)	10 (-1)	0.601
5	1 (-1)	3.00 (-1)	30 (1)	0.541
6	3 (1)	3.00 (-1)	30 (1)	0.607
7	1 (-1)	5.00 (1)	10 (-1)	0.583
8	3 (1)	5.00 (1)	30 (1)	0.652
9	2 (0)	4.00 (0)	20 (0)	0.584
10	2 (0)	4.00 (0)	20 (0)	0.589
11	2 (0)	4.00 (0)	20 (0)	0.529



**TABLE 3 |** Central composite design used for the refinement process of the extraction conditions (solvent volume and sonication time), and the responses in terms of overall desirability (OD). The coded values are within parentheses.

Experiment	Solvent volume (ml)	Sonication time (min)	OD
1 and 2	3.00 (-1)	10 (-1)	0.644
3 and 8	5.00 (1)	30 (1)	0.684
4 and 7	5.00 (1)	10 (-1)	0.593
5 and 6	3.00 (-1)	30 (1)	0.575
9	4.00 (0)	20 (0)	0.568
10	2.60 (-1.41)	20 (0)	0.674
11	4.00 (0)	6 (-1.41)	0.747
12	5.40 (1.41)	20 (0)	0.629
13	4.00 (0)	34 (1.41)	0.673

on the response. Seven effects, with three being first order (1, 2, and 3—individual variables), three second order (12, 13, and 23—interaction between two variables), and one third order (123—three variables), were calculated using the computational routine “fabi\_efeito” (Pereira and Pereira-Filho, 2018). As shown in **Figure 2**, the most important effect, with a relative percentage of 67%, was for the interaction of variables 2 and 3, solvent



volume and sonication time, respectively. Therefore, these two variables were tested at a greater number of levels, in a refinement process. Variable 1 (number of extractions) was the least important effect, so for the refinement process, the number of extractions was kept constant at its high level (+1), because despite being small, the effect was positive (**Figure 2**).

The refinement was performed using a central composite design. With the exclusion of one variable, some experiments from the previous full factorial design were duplicated, so the overall desirability was calculated as the arithmetic mean. The experimental conditions of the central composite design (real and

coded values) used for the refinement process are shown in **Table 3**, together with the overall desirability values.

A regression model was generated from the data in **Table 3**, using the computational routine “regression2” (Pereira and Pereira-Filho, 2018). The model showed a slight lack of fit, as the ratio between the calculated and tabulated  $F$  values was slightly greater than 1 (**Supplementary Table S5**). Despite this, the coefficients were calculated considering that there was no lack of fit in the model. The model was able to explain 48% of the variation ( $R^2 = 0.4768$ ), with a maximum explicable variation of 87% ( $R_{\max}^2 = 0.8720$ ).

Considering only significant coefficients (confidence level = 95%), the following regression equation was obtained:

$$R = 0.568 + 0.052v_{22} \quad (4)$$

where,  $R$  is the response (overall desirability) and  $v_{22}$  corresponds to the square of variable 2 (sonication time). Thus, the solvent volume was not important in terms of desirability, but the sonication time was. **Eq. 4** was used to draw the response surface and the contour graph (**Figure 3**).

Since the volume of solvent did not influence the response, the intermediate volume of 4.0 ml was chosen, which minimized the volume of solvent, while ensuring that the entire filter was covered. The extraction time influenced the overall desirability, with the maximum responses obtained at the two extremes (6 and 34 min).

In order to determine the most appropriate time for the extraction, a sample of  $PM_{10}$  was analyzed, in triplicate, maintaining fixed the extraction solvent (acetonitrile), the solvent volume (4 ml), and the number of extractions (3), but using the two different sonication times. Most peak areas (74%) corresponding to the PAHs and their derivatives for the extraction times of 6 and 34 min were not statistically different ( $t$ -test,  $p = 0.05$ ). The peak areas corresponding to pyrene, benzo[a]anthracene, chrysene-d12, chrysene, benzo[k]fluoranthene, benzo[e]pyrene, indeno-[1,2,3-cd]-pyrene, dibenzo [a,h]anthracene, and benzo[g,h,i]perylene were larger after 34 min of extraction ( $t$ -test,  $p = 0.05$ ). Hence, the 34 min sonication extraction time was selected, since greater detectability may be essential for the determination of PAHs in particulate matter samples, due to their low concentrations in this matrix. Therefore, the final optimized method was:

1. The sampled membrane (area of  $17.3 \text{ cm}^2$ ) was cut into small pieces directly into a glass vessel.
2. A volume of 4.0 ml of acetonitrile was added into the vessel and ultrasonicated for 34 min.
3. After sonication, the solvent was transferred to a round-bottom flask.
4. Steps 2 and 3 were repeated twice, and the extracts were transferred to the same flask.
5. The combined solution was evaporated down to approximately 0.5 ml using a rotary evaporator.
6. The concentrated extract was filtered ( $0.22 \mu\text{m}$ ) and dried under a gentle flow of nitrogen.

7. The remaining material was resuspended in  $100 \mu\text{l}$  of acetonitrile and homogenized.
8. A volume of  $2 \mu\text{l}$  of the final extract was injected into the GC-MS.

As described previously (**Section 2.6.4**), the commonly used extraction procedure is time-consuming and uses a total solvent volume of 375 ml (Alves et al., 2011; Urban et al., 2016). In comparison, the optimized method developed here uses 97% less solvent and shortens the analysis time by about 85%. Furthermore, the proposed method does not require an additional clean-up step, such as fractionation using a silica column, which is normally performed after Soxhlet extraction.

Another extraction method commonly used for the determination of PAHs in particulate matter by GC-MS is the one based on the ultrasonic extraction method number 3550C described by USEPA—United States Environmental Protection Agency (2007). In this method, four extractions with 50 ml of dichloromethane are performed in an ultrasonic bath, each for 15 min, followed by an additional extraction with 100 ml of dichloromethane for 20 min (Machado et al., 2009; Marques et al., 2009). This method is less time-consuming, compared to Soxhlet extraction, and the total extraction time is similar to that of the method proposed here. However, a relatively high amount of solvent is required for only one sample (total of 300 ml of dichloromethane). Guo et al. (2003) used an extraction method similar to the one based on USEPA method 3550C, with three ultrasonic extractions using 150 ml of dichloromethane for 30 min. However, a fractionation step was performed after the extraction, using a silica alumina column.

Other extractions have been proposed with the aim of minimizing the use of organic solvents, such as the one developed by Pereira et al. (2001), involving a single extraction with 4 ml of a mixture of acetonitrile:dichloromethane (3:1) in an ultrasonic bath. More recently, Ferreira et al. (2021) proposed a 3 min ultrasonic extraction using 50 ml of a 1:1 mixture of n-hexane:acetone. However, both methods were validated solely for determination of the 16 priority PAHs and were applied for the analysis of samples collected using high-volume samplers. A reported miniaturized extraction method with micro-extractors uses only  $500 \mu\text{l}$  of 18% acetonitrile in dichloromethane (Santos et al., 2016). However, in the present work, previous recovery tests resulted in peak areas too close to the LOD, demonstrating that this method was unsuitable for samples collected using low-volume samplers (data not shown).

Despite the use of acetonitrile (which is potentially hazardous, since it can be metabolized to cyanide), the proposed method differed from the vast majority of the reported methods by being 100% free from dichloromethane, considered a red category chlorinated solvent, according to the principles of Green Chemistry (Joshi and Adhikari, 2019).

### 3.2 Method Validation

Validation of the method was performed according to the International Conference on Harmonization guidelines and the criteria suggested by IUPAC and AOAC International

**TABLE 4** | Mean recoveries of the analytes determined (in triplicate) in spiked PM<sub>10</sub> samples, at three different concentrations. Accuracy test is also presented and it was evaluated by the ratios of the signals obtained using the optimized method here proposed and the reference method according to Alves et al., 2011.

Analyte	Recovery test			Accuracy test Optimized method/Reference method
	Mean recovery (%) (n = 3)			
	100 ng ml <sup>-1</sup>	300 ng ml <sup>-1</sup>	500 ng ml <sup>-1</sup>	
Fluorene	98 ± 16	91 ± 6	102 ± 2	0.77
9,10-phenanthrenequinone	84 ± 4	117 ± 14	97 ± 16	0.94
Phenanthrene	102 ± 9	122 ± 4	128 ± 12	1.12
Anthracene	123 ± 9	122 ± 6	125 ± 13	1.09
9,10-anthraquinone	105 ± 18	106 ± 13	100 ± 8	1.13
5-nitroacenaphthene	97 ± 18	113 ± 7	110 ± 13	1.07
Fluoranthene	110 ± 31	123 ± 21	108 ± 5	1.19
2-nitrofluorene	86 ± 6	107 ± 5	108 ± 10	1.15
Pyrene	101 ± 28	118 ± 18	111 ± 4	0.72
9-nitroanthracene	76 ± 9	92 ± 13	88 ± 10	1.11
9-nitrophenanthrene	79 ± 10	108 ± 8	93 ± 8	0.85
Retene	94 ± 20	105 ± 12	97 ± 1	0.73
Benzo[a]fluorenone	85 ± 15	106 ± 15	100 ± 12	0.79
Benzo[a]anthracene	92 ± 18	110 ± 8	106 ± 5	0.76
Chrysene	97 ± 8	101 ± 3	108 ± 7	0.72
3-nitrofluoranthene	85 ± 11	61 ± 11	74 ± 16	1.09
1-nitropyrene	82 ± 14	100 ± 3	109 ± 17	0.94
Benzo[b]fluoranthene	113 ± 17	114 ± 12	119 ± 2	0.71
Benzo[k]fluoranthene	105 ± 15	104 ± 11	111 ± 1	0.86
Benzo[e]pyrene	91 ± 24	110 ± 14	105 ± 7	0.75
Benzo[a]pyrene	90 ± 21	102 ± 12	101 ± 8	0.71
6H-benzo[cd]pyren-6-one	80 ± 9	102 ± 15	96 ± 13	0.98
Indeno-[1,2,3-cd]-pireno	92 ± 13	97 ± 13	104 ± 7	0.75
Dibenzo[a,h]anthracene	76 ± 9	90 ± 9	95 ± 5	0.89
Benzo[g,h,i]perylene	91 ± 4	106 ± 14	102 ± 5	0.73
6-nitrobenzo[a]pyrene	76 ± 7	57 ± 6	48 ± 9	0.63

(IUPAC—International Union of Pure and Applied Chemistry, 2002; Jatinder, 2005; AOAC International, 2016).

The LOD was 1.0 ng ml<sup>-1</sup> for most of the PAHs, 5.0 ng ml<sup>-1</sup> for dibenzo [a,h]anthracene and some oxy-PAHs [1,4-benzoquinone, 1,4-naphthoquinone, 1-naphthaldehyde, 6H-benzo (cd)pyren-6-one] and nitro-PAHs (9-nitroanthracene and 9-nitrophenanthrene), and 10 ng ml<sup>-1</sup> for 5-nitroacenaphthene, 2-nitrofluorene, 3-nitrofluoranthene, 1-nitropyrene, and 6-nitrobenzo [a]pyrene. The LOQ was 10 ng ml<sup>-1</sup> for all the analytes, with the exception of 5-nitroacenaphthene (50 ng ml<sup>-1</sup>). The linear working range was from 10 to 500 ng ml<sup>-1</sup> for all the analytes, with the exception of 5-nitroacenaphthene (from 50 to 500 ng ml<sup>-1</sup>). All the analytical curves presented good linearity, with linear correlation coefficients ranging from 0.990 to 0.999. All the LODs, LOQs, linear working ranges, equations, and correlation coefficients (r) are provided in **Supplementary Table S6**.

LOQs and linear correlation coefficients were not assigned for the following analytes: 1,4-benzoquinone, acetophenone, naphthalene, 1,4-naphthoquinone, acenaphthylene, acenaphthene, and 1-naphthaldehyde. These PAHs and oxy-PAHs have the lowest molecular weights of the compounds analyzed and are the most volatile. Consequently, they were probably lost during the solvent evaporation steps of the method and could not be quantified.

The relative standard deviations (RSDs) were in the ranges 1–16%, 1–19%, and 2–16% for low (100 ng ml<sup>-1</sup>), medium (300 ng ml<sup>-1</sup>), and high concentrations (500 ng ml<sup>-1</sup>), respectively (**Supplementary Table S7**). Considering that the concentrations of the analytes were low (100–500 ng ml<sup>-1</sup>) and that a variation of up to 21% is permissible at this level (AOAC International, 2016), it could be considered that the RSDs were within an acceptable range and that the optimized method presented satisfactory precision.

The accuracy of the method was assessed in two ways, by spiking/recovery assays, employing the sample matrix, and by comparison with a reference method. The mean recoveries of the compounds from the sample matrix were in the ranges 76–128% (PAHs), 80–117% (oxy-PAHs), and 48–113% (nitro-PAHs) (**Table 4**). Although the recovery range normally accepted is from 80 to 110% for analytes present in low concentrations (~100 ng ml<sup>-1</sup>), the recoveries obtained here could be considered satisfactory, since determination was made of a large number of analytes in a complex matrix, as is the case for atmospheric particulate matter (IUPAC—International Union of Pure and Applied Chemistry, 2002; AOAC International, 2016). Furthermore, in order to correct for low or high recovery of some analytes, analytical curves were constructed with standards that passed through the extraction process.

**TABLE 5** | PM mass ( $\mu\text{g m}^{-3}$ ), concentrations of PAHs, oxy-PAHs, nitro-PAHs ( $\text{pg m}^{-3}$ ), and levoglucosan ( $\text{ng m}^{-3}$ ) in the fractionated PM sample.

PM fraction Analyte	PM <sub>2.5</sub>	PM <sub>1</sub>	PM <sub>&lt; 1</sub>	Sum
PM mass ( $\mu\text{g m}^{-3}$ )	9.22	3.94	6.97	20.1
PAHs ( $\text{pg m}^{-3}$ )				
Fluorene	5	3	16	24
Phenanthrene	136	38	27	202
Anthracene	23	9	10	42
Fluoranthene	176	72	60	308
Pyrene	175	81	70	326
Retene	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
Benzo[a]anthracene	30	23	31	84
Chrysene	54	27	52	133
Benzo[b]fluoranthene	86	86	187	359
Benzo[k]fluoranthene	28	31	53	112
Benzo[e]pyrene	49	64	104	217
Benzo[a]pyrene	46	45	88	178
Indeno-[1,2,3-cd]-pyrene	44	59	199	302
Dibenzo[a,h]anthracene	4	10	25	39
Benzo[g,h,i]perylene	76	114	338	529
Sum	932	664	1,260	2,856
Oxy-PAHs ( $\text{pg m}^{-3}$ )				
9,10-phenanthrenequinone	158	118	139	415
9,10-anthraquinone	22	22	32	76
Benzo[a]fluorenone	12	8	20	41
6H-benzo[cd]pyren-6-one	39	34	146	220
Sum	231	183	337	751
Nitro-PAHs ( $\text{pg m}^{-3}$ )				
5-nitroacenaphthene	16	20	72	108
2-nitrofluorene	6	13	19	38
9-nitroanthracene	<LOQ	<LOQ	11	11
9-nitrophenanthrene	<LOQ	<LOQ	<LOQ	<LOQ
3-nitrofluoranthene	3	21	36	60
1-nitropyrene	4	7	34	44
6-nitrobenzo[a]pyrene	10	2	22	34
Sum	39	63	194	296
Levoglucosan ( $\text{ng m}^{-3}$ )	1.8	15.7	42.0	59.5

The fine fractions ( $d < 1 \mu\text{m}$ ) of two PM samples collected in parallel at the same site, using two identical low-volume samplers, were extracted according to the optimized method and the reference method. The methods were in good agreement, as shown by the ratios between the signal responses obtained for the two methods, which ranged from 0.63 to 1.19 (Table 4).

The optimized extraction method also proved to be suitable for the determination of levoglucosan at a concentration of  $1,000 \text{ ng ml}^{-1}$  (at the low end of concentrations expected for this type of sample), with a recovery of  $93 \pm 6\%$ . This showed the capacity for expanding the application range of the optimized method. The same extract used for determination of the PAHs by GC-MS could subsequently be derivatized and used for the determination of levoglucosan, also by GC-MS.

### 3.3 Application of the Method Using an Environmental Sample

In order to illustrate the application of the optimized extraction method, one outdoor PM sample collected in the city of Ribeirão Preto (São Paulo State, Brazil), using a low-volume impactor, was

extracted and analyzed. Table 5 presents the mass of each sample fraction, and the concentrations of PAHs and derivatives. It was possible to quantify the analytes in the PM fractions analyzed, at very low concentrations (on the order of  $\text{pg m}^{-3}$ ).

The sum concentrations of the PAHs and derivatives found in the present work were within the concentration ranges generally reported in the literature for Brazilian and other Latin-American cities (Souza et al., 2014; de Oliveira Alves et al., 2015; Urban et al., 2016; de Oliveira Galvão et al., 2018; Pereira et al., 2019; Ferreira et al., 2021).

The sum concentration of levoglucosan obtained here was within the lower portion of the range found for other semi-industrial cities in São Paulo State (Urban et al., 2014), but was similar to the concentrations reported for PM<sub>10</sub> samples collected in the Amazon in the wet season (de Oliveira Alves et al., 2015). A larger number of results and an environmentally relevant discussion will be presented elsewhere.

## 4 CONCLUSION

The selection of a suitable extraction method depends on a variety of factors, including the amount of available sample matrix, the expected concentration of the analytes, and the availability and cost of the instrumentation.

The extraction method proposed here for the determination of PAHs and their derivatives (nitro- and oxy-PAHs) in aerosol samples was optimized using multivariate design of experiments.

The final optimized conditions were three extractions of a membrane area of  $17.3 \text{ cm}^2$  with 4.0 ml of acetonitrile, under sonication for 34 min.

The method presented here is based on ultrasonic extraction, which is simpler and less time consuming, compared to other extraction techniques, such as Soxhlet refluxing. The new method enabled economization of 97% in the solvent volume, with no need to use dichloromethane, a potentially hazardous chemical.

The method showed good accuracy and precision, with low limits of quantification, and can be applied for the analysis of particulate matter samples collected by both high- and low-volume samplers. It is an excellent alternative to the extraction methods most commonly reported in the literature.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The original contributions presented in the study are included in the article/Supplementary Material, further inquiries can be directed to the corresponding author.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

CS, JN, GG, and RU conceived the ideas and designed the study. CS, JN, RN, NR, JC, GG, and RU conducted the experiments and the chemometric analysis. CS and JC collected samples. CS, JN, RN, JC, GG, MC, PF, and RU analyzed the data. CS and JN wrote the first draft of this



manuscript. All authors contributed to the final version and gave approval for publication.

## FUNDING

RU and MC are grateful for financial support provided by the São Paulo State Research Foundation (FAPESP, process numbers #2018/04820-6 and #2018/16554-9) and INCTAA (CNPq, process number #465768/2018-8; FAPESP, process number #2014/50951-4). This study was financed in part by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES, Finance Code 001). Student grants were provided to CS (FAPESP, #2018/17931-0), JB Neris

(CNPq), RN (CAPES), NC (FAPESP, #2020/04084-8), and JC (CAPES).

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors also thank E. R. Pereira-Filho for productive discussions.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fenvs.2021.742251/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Abbas, I., Badran, G., Verdin, A., Ledoux, F., Roumié, M., Courcot, D., et al. (2018). Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Derivatives in Airborne Particulate Matter: Sources, Analysis and Toxicity. *Environ. Chem. Lett.* 16, 439–475. doi:10.1007/s10311-017-0697-0
- Alves, C. (2005). Aerossóis atmosféricos: perspectiva histórica, fontes, processos químicos de formação e composição orgânica. *Quím. Nova* 28, 859–870. doi:10.1590/S0100-40422005000500025
- Alves, C. A., Vicente, A., Monteiro, C., Gonçalves, C., Evtuygina, M., and Pio, C. (2011). Emission of Trace Gases and Organic Components in Smoke Particles from a Wildfire in a Mixed-evergreen forest in Portugal. *Sci. Total Environ.* 409, 1466–1475. doi:10.1016/j.scitotenv.2010.12.025
- AOAC International (2016). Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. In *AOAC Official Methods of Analysis*. Editors G. W. Latimer Jr. (Rockville, MD: AOAC INTERNATIONAL), 1–18.
- Balducci, C., Cecinato, A., Paolini, V., Guerriero, E., Perilli, M., Romagnoli, P., et al. (2018). Volatilization and Oxidative Artifacts of PM Bound PAHs Collected at Low Volume Sampling (1): Laboratory and Field Evaluation. *Chemosphere* 200, 106–115. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.02.090
- Boongla, Y., Orakij, W., Nagaoka, Y., Tang, N., Hayakawa, K., and Toriba, A. (2017). Simultaneous Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Their Nitro-derivatives in Airborne Particulates by Using Two-Dimensional High-Performance Liquid Chromatography with On-Line Reduction and Fluorescence Detection. *ajae* 11, 283–299. doi:10.5572/ajae.2017.11.4.283
- de Oliveira Alves, N., Brito, J., Caumo, S., Arana, A., de Souza Hacon, S., Artaxo, P., et al. (2015). Biomass Burning in the Amazon Region: Aerosol Source Apportionment and Associated Health Risk Assessment. *Atmos. Environ.* 120, 277–285. doi:10.1016/j.atmosenv.2015.08.059
- de Oliveira Alves, N., Vessoni, A. T., Quinet, A., Fortunato, R. S., Kajitani, G. S., Peixoto, M. S., et al. (2017). Biomass Burning in the Amazon Region Causes DNA Damage and Cell Death in Human Lung Cells. *Sci. Rep.* 7, 1–13. doi:10.1038/s41598-017-11024-3
- de Oliveira Galvão, M. F., de Oliveira Alves, N., Ferreira, P. A., Caumo, S., de Castro Vasconcellos, P., Artaxo, P., et al. (2018). Biomass Burning Particles in the Brazilian Amazon Region: Mutagenic Effects of nitro and Oxy-PAHs and Assessment of Health Risks. *Environ. Pollut.* 233, 960–970. doi:10.1016/j.envpol.2017.09.068
- Delhomme, O., Herckes, P., and Millet, M. (2007). Determination of nitro-polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Atmospheric Aerosols Using HPLC Fluorescence with a post-column Derivatisation Technique. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 1953–1959. doi:10.1007/s00216-007-1562-y
- Eiguren-Fernandez, A., and Miguel, A. H. (2003). Determination of Semivolatile and Particulate Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in SRM 1649a and PM 2.5 Samples by HPLC-Fluorescence. *Polycyclic Aromatic Compd.* 23, 193–205. doi:10.1080/10406630308057
- Ferreira, R., Nunes, C., Souza, M., and Canela, M. (2021). Multivariate Optimization of Extraction Variables of PAH in Particulate Matter (PM10) in Indoor/Outdoor Air at Campos Dos Goytacazes, Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* 32, 618–625. doi:10.21577/0103-5053.20200216
- Ferreira, S. L. C., Bruns, R. E., da Silva, E. G. P., dos Santos, W. N. L., Quintella, C. M., David, J. M., et al. (2007). Statistical Designs and Response Surface Techniques for the Optimization of Chromatographic Systems. *J. Chromatogr. A* 1158, 2–14. doi:10.1016/j.chroma.2007.03.051
- Gamela, R. R., Costa, V. C., and Pereira-Filho, E. R. (2020). Multivariate Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction Procedure for the Determination of Ca, Fe, K, Mg, Mn, P, and Zn in Pepper Samples by ICP OES. *Food Anal. Methods* 13, 69–77. doi:10.1007/s12161-019-01524-5
- Gratz, L. D., Bagley, S. T., Leddy, D. G., Johnson, J. H., Chiu, C., and Stommel, P. (2000). Interlaboratory Comparison of HPLC-Fluorescence Detection and GC/MS: Analysis of PAH Compounds Present in Diesel Exhaust. *J. Hazard. Mater.* 74, 37–46. doi:10.1016/s0304-3894(99)00197-1
- Guo, H., Lee, S. C., Ho, K. F., Wang, X. M., and Zou, S. C. (2003). Particle-associated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Urban Air of Hong Kong. *Atmos. Environ.* 37, 5307–5317. doi:10.1016/j.atmosenv.2003.09.011
- Harrison, R. M. (2020). Airborne Particulate Matter. *Phil. Trans. R. Soc. A* 378, 20190319. doi:10.1098/rsta.2019.0319
- Health Effects Institute (2020). “State of Global Air 2020.”. Special Report 28.
- Hong, Y., Xu, X., Liao, D., Ji, X., Hong, Z., Chen, Y., et al. (2021). Air Pollution Increases Human Health Risks of PM2.5-bound PAHs and nitro-PAHs in the Yangtze River Delta, China. *Sci. Total Environ.* 770, 145402. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.145402
- IARC – International Agency for Research on Cancer (2010). *Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures*. Lyon, France. doi:10.1002/14356007.a04
- Idowu, O., Semple, K. T., Ramadass, K., O'Connor, W., Hansbro, P., and Thavamani, P. (2019). Beyond the Obvious: Environmental Health Implications of Polar Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environ. Int.* 123, 543–557. doi:10.1016/j.envint.2018.12.051
- IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry (2002). Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis. *Pure Appl. Chem.* 74, 835–855. doi:10.1351/pac200274050835
- ICH Harmonised Tripartite Guideline (2005). Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). *J. Pharmacol. Pharmacother.*. Available at: <https://database.ich.org/sites/default/files/Q2%28R1%29%20Guideline.pdf> (Accessed October 13, 2021).
- Joshi, D. R., and Adhikari, N. (2019). An Overview on Common Organic Solvents and Their Toxicity. *Jpri* 28, 1–18. doi:10.9734/jpri/2019/v28i330203
- Kameda, T. (2011). Atmospheric Chemistry of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Related Compounds. *J. Health Sci.* 57, 504–511. doi:10.1248/jhs.57.504
- Kelly, F. J., and Fussell, J. C. (2012). Size, Source and Chemical Composition as Determinants of Toxicity Attributable to Ambient Particulate Matter. *Atmos. Environ.* 60, 504–526. doi:10.1016/j.atmosenv.2012.06.039
- Khan, M. B., Masiol, M., Bruno, C., Pasqualetto, A., Formenton, G. M., Agostinelli, C., et al. (2018). Potential Sources and Meteorological Factors Affecting PM2.5-bound Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Levels in Six Main Cities of Northeastern Italy: an Assessment of the Related Carcinogenic and

- Mutagenic Risks. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 31987–32000. doi:10.1007/s11356-018-2841-1
- Kim, K.-H., Jahan, S. A., Kabir, E., and Brown, R. J. C. (2013). A Review of Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Their Human Health Effects. *Environ. Int.* 60, 71–80. doi:10.1016/j.envint.2013.07.019
- Liaud, C., Millet, M., and Le Calvé, S. (2015). An Analytical Method Coupling Accelerated Solvent Extraction and HPLC-Fluorescence for the Quantification of Particle-Bound PAHs in Indoor Air Sampled with a 3-stages cascade Impactor. *Talanta* 131, 386–394. doi:10.1016/j.talanta.2014.05.027
- Lim, H., Sadiktsis, I., de Oliveira Galvão, M. F., Westerholm, R., and Dreij, K. (2021). Polycyclic Aromatic Compounds in Particulate Matter and Indoor Dust at Preschools in Stockholm, Sweden: Occurrence, Sources and Genotoxic Potential *In Vitro*. *Sci. Total Environ.* 755, 142709. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.142709
- Ma, L., Li, B., Liu, Y., Sun, X., Fu, D., Sun, S., et al. (2020). Characterization, Sources and Risk Assessment of PM<sub>2.5</sub>-bound Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Nitrated PAHs (NPAHs) in Harbin, a Cold City in Northern China. *J. Clean. Prod.* 264, 121673. doi:10.1016/j.jclepro.2020.121673
- Machado, M. C. S., Loyola, J., Quiterio, S. L., Rocha, G. O. d., Andrade, J. B. d., and Arbilla, G. (2009). Particle-associated polycyclic aromatic hydrocarbons and their dry deposition fluxes from a bus-station in the Rio de Janeiro Metropolitan area, Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* 20, 1565–1573. doi:10.1590/S0103-50532009000900002
- Marques, L. F. C. S., Arbilla, G., Quiterio, S. L., and Machado, M. C. S. (2009). Particle-associated polycyclic aromatic hydrocarbons in a suburban region of Rio de Janeiro, Brazil, with industrial and traffic emissions. *J. Braz. Chem. Soc.* 20, 518–529. doi:10.1590/S0103-50532009000300017
- Nováková, Z., Novák, J., Kitanovski, Z., Kukučka, P., Smutná, M., Wietzorek, M., et al. (2020). Toxic Potentials of Particulate and Gaseous Air Pollutant Mixtures and the Role of PAHs and Their Derivatives. *Environ. Int.* 139, 105634. doi:10.1016/j.envint.2020.105634
- Ohno, T., Toriba, A., Kameda, T., Tang, N., and Hayakawa, K. (2009). Determination of 1-nitropyrene in Low Volume Ambient Air Samples by High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *J. Chromatogr. A* 1216, 4625–4628. doi:10.1016/j.chroma.2009.03.070
- Pereira, F. M. V., and Pereira-Filho, E. R. (2018). Application of Free Computational Program in Experimental Design: a Tutorial. *Quim. Nova* 41, 1061–1071.
- Pereira, G. M., Oraggio, B., Teinilä, K., Custódio, D., Huang, X., Hillamo, R., et al. (2019). A Comparative Chemical Study of PM<sub>10</sub> in Three Latin American Cities: Lima, Medellín, and São Paulo. *Air Qual. Atmos. Health* 12, 1141–1152. doi:10.1007/s11869-019-00735-3
- Pereira, P. A. d. P., Andrade, J. B. d., and Miguel, A. H. (2001). Determination of 16 Priority Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Particulate Matter by HRGC-MS after Extraction by Sonication. *Anal. Sci.* 17, 1229–1231. doi:10.2116/analsci.17.1229
- Pereira-Filho, E. R. (2015). *Planejamento fatorial em química: maximizando a obtenção de resultados*. São Carlos: EdUFSCar.
- Rodríguez-Urrego, D., and Rodríguez-Urrego, L. (2020). Air Quality during the COVID-19: PM<sub>2.5</sub> Analysis in the 50 Most Polluted Capital Cities in the World. *Environ. Pollut.* 266, 115042. doi:10.1016/j.envpol.2020.115042
- Santos, A. G., Regis, A. C. D., da Rocha, G. O., Bezerra, M. d. A., de Jesus, R. M., and de Andrade, J. B. (2016). A Simple, Comprehensive, and Miniaturized Solvent Extraction Method for Determination of Particulate-phase Polycyclic Aromatic Compounds in Air. *J. Chromatogr. A* 1435, 6–17. doi:10.1016/j.chroma.2016.01.018
- Senthil Kumar, S., Muthuselvam, P., Pugalenti, V., Subramanian, N., Ramkumar, K. M., Suresh, T., et al. (2018). Toxicoproteomic Analysis of Human Lung Epithelial Cells Exposed to Steel Industry Ambient Particulate Matter (PM) Reveals Possible Mechanism of PM Related Carcinogenesis. *Environ. Pollut.* 239, 483–492. doi:10.1016/j.envpol.2018.04.049
- Sevimoglu, O., and Rogge, W. F. (2015). Organic Compound Concentrations of Size-Segregated PM<sub>10</sub> during Sugarcane Burning and Growing Seasons at a Rural and an Urban Site in Florida, USA. *Aerosol Air Qual. Res.* 15, 1720–1736. doi:10.4209/aaqr.2015.02.0069
- Simoneit, B. R. T., Schauer, J. J., Nolte, C. G., Oros, D. R., Elias, V. O., Fraser, M. P., et al. (1999). Levoglucosan, a Tracer for Cellulose in Biomass Burning and Atmospheric Particles. *Atmos. Environ.* 33, 173–182. doi:10.1016/S1352-2310(98)00145-9
- Song, L., Liu, X., Skiba, U., Zhu, B., Zhang, X., Liu, M., et al. (2018). Ambient Concentrations and Deposition Rates of Selected Reactive Nitrogen Species and Their Contribution to PM<sub>2.5</sub> Aerosols at Three Locations with Contrasting Land Use in Southwest China. *Environ. Pollut.* 233, 1164–1176. doi:10.1016/j.envpol.2017.10.002
- Souza, K. F., Carvalho, L. R. F., Allen, A. G., and Cardoso, A. A. (2014). Diurnal and Nocturnal Measurements of PAH, nitro-PAH, and Oxy-PAH Compounds in Atmospheric Particulate Matter of a Sugar Cane Burning Region. *Atmos. Environ.* 83, 193–201. doi:10.1016/j.atmosenv.2013.11.007
- Sun, C., Qu, L., Wu, L., Wu, X., Sun, R., and Li, Y. (2020). Advances in Analysis of Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Various Matrices. *Trac Trends Anal. Chem.* 127, 115878. doi:10.1016/j.trac.2020.115878
- Turap, Y., Talifu, D., Wang, X., Aierken, T., Rekefu, S., Shen, H., et al. (2018). Concentration Characteristics, Source Apportionment, and Oxidative Damage of PM<sub>2.5</sub>-bound PAHs in Petrochemical Region in Xinjiang, NW China. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 25, 22629–22640. doi:10.1007/s11356-018-2082-3
- Urban, R. C., Alves, C. A., Allen, A. G., Cardoso, A. A., and Campos, M. L. A. M. (2016). Organic Aerosols in a Brazilian Agro-Industrial Area: Speciation and Impact of Biomass Burning. *Atmos. Res.* 169, 271–279. doi:10.1016/j.atmosres.2015.10.008
- Urban, R. C., Alves, C. A., Allen, A. G., Cardoso, A. A., Queiroz, M. E. C., and Campos, M. L. A. M. (2014). Sugar Markers in Aerosol Particles from an Agro-Industrial Region in Brazil. *Atmos. Environ.* 90, 106–112. doi:10.1016/j.atmosenv.2014.03.034
- Urban, R. C., Lima-Souza, M., Caetano-Silva, L., Queiroz, M. E. C., Nogueira, R. F. P., Allen, A. G., et al. (2012). Use of Levoglucosan, Potassium, and Water-Soluble Organic Carbon to Characterize the Origins of Biomass-Burning Aerosols. *Atmos. Environ.* 61, 562–569. doi:10.1016/j.atmosenv.2012.07.082
- USEPA - United States Environmental Protection Agency (2007). *Method 3550C - Ultrasonic Extraction*. Washington, DC: US Government Printing Office, 1–17. Available at: <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-12/documents/3550c.pdf> (Accessed October 13, 2021).
- Van Drooge, B. L., and Ballesta, P. P. (2009). Seasonal and Daily Source Apportionment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Concentrations in PM<sub>10</sub> in a Semirural European Area. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7310–7316. doi:10.1021/es901381a
- van Drooge, B. L., Prats, R. M., Reche, C., Minguiñón, M., Querol, X., Grimalt, J. O., et al. (2018). Origin of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Other Organic Pollutants in the Air Particles of Subway Stations in Barcelona. *Sci. Total Environ.* 642, 148–154. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.06.032
- Zhang, Q., Liu, P., Li, S., Zhang, X., and Chen, M. (2020a). Progress in the Analytical Research Methods of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). *J. Liquid Chromatogr. Relat. Tech.* 43, 425–444. doi:10.1080/10826076.2020.1746668
- Zheng, M., Yan, C., and Zhu, T. (2020b). Understanding Sources of fine Particulate Matter in China. *Phil. Trans. R. Soc. A* 378, 20190325. doi:10.1098/rsta.2019.0325

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2021 Scaramboni, Neris, do Nascimento, Chiaranda da Rosa, Carvalho, Grosseli, Campos, Fadini and Urban. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

**APÉNDICE D**

---

---



## Reactive oxygen species-dependent transient induction of genotoxicity by retene in human liver HepG2 cells

Caroline Scaramboni<sup>a,e,\*</sup>, Maria Lucia Arruda Moura Campos<sup>a</sup>, Daniel Junqueira Dorta<sup>a,c</sup>,  
Danielle Palma de Oliveira<sup>b,c</sup>, Silvia Regina Batistuzzo de Medeiros<sup>d</sup>,  
Marcos Felipe de Oliveira Galvão<sup>e</sup>, Kristian Dreij<sup>e,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP 14040-903, Brazil

<sup>b</sup> School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP 14040-903, Brazil

<sup>c</sup> National Institute for Alternative Technologies of Detection, Toxicological Evaluation and Removal of Micropollutants and Radioactives (INCT-DATREM), Araraquara, SP, Brazil

<sup>d</sup> Department of Cell Biology and Genetics, Biosciences Center, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

<sup>e</sup> Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Box 210, SE-171 77 Stockholm, Sweden

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Biomass burning  
Polycyclic aromatic hydrocarbons  
Oxidative stress  
ROS

### ABSTRACT

Retene is a polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) emitted mainly by biomass combustion, and despite its ubiquity in atmospheric particulate matter (PM), studies concerning its potential hazard to human health are still incipient. In this study, the cytotoxicity and genotoxicity of retene were investigated in human HepG2 liver cells. Our data showed that retene had minimal effect on cell viability, but induced DNA strand breaks, micronuclei formation, and reactive oxygen species (ROS) formation in a dose- and time-dependent manner. Stronger effects were observed at earlier time points than at longer, indicating transient genotoxicity. Retene activated phosphorylation of Checkpoint kinase 1 (Chk1), an indicator of replication stress and chromosomal instability, which was in accordance with increased formation of micronuclei. A protective effect of the antioxidant *N*-acetylcysteine (NAC) towards ROS generation and DNA damage signaling was observed, suggesting oxidative stress as a key mechanism of the observed genotoxic effects of retene in HepG2 cells. Altogether our results suggest that retene may contribute to the harmful effects caused by biomass burning PM and represent a potential hazard to human health.

### 1. Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) comprise a class of organic compounds released to the environment during incomplete combustion of organic material (Kim et al., 2013). Biomass burning, such as indoor firewood burning and wildfires, accounts for a high proportion of the global total atmospheric emissions of PAHs (Zhang et al., 2022). The presence of PAHs in the atmosphere is of great concern due to their mutagenic and carcinogenic potential (Turner et al., 2020).

Although hundreds of PAHs are currently known, most air quality and human biomonitoring studies focus on 16 priority compounds listed by the United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA) in the 1970s (Keith, 2014). The list was based on the occurrence of PAHs in the environment, their toxicity, and on the availability of analytical standards and methods at the time, but its present relevance has been

questioned by several authors (Andersson and Achten, 2015; Samburova et al., 2017; da Silva Junior et al., 2021a).

Retene (1-methyl-7-isopropylphenanthrene, Fig. 1) is an alkylated PAH that is not included in the list of 16 priority PAHs but has been used as a marker for biomass burning since the 1980s when it was reported as a thermal degradation product of abietic acid present in the resin of conifers (Ramdahl, 1983). Retene is the most abundant PAH found in atmospheric particulate matter (PM) collected at the Brazilian Amazon deforestation arc (de Oliveira Alves et al., 2011; de Oliveira Alves et al., 2014; de Oliveira Alves et al., 2015), at sugarcane-producing regions impacted by crop fires (Urban et al., 2016), and during wildfires in Portugal (Alves et al., 2011; Vicente et al., 2012, 2017). High levels of retene are also found during forest fire events (Yu et al., 2019). Additionally, retene has been used as a marker of residential wood-burning in urban areas, particularly during winter (Li et al., 2009; Krūmal et al.,

\* Corresponding authors at: Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Box 210, SE-171 77 Stockholm, Sweden.

E-mail addresses: [carolinesc@usp.br](mailto:carolinesc@usp.br) (C. Scaramboni), [kristian.dreij@ki.se](mailto:kristian.dreij@ki.se) (K. Dreij).

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2023.105628>

Received 7 March 2023; Received in revised form 24 May 2023; Accepted 8 June 2023

Available online 9 June 2023

0887-2333/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

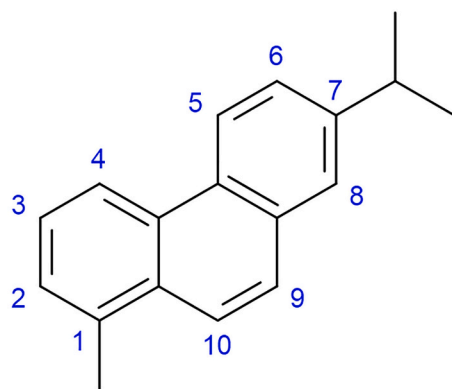


Fig. 1. Chemical structure of retene.

2017). Although biomass burning is the primary source of retene, coal combustion is a relevant source of this compound in indoor PM (Cui et al., 2022).

Besides being an atmospheric contaminant, retene has been associated with liquid effluents from pulp and paper mills, and sediments downstream of these industries, as it can be produced by anaerobic biotransformation of resin acids (Dahl et al., 2019). In this context, most studies related to the toxicity of retene are ecotoxicological assessments using aquatic organisms. Retene affects liver and heart functions of rainbow trout and zebrafish in early life stages (Scott et al., 2011; Rigaud et al., 2020; Wilsson et al., 2022) and induces genotoxicity in adult zebrafish, sea bass, and European eel (Gravato and Santos, 2002; Maria et al., 2005; da Silva Junior et al., 2021b). The cardiotoxicity of retene in fish has been linked to its strong antagonistic activity to the aryl hydrocarbon receptor (Scott et al., 2011). Although there are several studies on the aquatic ecotoxicity of retene, studies concerning its effects on humans are still incipient, despite its ubiquity in biomass burning PM.

In the context of new approach methodologies (NAMs) for toxicity testing, *in silico* and *in vitro* approaches stand out as alternatives to animal use. Currently, few studies have applied quantitative structure-activity relationship (QSAR) models to assess the genotoxicity, mutagenicity, and carcinogenicity of retene (Gbeddy et al., 2020), and more such studies are warranted (da Silva Junior et al., 2021a). Regarding *in vitro* testing, no mutagenic activity was detected in *Salmonella Typhimurium* strains TA98, TA97a, TA100, and TA102 (base-substitution, frameshift mutation, transition mutation, and transversion mutation strains), with and without metabolic activation (Møller et al., 1985; Peixoto et al., 2019). In mammalian systems, studies with human A549 lung cancer cells indicated that retene caused DNA damage, increased micronuclei frequency and promoted cell death and oxidative stress (de Oliveira Alves et al., 2017; Peixoto et al., 2019). In a study with human SK-N-SH neuroblastoma cells, retene mainly caused effects related to oxidative stress: increased levels of reactive oxygen species (ROS), decreased mitochondrial membrane potential, increased lipid peroxidation, and up-regulated oxidative stress-responsive genes (Sarma et al., 2017).

Since most PAHs exert their toxic effects after being metabolized to more reactive and electrophilic intermediates, it is of interest to assess the effects of retene using a more metabolic-competent cell line. Human hepatocarcinoma HepG2 cells express several phase I- and phase II-metabolizing enzymes and are capable of activating PAHs and other mutagens (Knasmüller et al., 1998) and suggested as a good model to study the toxicity of environmental chemicals (Jarvis et al., 2013). In addition, HepG2 cells are applied as a cell model for developing relative potency factors (RPF) to estimate the carcinogenic potential of single PAHs and complex environmental mixtures (Dreij et al., 2017; Kopp et al., 2018; de Oliveira Galvão et al., 2022). To the best of our knowledge, no previous studies have investigated the toxic effects of retene in

HepG2 cells. Therefore, the aim of this study was to assess the *in vitro* cytotoxicity and genotoxicity of retene using HepG2 cells. To better understand the role of oxidative stress in the genotoxicity of retene in this type of cells, we also investigated intracellular levels of ROS and the protective effect of antioxidant towards ROS generation and DNA damage signaling.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemicals and reagents

Retene (97%, CAS No. 483–65–8) was obtained from SPEX CertiPrep (Metuchen, NJ), and benzo[*a*]pyrene (B[*a*]P,  $\geq 96\%$ , CAS No. 50–32–8) from Sigma-Aldrich (Stockholm, Sweden). Sterile dimethyl sulfoxide (DMSO,  $>99.7\%$ ) was purchased from Merck KGaA (Darmstadt, Germany). Cell culture reagents were supplied by Gibco (Life Technologies, Stockholm, Sweden). Antibodies used for Western blotting were anti-phospho-Chk1 (Ser317; pChk1) and anti-phospho-H2AX (Ser139;  $\gamma$ H2AX) from Cell Signaling Technology (Beverly, MA), and Cdk2 (M2) and secondary anti-rabbit antibodies from Santa Cruz (Santa Cruz, CA).

### 2.2. Cell culture and retene exposure

Human-derived hepatocellular carcinoma cells (HepG2) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC, HB-8065, Rockville, MD). Cells were grown in Minimal Essential Medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1 mmol/L sodium pyruvate, 0.1 mmol/L nonessential amino acids, 100 units/mL penicillin and 0.1 mg/mL streptomycin and maintained at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. The stock solution of retene was prepared by gentle evaporation of the original solvent with dry N<sub>2</sub>(g) until completely dry and then redissolved in DMSO. The retene concentration was determined by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GCMS-QP2010, Shimadzu) or by spectrophotometry ( $\epsilon = 14996 \text{ L/mol/cm}$ ,  $\lambda = 300 \text{ nm}$ ; Marzooghi, 2016) using a Cary 60 UV–Vis spectrophotometer (Agilent Technologies). The exposures used in this study ranged from 0.01 to 10  $\mu\text{mol/L}$  and were selected considering the average concentration of retene in the PM collected at the sugarcane region (11 ng/m<sup>3</sup>; Urban et al., 2016), the daily average volume of air breathed by an adult (16 m<sup>3</sup>/day; US-EPA, 2011), an alveolar deposition rate of 20% (Heyder, 2004), and the volume of media used in the treatments (200  $\mu\text{L}$  to 5 mL, depending on the assay). This range was also within the concentration range used in the previous studies with A549 cells (3.3 to 30 ng/mL, *i.e.*, 0.01 to 0.13  $\mu\text{mol/L}$ ) (de Oliveira Alves et al., 2017; Peixoto et al., 2019) and SK-N-SH cells (1.25 to 40  $\mu\text{mol/L}$ ) (Sarma et al., 2017). DMSO was also used to dissolve B[*a*]P and other positive controls, and it was used as negative control (NC) in all assays. The final DMSO concentration in the medium did not exceed 1.0% (v/v).

To determine whether the generation of ROS is an important mechanism of the genotoxic effect of retene, HepG2 cells were pre-treated with *N*-acetylcysteine (NAC, Sigma), which is a cell-permeable antioxidant involved in the induction of glutathione synthesis and scavenging of ROS (Shang et al., 2014). NAC was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) and filtered (0.2  $\mu\text{m}$ ) before use. Cells were treated with 2 mmol/L NAC for 1 h before exposure to retene.

### 2.3. MTT assay

The MTT assay measures metabolic activity of cells to reduce MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) to a formazan salt and is widely used to assess cell viability (Mosmann, 1983). HepG2 cells ( $5 \times 10^4$ /well) were plated in 96-well plates (Corning Inc., Corning, NY) and incubated for 24 h before exposure. Cells were exposed to retene for 24, 48 and 72 h. DMSO and carbonyl cyanide-3-chlorophenylhydrazone (CCCP, 10  $\mu\text{mol/L}$ ) were used as negative and positive controls, respectively. Following exposure, cells



were incubated with MTT solution (0.5 mg/mL) in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) without phenol red for 3 h. The produced formazan salt was dissolved in DMSO, and plates were analyzed spectrophotometrically at 570 nm (SpectraMax i3x, Molecular Devices).

#### 2.4. Comet assay

DNA strand breaks were detected using the alkaline comet assay according to the protocol described by Tice et al. (2000). HepG2 cells ( $1 \times 10^6$ /well) were plated in 12-well plates (Corning Inc., Corning, NY) and incubated for 24 h before exposure. Cells were exposed to retene for 4 and 24 h. DMSO and methyl methanesulfonate (MMS, 0.13  $\mu\text{mol/L}$ , for 3 h) were used as negative and positive controls, respectively. Nucleoids were visualized using a fluorescence microscope Olympus Bx50 (Olympus America INC), and tail intensity (DNA percentage in the comet tail) was measured using the Comet assay IV software (Perspectives, UK).

#### 2.5. Cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay

The genomic instability biomarkers micronuclei (MN), nuclear buds (NB) and nucleoplasmic bridges (NPB) were assessed by the CBMN assay, according to the guideline by OECD (2016). HepG2 cells ( $5 \times 10^6$ ) were seeded in 25  $\text{cm}^2$  flasks (Corning Inc., Corning, NY) and incubated for 24 h before exposure. Cells were exposed to retene for 20 h. DMSO and methyl methanesulfonate (MMS, 0.13  $\mu\text{mol/L}$ ) were used as negative and positive controls, respectively. After exposure, the treatment media was removed, cells were washed with PBS and incubated with fresh medium containing cytochalasin B (3  $\mu\text{g/mL}$ , Sigma-Aldrich) for additional 28 h. Next, cold sodium citrate 1% solution was added to cell suspensions, which were posteriorly fixed with methanol:acetic acid solution (3:1, v/v) and added on pre-cleaned slides (Deckgläser, Germany). Cells were stained with a 5% Giemsa solution (Merck) for analysis using optical microscopy. Mononuclear and multi-nuclear cells were scored to calculate the Nuclear Division Index (NDI), and the numbers of MN, NB and NPB in 2000 binucleated cells were determined for each condition.

#### 2.6. Micronucleus assay by flow cytometry

Micronuclei, hypodiploid nuclei, apoptotic and mid-to-late necrotic cells were assessed by flow cytometry, according to the method described by Vallabani et al. (2022). HepG2 cells ( $6 \times 10^4$ /well) were seeded in 24-well plates (Corning Inc., Corning, NY) and incubated for 24 h before exposure. Cells were exposed to retene for 72 h, corresponding to 2–3 normal doubling periods of HepG2 cells (Le Bihan et al., 2016). DMSO and etoposide (1.0  $\mu\text{mol/L}$ ) were used as negative and positive controls, respectively. Cells were acquired on a BD Accuri™ C6 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) flow cytometer. In total, 10,000 gated nuclei were acquired per sample and data analysis was performed using the BD Accuri™ C6 Software.

#### 2.7. Western blotting

Levels of phosphorylated checkpoint kinase 1 (Chk1) and H2AX histone were determined using Western blotting as previously described (de Oliveira Galvão et al., 2022). HepG2 cells ( $3 \times 10^5$ /well) were plated in 6-well plates (Corning Inc., Corning, NY) and incubated for 24 h before exposure. Cells were exposed to retene for 4, 12, 24 and 48 h. DMSO was used as the negative control and B[a]P (3  $\mu\text{mol/L}$ ) was used as positive control. Dose-response curves of Chk1 and H2AX phosphorylation were based on exposure with eight different concentrations of retene for 48 h using GraphPad Prism 8 (GraphPad Inc.).

#### 2.8. ROS formation

Mitochondrial superoxide production was measured using the MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator (M36008, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) as previously described by Barron Cuenca et al. (2022). HepG2 cells ( $1 \times 10^4$ /well) were plated in 96-well plates (Corning Inc., Corning, NY) and incubated for 24 h before exposure. Cells were exposed to retene for 4, 12, 24, 48 and 72 h. DMSO and B[a]P (1.5  $\mu\text{mol/L}$ ) were used as negative and positive controls, respectively. Fluorescence intensity was measured using a Tecan Infinite F 200 microplate reader and normalized to protein concentrations by Bradford assay.

#### 2.9. Statistical analysis

All data are presented as mean values  $\pm$  standard error (SE) of at least three independent experiments. Differences between dose groups and negative control were tested for significance ( $p < 0.05$ ) using one- or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's multiple comparison test. Differences between positive and negative controls were tested for significance ( $p < 0.05$ ) using unpaired *t*-test. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism (GraphPad Inc.).

### 3. Results

#### 3.1. Minimal reduction of cell viability

MTT assay was used to determine HepG2 viability following retene exposure. Cell viability decreased in a dose-dependent manner after 24 h of exposure, reaching a decrease of 24% at 10  $\mu\text{mol/L}$  ( $p < 0.0001$ ; Fig. 2A). After 48 h of exposure, a clear dose dependence was no longer observed (Fig. 2B), and after 72 h the viability did not change significantly at any concentration tested compared to the negative control (Fig. 2C). Although the reduction on cell viability was significant for some concentrations at 24 and 48 h, the viability range was within 76–99% for all experiments, which indicates that retene is non-cytotoxic to HepG2 at the concentrations tested.

#### 3.2. Increase of DNA damage and chromosomal instability

The induction of DNA strand breaks by retene in HepG2 cells was evaluated using the comet assay. Concentration-dependent DNA damage was observed 4 h post-exposure, with a significant 2- to 3-fold increase at 0.5 and 1.0  $\mu\text{mol/L}$  compared to the negative control ( $p < 0.05$ –0.001; Fig. 3A), respectively. However, the DNA damage was not persistent as tail intensity averages decreased and were not significantly different from the negative control at any concentrations tested after 24 h of exposure (Fig. 3A).

The impact of retene on the chromosomal integrity of HepG2 cells was assessed by two approaches: CBMN assay scored by microscopy and the flow cytometry-based MN assay. For the CBMN method, retene significantly increased the frequency of MN and NB at the highest concentration by 1.8- and 3.3-fold ( $p < 0.05$ –0.01) compared to the negative control, respectively (Fig. 3B). No effects on the frequency of NPB were observed.

In addition to the quantification of MN and hypodiploid (HD) nuclei frequency, the flow cytometry-based scoring allows for determination of apoptotic and mid-to-late necrotic cells. Exposure to retene did not increase the number of apoptotic and necrotic cells compared to the negative control (Fig. S1), corroborating the MTT assay results. A concentration-dependent increase in MN and HD was observed, however, this increase was not significant compared to the negative control, due to high variation of the data (Fig. S1).

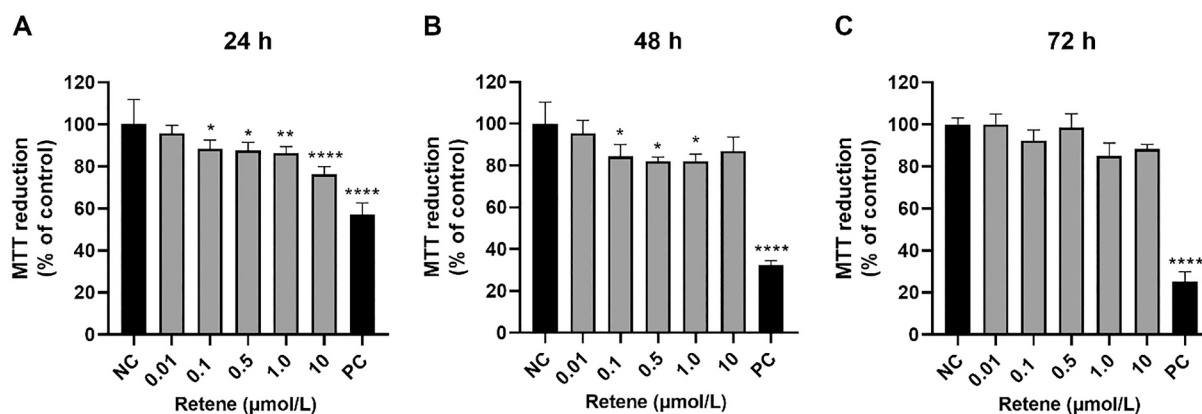


Fig. 2. Percentage of MTT reduction by HepG2 cells after exposure to retene at different concentrations for (A) 24, (B) 48 and (C) 72 h. CCCP (10  $\mu\text{mol/L}$ ) was used as a positive control (PC). Data represent mean  $\pm$  SE ( $n \geq 3$ ) with \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$  as compared to the DMSO control (NC).

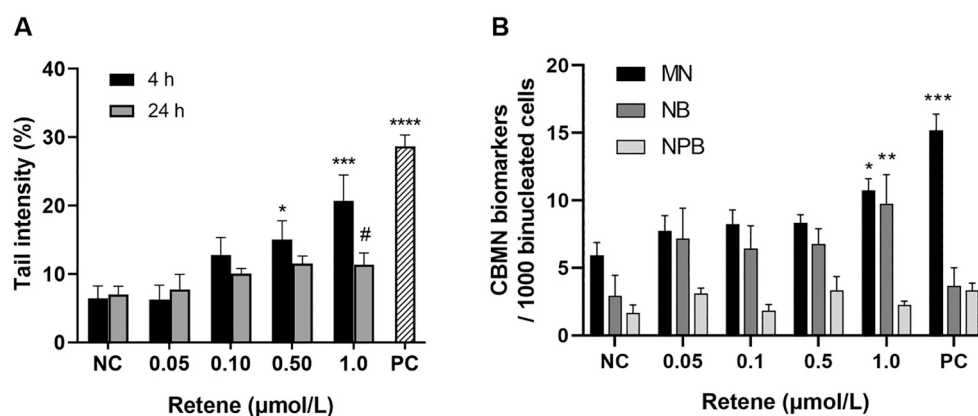


Fig. 3. (A) Tail intensity of HepG2 nucleoids after exposure to retene for 4 and 24 h assessed by comet assay. (B) Frequency of micronucleus (MN), nuclear buds (NB) and nucleoplasmic bridges (NPB) in HepG2 cells exposed to retene for 48 h assessed by CBMN assay. MMS (0.13  $\mu\text{mol/L}$ ) was used as a positive control (PC). Data represent mean  $\pm$  SE ( $n = 3$ ). Columns with (\*) were statistically different from the DMSO control (NC; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ). Column with (#) was statistically different from the respective dose at 4 h (# $p < 0.05$ ).

### 3.3. No clear concentration-dependent activation of DNA damage signaling

The formation of DNA damage triggers the recruitment of signaling and DNA repair proteins. Cells were exposed to up to 10  $\mu\text{mol/L}$  of retene for 48 h, and levels of phosphorylated Chk1 at Ser317 (pChk1) and H2AX at Ser139 ( $\gamma\text{H2AX}$ ) were determined by western blotting. Retene did not significantly induce pChk1 and  $\gamma\text{H2AX}$  levels compared to negative control (Fig. 4). Comparing the results with previous data for the highly potent carcinogenic PAHs dibenzo[*a,l*]pyrene (DB[*a,l*]P) and B[*a*]P and the non-carcinogenic PAH phenanthrene from our lab using the same methodology, showed that the effect of retene was similar to phenanthrene and much less potent than DB[*a,l*]P and B[*a*]P (Dreij et al., 2017; de Oliveira Galvão et al., 2022). Because the effect of retene on pChk1 and  $\gamma\text{H2AX}$  was below 2-fold, data were not appropriate for modeling, and it was not possible to calculate a relative potency factor (RPF) for retene.

### 3.4. Induction of DNA damage signaling in a time- and concentration-dependent manner

To further investigate the time-dependency of the DNA damage signaling induced by retene, we assessed the activation levels of pChk1 and  $\gamma\text{H2AX}$  at time points earlier than 48 h. For all concentrations tested, pChk1 levels at 4 h were similar to the negative control (Fig. 5A). However, at 12 and 24 h after exposure pChk1 levels significantly increased 2.4-fold at the concentration of 10  $\mu\text{mol/L}$  ( $p < 0.001$ – $0.0001$ ) and 1.8-fold in response to 1  $\mu\text{mol/L}$  ( $p < 0.01$ ). For all concentrations, a decrease in activation was observed at 48 h, suggesting that the DNA

damage was repaired.  $\gamma\text{H2AX}$  displayed a different time- and concentration-dependent pattern of activation (Fig. 5B).  $\gamma\text{H2AX}$  levels increased above 2-fold in response to all concentrations of retene after 4 h of exposure ( $p = 0.06$ – $0.13$ ). At 12 h, all tested concentrations significantly induced  $\gamma\text{H2AX}$  levels with a maximum of 2.9-fold in response to 1  $\mu\text{mol/L}$  ( $p < 0.05$ – $0.01$ ). In contrast to pChk1, this was followed by a decline of  $\gamma\text{H2AX}$  already at 24 h. Notably, the highest concentration of retene did not induce the strongest response of  $\gamma\text{H2AX}$  at 12 h, but at 24 and 48 h, compared to the other concentrations. These results support the above-presented early and transient induction of DNA strand breaks (Fig. 3A) and the lack of a concentration-dependent DNA damage response at 48 h (Fig. 4).

### 3.5. Increase of mitochondrial superoxide production at short exposure

DNA damage can be induced as a result of an attack by reactive oxygen species (ROS) formed during the metabolism of chemicals. Therefore, we evaluated the generation of intracellular ROS by retene using the MitoSOX assay. The lowest concentration of retene (0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) did not significantly induce ROS production at any of the time points studied (Fig. 6). For the higher concentrations, a clear time-dependency of ROS production was observed, with higher induction at early time intervals (4 and 12 h), reaching up to 1.9-fold at 12 h and 10  $\mu\text{mol/L}$  ( $p < 0.01$ ), then decreasing at later time intervals (Fig. 6).

### 3.6. ROS-dependent induction of DNA damage signaling

The induction of ROS production corroborated with the genotoxicity results, with early but transient induction of effects after exposure to

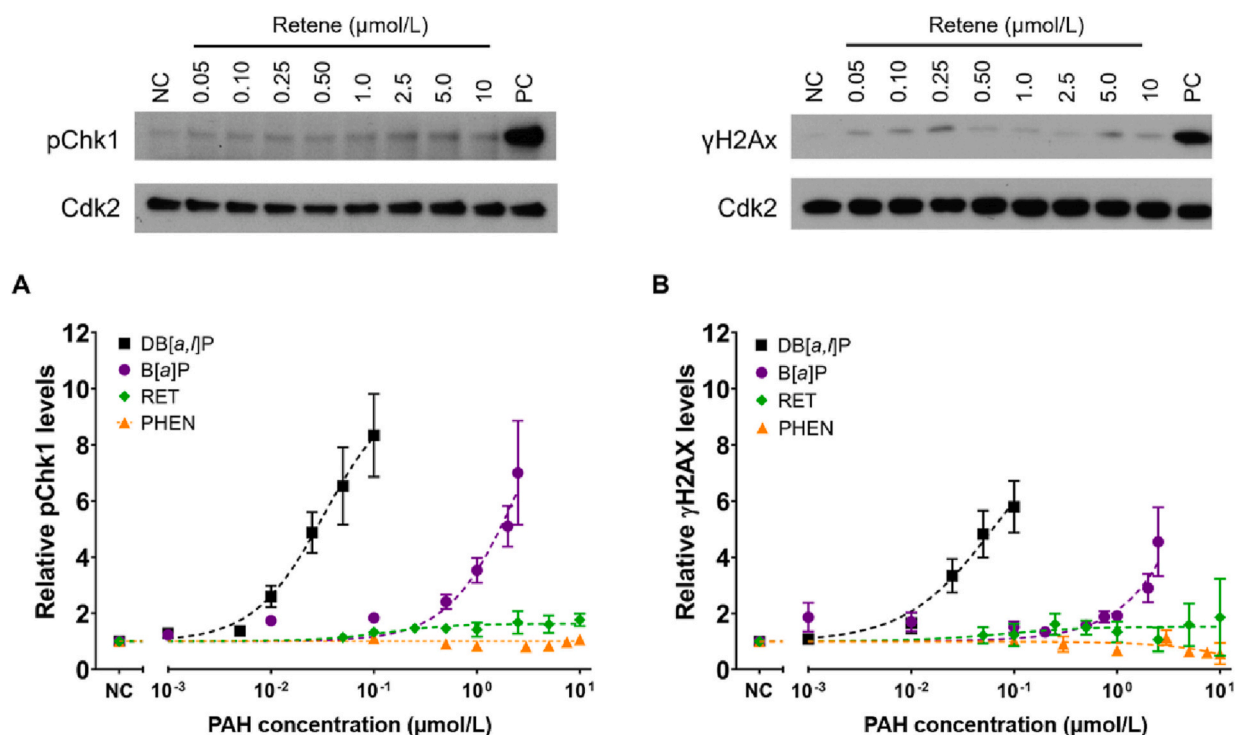


Fig. 4. Concentration-response curves based on levels of (A) pChk1 and (B)  $\gamma$ H2AX in HepG2 cells exposed to retene (RET) for 48 h. Data represent mean  $\pm$  SE ( $n \geq 3$ ). Data for DB[a,l]P, B[a]P, and phenanthrene (PHEN) were obtained from Dreij et al. (2017) and de Oliveira Galvão et al. (2022). Representative blots are shown at the top. B[a]P 3  $\mu$ mol/L was used as positive control (PC). NC = DMSO control. Cdk2 was used as loading control.

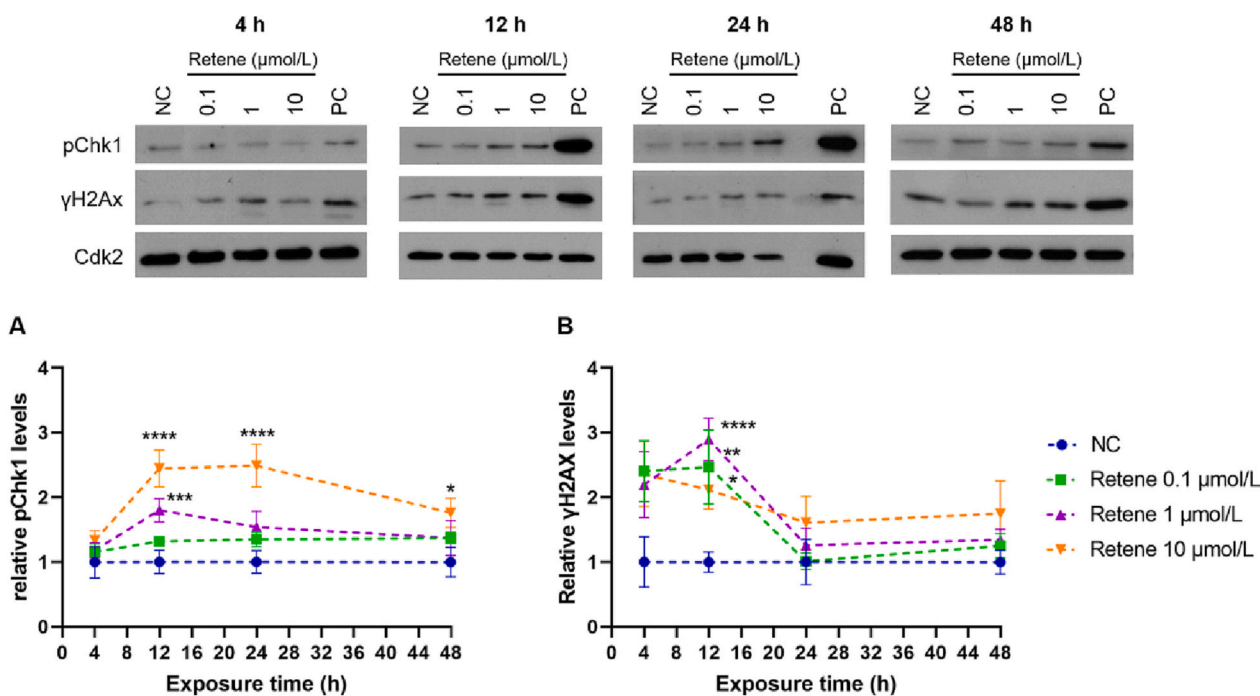


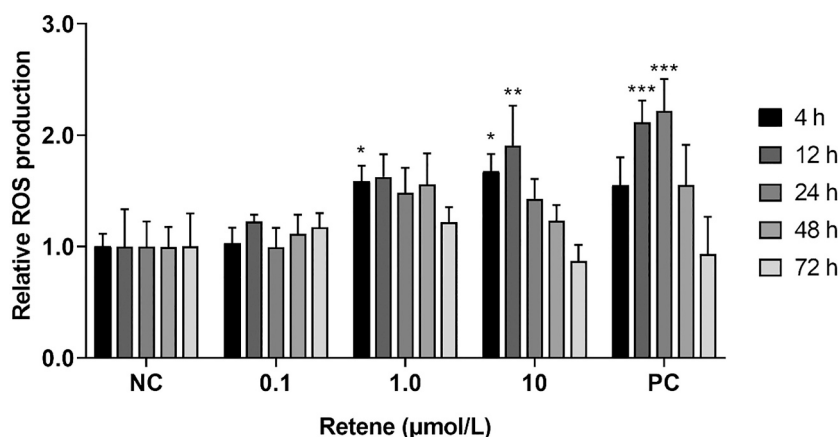
Fig. 5. Levels of (A) pChk1 and (B)  $\gamma$ H2AX measured by western blot in HepG2 cells after different intervals of exposure to retene at different concentrations. Representative blots are shown at the top. B[a]P 3  $\mu$ mol/L was used as a positive control (PC). Cdk2 was used as loading control. Data represent mean  $\pm$  SE ( $n \geq 3$ ) with \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  as compared to the DMSO control (NC).

retene. To further investigate if oxidative stress mediated the DNA damage caused by retene, we pretreated cells with NAC followed by exposure to retene and assessed the levels of ROS, pChk1 and  $\gamma$ H2AX. Results showed that pretreatment of the cells with NAC reduced ROS levels close to the negative control levels at 4 and 12 h (Fig. S2). The

time point chosen for western blotting was 12 h, as the highest ROS induction and DNA damage signaling levels were observed at this time interval.

Pre-treatment with NAC significantly reduced the levels of pChk1 of cells exposed to 1.0 and 10  $\mu$ mol/L of retene ( $p < 0.05$ –0.0001) to





**Fig. 6.** Relative ROS production assessed by MitoSOX assay in HepG2 cells exposed to retene at different concentrations for 4, 12, 24, 48 and 72 h. B[a]P (1.5  $\mu\text{mol/L}$ ) was used as a positive control (PC). Data represent mean  $\pm$  SE ( $n \geq 3$ ) with \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$  as compared to the DMSO control (NC).

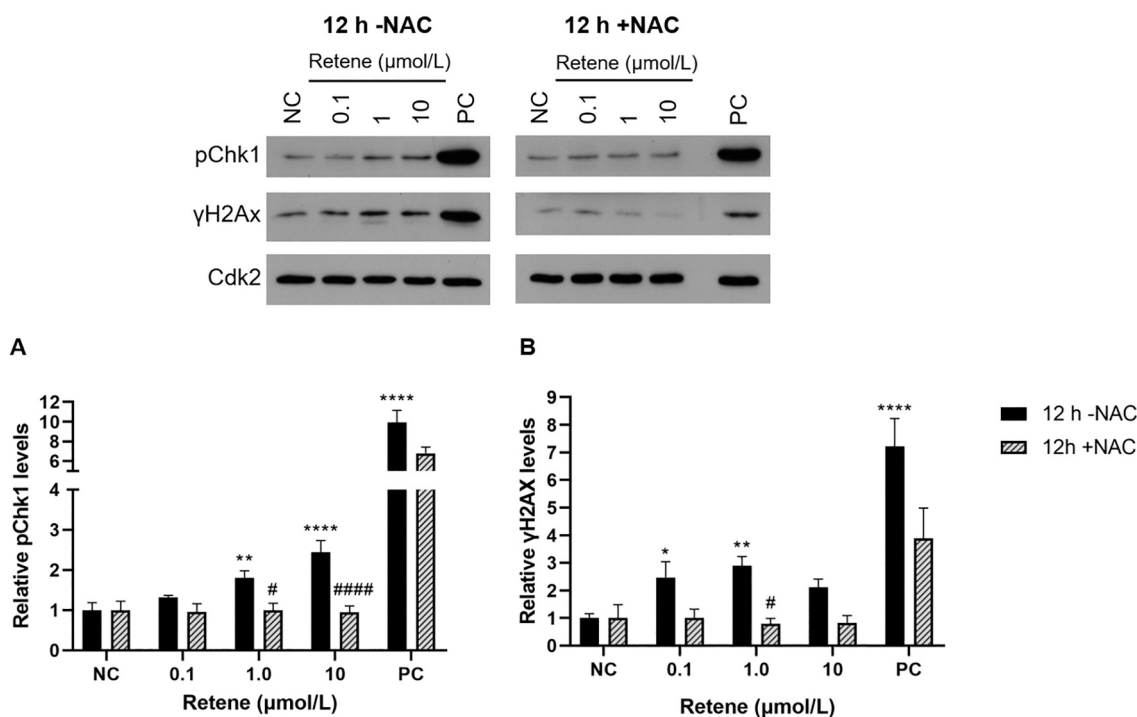
negative control levels (Fig. 7A). Similarly, the levels of  $\gamma\text{H2AX}$  were reduced to negative control levels in the presence of NAC, with a significant reduction at 1.0  $\mu\text{mol/L}$  of retene ( $p < 0.05$ ) (Fig. 7B). When the cells were exposed to B[a]P 3  $\mu\text{mol/L}$  (positive control) in the presence of NAC, levels of pChk1 and  $\gamma\text{H2AX}$  partially decreased by 32% and 46%, respectively. These results confirmed a ROS-dependent induction of DNA damage signaling in response to retene.

#### 4. Discussion

Studying the toxicity of retene is of particular importance since this alkyl-PAH is present at high concentrations in PM emitted by biomass burning and, despite its abundance, few data have so far been reported regarding its potential hazard to human health. Here, we aimed at

evaluating the toxicity of retene in HepG2 human liver cells, which have higher metabolic capacity than the cell lines previously used (de Oliveira Alves et al., 2017; Peixoto et al., 2019; Sarma et al., 2017). Our data showed that retene had minimal effect on cell viability, indicating that retene was non-cytotoxic to HepG2 cells at the concentrations tested. However, an early and transient effect was observed for the induction of genotoxicity, DNA damage signaling, and ROS formation, as summarized in Fig. 8.

These results differ from what was observed in studies using A549 lung cells, in which retene reduced cell viability only after 72 h of exposure, increased DNA strand breaks after 24 h of exposure and induced ROS production after 24 and 72 h of exposure (de Oliveira Alves et al., 2017; Peixoto et al., 2019). In these studies, the highest concentration used was 30 ng/mL, which corresponds to the concentration of



**Fig. 7.** Levels of (A) pChk1 and (B)  $\gamma\text{H2AX}$  measured by western blot in HepG2 cells in response to retene alone (-NAC) or in combination with pretreatment of 2 mmol/L NAC (+NAC). Representative blots are shown at the top. B[a]P (3  $\mu\text{mol/L}$ ) was used as a positive control (PC). Cdk2 was used as loading control. Data represent mean  $\pm$  SE ( $n \geq 3$ ). Data with (\*) were statistically different from DMSO control (NC; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ). Data with (#) were statistically different from the respective dose of retene alone (# $p < 0.05$ , ### $p < 0.0001$ ).

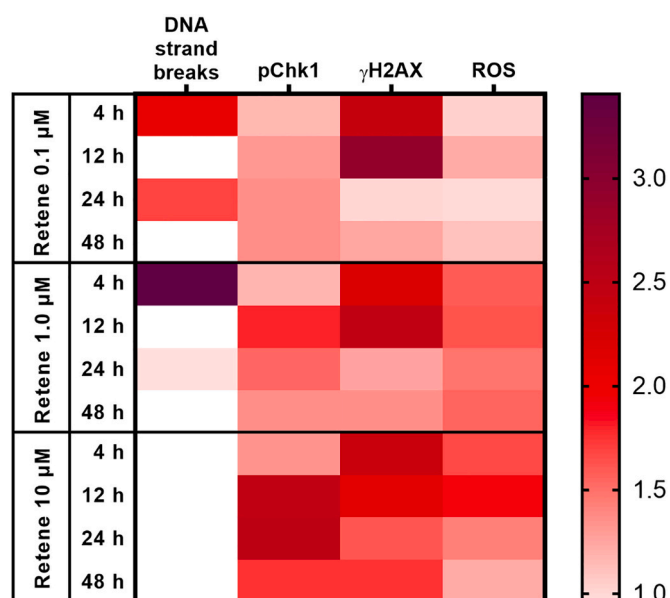


Fig. 8. Heatmap of genotoxicity, DNA damage signaling, and ROS formation in HepG2 cells exposed to three different concentrations of retene at different time points normalized to the negative control (fold-change). Dark red and purple colors indicate higher induction (above 2-fold) and light red colour indicates lower induction (below 2-fold). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

0.1 µmol/L used in this work. Herein, most effects were more evident at higher concentrations *i.e.*, 1.0 and 10 µmol/L, suggesting that A549 cells are more sensitive to retene exposure than HepG2 cells. Additionally, for MN formation, concentrations of 0.05 and 0.1 µmol/L of retene increased MN frequency by 1.7- and 2.2-fold in A549 cells, respectively, while in HepG2 cells an increase of 1.8-fold was observed only for the concentration of 1.0 µmol/L.

The early effects observed in the hepatic cells when compared to lung cells may be due to the rapid retene metabolism by HepG2 cells (Huang et al., 2017). This may not be the case for A549 lung cells, which have a comparably lower metabolic capacity than HepG2 cells, exhibiting a limited cytochrome P450 (CYP) activity (Garcia-Canton et al., 2013). The major metabolic activation pathway of retene in HepG2 cells involves the formation of orthoquinones (Huang et al., 2017). The phase I and phase II enzymes involved in this pathway have not been fully identified yet, but it was hypothesized by Huang et al. (2017) that CYP1A1 and epoxide hydrolase are responsible for the formation of *trans*-dihydrodiols on the terminal rings of retene in HepG2 cells. *Trans*-Dihydrodiols can further be converted to catechols by aldoketo reductases (AKRs) such as AKR1C1, AKR1C2, and AKR1C3, also present in HepG2 cells. Catechols autoxidize into ortho-quinones triggering redox cycling and intracellular ROS formation (Shultz et al., 2011), which likely contributed to the oxidative stress-dependent genotoxicity observed here.

Evidence of metabolic activation on both terminal rings to form bis-orthoquinones has also been reported, although to a less extent than mono-orthoquinones (Huang et al., 2017). These bis-electrophiles have the potential to cross-link with DNA and protein, representing an additional potential mechanism for the genotoxicity of retene. Notably, A549 cells exhibit a lower level of induction of *CYP1A1* expression in response to PAHs compared to HepG2 cells (Genies et al., 2013). Therefore, a more efficient formation of retene *trans*-dihydrodiols is expected in the hepatic cells. However, A549 cells induce higher levels of AKRs, particularly AKR1C1, than HepG2 cells in response to PAHs (Palackal et al., 2002; Genies et al., 2013), favoring the conversion of *trans*-dihydrodiols to ortho-quinones. Thus, CYP metabolism of retene in HepG2 cells may be faster, but the formation of quinones could be more

efficient in A549 cells, explaining the higher sensitivity of this cell line to oxidative stress caused by retene. In addition, A549 cells were reported to be more sensitive than HepG2 cells to oxidative stress caused by other types of compounds, such as plant toxins and organophosphate flame retardants (An et al., 2016; Saxena et al., 2022). Moreover, HepG2 cells express higher levels of phase II enzymes than A549 cells in response to B[a]P, including glutathione transferase GSTP1 and UDP-glucuronosyltransferase UGT1A6 (Genies et al., 2013; Shi et al., 2016). This suggests that HepG2 phase II metabolism could detoxify the metabolites of retene more efficiently than A549 cells.

It was not possible to calculate a relative potency factor for retene using the *in vitro* model due to the low induction of the DNA damage signaling proteins at 48 h of exposure. A similar result was observed for retene's parent PAH phenanthrene (Drej et al., 2017). The low potency of retene agrees with a recent study where the relative potency factor was estimated to be 0.004 by a regression based QSAR model (Gbeddy et al., 2020), which is close to that of phenanthrene and pyrene (0.001) (Nisbet and LaGoy, 1992). When cells were exposed to retene for shorter time intervals, levels of phosphorylated DNA damage signaling proteins pChk1 and γH2AX increased up to 24 h of retene exposure followed by a decrease, indicating the process of activation and completion of DNA damage response and repair. The response of γH2AX was faster than pChk1, starting as early as 4 h, which was consistent with the comet assay and mitoSOX results. The phosphorylation of H2AX is an early event in cellular response to DNA double-strand breaks (DSB) (Fernandez-Capetillo et al., 2004). ROS formation induced by bioactivation of retene to ortho-quinones can cause DSB (Penning, 2017), triggering an early and acute response. This was also confirmed here by the observed reduction of γH2AX levels in the presence of the antioxidant NAC.

In contrast to γH2AX, pChk1 displayed a later response to retene, starting at 12 h and decreasing at 48 h to a level that was still significantly higher than the negative control, which indicated a more persistent level of activation. Chk1 is a downstream kinase that is predominantly activated through phosphorylation by the apical kinase ATR (ataxia telangiectasia and Rad3-related) in response to replication stress generated at stalled DNA replication forks (Gaillard et al., 2015). In addition to ROS-induced DNA lesions, PAH ortho-quinones can also covalently modify DNA resulting in bulky adducts (Penning, 2017) and B[a]P-7,8-dione induces stable dG and dA adducts in human lung cells (Huang et al., 2013). Since adducts derived from the major genotoxic metabolite B[a]P-7,8-dihydrodiol-9,10-epoxide induce replication stress (Fischer et al., 2018) and B[a]P exposure strongly induces levels of pChk1 (de Oliveira Galvão et al., 2022), it is likely that formation of stable adducts derived from retene quinone metabolites also may cause replication stress and induction of pChk1. In addition, the bis-orthoquinone metabolites of retene could form protein and DNA cross-links that would represent an impediment for replication forks. However, to the authors' knowledge it is not known to what extent and what type of covalent interactions occur between retene metabolites and DNA (Huang et al., 2017). A defective response to replication stress can lead to genome instability which can be observed as chromosome gain or loss (Gaillard et al., 2015), which is in accordance with the observed increase in micronuclei formation after retene exposure.

Contrasting mutagenicity results between *S. typhimurium* and mammalian models have been previously reported for PAHs and other organic compounds (Kirkland et al., 2007; Fowler et al., 2018; da Silva Junior et al., 2021a), which can be associated to differences in the types of mutations detected and in the metabolism of the models. The rat liver S9 mix generally used in the Ames test contains higher levels of CYP1A and 2B enzymes compared to other CYP forms, and phase II enzymes are mostly inactive in the S9 mix, as their cofactors are not added (Kirkland et al., 2007). Therefore, we suggest that metabolic activation of retene in HepG2 cells generates metabolites that cause ROS production and replication stress, processes that cause DNA damage and genome instability, indicating a potential hazard to human health.

## 5. Conclusion

This work provides new data on *in vitro* toxicity of retene. Based on our results on intracellular levels of ROS and the protective effect of antioxidant towards ROS generation and DNA damage signaling, we conclude that oxidative stress is an important mechanism of genotoxicity of retene in HepG2 cells. Another important mechanism can be replication stress, which together with ROS formation can lead to genetic instability, as observed *via* micronuclei formation. More studies on the toxicity of retene are important, since this PAH is consistently found at high concentrations in biomass burning particulate matter and may contribute to the harmful effects of this type of air pollution on human health.

## Funding

This work was funded by the São Paulo State Research Foundation, Brazil (FAPESP, grant numbers #2018/16554–9 and INCT-DATREM 2014/50945–4), the National Council for Scientific and Technological Development, Brazil (MCT/CNPq Proc. Univ. 407699/2018–0, INCT-DATREM 465571/2014–0), the Swedish Cancer and Allergy Fund (grant number 10132) and the Swedish Research Council Formas (grant number 2019–). C.S. was supported by FAPESP (#2018/17931–0) and by a Joint Brazilian-Swedish Research Collaboration funded by the Swedish Foundation for International Cooperation in Research and Higher Education (STINT) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brazil (grant numbers BR2019–8515 and 88887.642068/2021–00).

## Author contributions

Study conception: C.S., M.L.A.M.C., D.J.D. and K.D. Experimental planning and design: C.S., D.J.D., M.F.O.G. and K.D. Material preparation, data collection and analysis: C.S. Resources: D.J.D., D.P.O. and K.D. Funding acquisition: M.L.A.M.C., D.J.D., S.R.B.M., M.F.O.G. and K.D. Original manuscript: C.S. and K.D. All authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Ethical approval

Not applicable.

## Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Data availability

Data will be made available on request.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2023.105628>.

## References

- Alves, C.A., Vicente, A., Monteiro, C., Gonçalves, C., Evtyugina, M., Pio, C., 2011. Emission of trace gases and organic components in smoke particles from a wildfire in a mixed-evergreen forest in Portugal. *Sci. Total Environ.* 409, 1466–1475. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.12.025>.
- An, J., Hu, J., Shang, Y., Zhong, Y., Zhang, X., Yu, Z., 2016. The cytotoxicity of organophosphate flame retardants on HepG2, A549 and Caco-2 cells. *J. Environ. Sci. Health A* 51 (11), 980–988. <https://doi.org/10.1080/10934529.2016.1191819>.
- Andersson, J.T., Achten, C., 2015. Time to say goodbye to the 16 EPA PAHs? Toward an up-to-date use of PACs for environmental purposes. *Polycycl. Aromat. Compd.* 35, 330–354. <https://doi.org/10.1080/10406638.2014.991042>.
- Barron Cuenca, J., de Oliveira Galvão, M.F., Unlu Endirlik, B., Tirado, N., Dreij, K., 2022. In vitro cytotoxicity and genotoxicity of single and combined pesticides used by Bolivian farmers. *Environ. Mol. Mutagen.* 63 (1), 4–17. <https://doi.org/10.1002/em.22468>.
- Cui, M., Chen, Y., Yan, C., Li, J., Zhang, G., 2022. Refined source apportionment of residential and industrial fuel combustion in the Beijing based on real-world source profiles. *Sci. Total Environ.* 826, 154101 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.154101>.
- da Silva Junior, F.C., Felipe, M.B.M.C., de Castro, D.E.F., Araújo, S.C.S., Sisenando, H.C. N., de Medeiros, S.R.B., 2021a. A look beyond the priority: a systematic review of the genotoxic, mutagenic, and carcinogenic endpoints of non-priority PAHs. *Environ. Pollut.* 278, 116838 <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116838>.
- da Silva Junior, F.C., Agues-Barbosa, T., Luchiani, A.C., de Medeiros, S.R.B., 2021b. Genotoxicity and behavioral alterations induced by retene in adult zebrafish. *J. Environ. Chem. Eng.* 9, 106518 <https://doi.org/10.1016/j.jece.2021.106518>.
- Dahl, M., Survo, S., Valitalo, P., Kabiersch, G., Alitalo, O.S., Penttinen, O.P., Rantalainen, A.L., 2019. Identification of toxicants from a highly C10-C40-contaminated sediment influenced by the wood industry: petroleum hydrocarbons or biogenic organic compounds? *Environ. Toxicol. Chem.* 38 (5), 936–946. <https://doi.org/10.1002/etc.4380>.
- de Oliveira Alves, N., Vessoni, A.T., Quinet, A., Fortunato, R.S., Kajitani, G.S., Peixoto, M. S., de Souza, Hacon S., Artaxo, P., Saldiva, P., Menck, C.F.M., de Medeiros, S.R.B., 2017. Biomass burning in the Amazon region causes DNA damage and cell death in human lung cells. *Sci. Rep.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11024-3>.
- de Oliveira Galvão, M.F., Sadiktsis, I., Marques Pedro, T., Dreij, K., 2022. Determination of whole mixture-based potency factors for cancer risk assessment of complex environmental mixtures by in vitro testing of standard reference materials. *Environ. Int.* 166, 107345 <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107345>.
- de Oliveira Alves, N., Brito, J., Caumo, S., Arana, A., de Souza, Hacon S., Artaxo, P., Hillamo, R., Teinilä, K., de Medeiros, S.R.B., Vasconcellos, P.C., 2015. Biomass burning in the Amazon region: aerosol source apportionment and associated health risk assessment. *Atmos. Environ.* 120, 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2015.08.059>.
- de Oliveira Alves, N., de Souza, Hacon S., de Oliveira Galvão, M.F., Peixoto, M.S., Artaxo, P., Vasconcellos, P.C., de Medeiros, S.R.B., 2014. Genetic damage of organic matter in the Brazilian Amazon: a comparative study between intense and moderate biomass burning. *Environ. Res.* 130, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2013.12.011>.
- de Oliveira Alves, N., Matos Loureiro, A.L., dos Santos, F.C., Nascimento, K.H., Dallacort, R., Vasconcellos, P.C., de Souza, Hacon S., Artaxo, P., de Medeiros, S.R.B., 2011. Genotoxicity and composition of particulate matter from biomass burning in the eastern Brazilian Amazon region. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 1427–1433. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.04.007>.
- Dreij, K., Mattsson, Å., Jarvis, I.W.H., Lim, H., Hurkmans, J., Gustafsson, J., Bergvall, C., Westerholm, R., Johansson, C., Stenius, U., 2017. Cancer risk assessment of airborne PAHs based on in vitro mixture potency factors. *Environ. Sci. Technol.* 51, 8805–8814. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02963>.
- Fernandez-Capetillo, O., Lee, A., Nussenzweig, M., Nussenzweig, A., 2004. H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair* 3, 959–967. <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2004.03.024>.
- Fischer, J.M.F., Zübel, T., Jander, K., Fix, J., Trussina, I.R.E.A., Gebhard, D., Bergemann, J., Bürkle, A., Mangerich, A., 2018. PARP1 protects from benzo[a]pyrene diol epoxide-induced replication stress and mutagenicity. *Arch. Toxicol.* 92, 1323–1340. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2115-6>.
- Fowler, P., Meurer, K., Honarvar, N., Kirkland, D., 2018. A review of the genotoxic potential of 1,4-naphthoquinone. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 834, 6–17. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2018.07.004>.
- Gaillard, H., Garcia-Muse, T., Aguilera, A., 2015. Replication stress and cancer. *Nat. Rev. Cancer* 15, 276–289. <https://doi.org/10.1038/nrc3916>.
- García-Canton, C., Minet, E., Anadon, A., Meredith, C., 2013. Metabolic characterization of cell systems used in in vitro toxicology testing: lung cell system BEAS-2B as a working example. *Toxicol. in Vitro* 27 (6), 1719–1727. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2013.05.001>.
- Gbeddy, G., Egodwatta, P., Goonetilleke, A., Ayoko, G., Chen, L., 2020. Application of quantitative structure-activity relationship (QSAR) model in comprehensive human health risk assessment of PAHs, and alkyl-, nitro-, carbonyl-, and hydroxyl-PAHs laden in urban road dust. *J. Hazard. Mater.* 383, 121154 <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2019.121154>.
- Genies, C., Maitre, A., Lefebvre, E., Jullien, A., Chopard-Lallier, M., Douki, T., 2013. The extreme variety of genotoxic response to benzo[a]pyrene in three different human cell lines from three different organs. *PLoS One* 8 (11), e78356. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078356>.
- Gravato, C., Santos, M.A., 2002. Juvenile Sea bass liver biotransformation and erythrocytic genotoxic responses to pulp mill contaminants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 53 (1), 104–112. <https://doi.org/10.1006/eesa.2002.2196>.
- Heyder, J., 2004. Deposition of inhaled particles in the human respiratory tract and consequences for regional targeting in respiratory drug delivery. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 1, 315–320. <https://doi.org/10.1513/pats.200409-046TA>.
- Huang, M., Blair, I.A., Penning, T.M., 2013. Identification of stable benzo[a]pyrene-7,8-dione-DNA adducts in human lung cells. *Chem. Res. Toxicol.* 26, 685–692. <https://doi.org/10.1021/tx300476m>.
- Huang, M., Mesaros, C., Hackfeld, L.C., Hodge, R.P., Zang, T., Blair, I.A., Penning, T.M., 2017. Potential metabolic activation of a representative C4-alkylated polycyclic

- aromatic hydrocarbon Retene (1-Methyl-7-isopropyl-phenanthrene) associated with the Deepwater horizon oil spill in human hepatoma (HepG2) cells. *Chem. Res. Toxicol.* 30, 1093–1101. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00457>.
- Jarvis, I.W.H., Bergvall, C., Bottai, M., Westerholm, R., Stenius, U., Dreij, K., 2013. Persistent activation of DNA damage signaling in response to complex mixtures of PAHs in air particulate matter. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 266, 408–418. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.11.026>.
- Keith, L.H., 2014. The source of U.S. EPA's sixteen PAH priority pollutants. *Polycycl. Aromat. Compd.* 35 (2–4), 147–160. <https://doi.org/10.1080/10406638.2014.892886>.
- Kim, K.H., Jahan, S.A., Kabir, E., Brown, R.J.C., 2013. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environ. Int.* 60, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.019>.
- Kirkland, D., Pfuhrer, S., Tweats, D., Aardema, M., Corvi, R., Darroudi, F., Elhajouji, A., Glatt, H., Hastwell, P., Hayashi, M., Kasper, P., Kirchner, S., Lynch, A., Marzin, D., Maurici, D., Meunier, J.R., Müller, L., Nohynek, G., Parry, J., Parry, E., Thybaud, V., Tice, R., Benthem, J., Vanparys, P., White, P., 2007. How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: report of an ECVAM workshop. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 628 (1), 31–55. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2006.11.008>.
- Knasmüller, S., Parzefall, W., Sanyal, R., Ecker, S., Schwab, C., Uhl, M., Mersch-Sundermann, V., Williamson, G., Hietsch, G., Langer, T., Darroudi, F., Natarajan, A. T., 1998. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 402, 185–202. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00297-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00297-2).
- Kopp, B., Dario, M., Zalko, D., Audebert, M., 2018. Assessment of a panel of cellular biomarkers and the kinetics of their induction in comparing genotoxic modes of action in HepG2 cells. *Environ. Mol. Mutagen.* 59 (6), 516–528. <https://doi.org/10.1002/em.22197>.
- Křůmal, K., Mikuška, P., Večeřa, Z., 2017. Characterization of organic compounds in winter PM1 aerosols in a small industrial town. *Atmos Pollut Res.* 8, 930–939. <https://doi.org/10.1016/j.apr.2017.03.003>.
- Le Bihanic, F., Di Bucchianico, S., Karlsson, H.L., Dreij, K., 2016. In vivo micronucleus screening in zebrafish by flow cytometry. *Mutagenesis* 31, 643–653. <https://doi.org/10.1093/mutage/gew032>.
- Li, Z., Porter, E.N., Sjödin, A., Needham, L.L., Lee, S., Russell, A.G., Mulholland, J.A., 2009. Characterization of PM2.5-bound polycyclic aromatic hydrocarbons in Atlanta - seasonal variations at urban, suburban, and rural ambient air monitoring sites. *Atmos. Environ.* 43, 4187–4193. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2009.05.031>.
- Maria, V.L., Correia, A.C., Santos, M.A., 2005. Anguilla anguilla L. liver EROD induction and genotoxic responses after retene exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61 (2), 230–238. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2004.10.011>.
- Marzoghgi, S., 2016. Phototoxic Target Lipid Model for Predicting the Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Petroleum to Aquatic Life. University of Delaware. <https://udspace.udel.edu/handle/19716/21150> (Accessed 07 Dec 2022).
- Møller, M., Hagen, I., Ramdahl, T., 1985. Mutagenicity of polycyclic aromatic compounds (PAC) identified in source emissions and ambient air. *Mutat Res Genet Toxicol.* 157, 149–156. [https://doi.org/10.1016/0165-1218\(85\)90110-7](https://doi.org/10.1016/0165-1218(85)90110-7).
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- Nisbet, I.C., LaGoy, P.K., 1992. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 16 (3), 290–300. [https://doi.org/10.1016/0273-2300\(92\)90009-X](https://doi.org/10.1016/0273-2300(92)90009-X).
- OECD - Organisation for Economic Cooperation and Development, 2016. Test No. 487. In: *In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4*. OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264264861-en>.
- Palackal, N.T., Lee, S.H., Harvey, R.G., Blair, I.A., Penning, T.M., 2002. Activation of polycyclic aromatic hydrocarbon trans-dihydrodiol proximate carcinogens by human aldo-keto reductase (AKR1C) enzymes and their functional overexpression in human lung carcinoma (A549) cells. *J. Biol. Chem.* 277 (27), 24799–24808. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112424200>.
- Peixoto, M.S., da Silva Junior, F.C., de Oliveira Galvão, M.F., Roubicek, D.A., de Oliveira, Alves N., de Medeiros, S.R.B., 2019. Oxidative stress, mutagenic effects, and cell death induced by retene. *Chemosphere* 231, 518–527. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.123>.
- Penning, T.M., 2017. Genotoxicity of ortho-quinones: reactive oxygen species versus covalent modification. *Toxicol Res.* 6, 740. <https://doi.org/10.1039/c7tx00223h>.
- Ramdahl, T., 1983. Retene - a molecular marker of wood combustion in ambient air. *Nature* 306, 580–582. <https://doi.org/10.1038/306580a0>.
- Rigaud, C., Eriksson, A., Krasnov, A., Wincet, E., Pakkanen, H., Lehtivuori, H., Ihalainen, J., Vehniainen, E.R., 2020. Retene, pyrene and phenanthrene cause distinct molecular-level changes in the cardiac tissue of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) larvae, part 1 - transcriptomics. *Sci. Total Environ.* 745, 141031. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141031>.
- Samburova, V., Zielinska, B., Khlystov, A., 2017. Do 16 polycyclic aromatic hydrocarbons represent PAH air toxicity? *Toxics* 5 (3), 17. <https://doi.org/10.3390/toxics503017>.
- Sarma, S.N., Blais, J.M., Chan, H.M., 2017. Neurotoxicity of alkylated polycyclic aromatic compounds in human neuroblastoma cells. *J. Toxicol. Environ. Health - a: Curr. Issues* 80, 285–300. <https://doi.org/10.1080/15287394.2017.1314840>.
- Saxena, N., Phatak, P., Chauhan, V., 2022. Differential toxicity of ahrin in human cell lines of different organ origin. *Toxicol. in Vitro* 78, 105250. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105250>.
- Scott, J.A., Incardona, J.P., Pelkki, K., Shepardson, S., Hodson, P.V., 2011. Ahr2-mediated, CYP1A-independent cardiovascular toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos exposed to retene. *Aquat. Toxicol.* 101 (1), 165–174. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.09.016>.
- Shang, Y., Zhang, L., Jiang, Y., Li, Y., Lu, P., 2014. Airborne quinones induce cytotoxicity and DNA damage in human lung epithelial A549 cells: the role of reactive oxygen species. *Chemosphere* 100, 42–49. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.12.079>.
- Shi, Q., Haenen, G.R., Maas, L., Arlt, V.M., Spina, D., Rizzo Vasquez, Y., Moonen, E., Veith, C., Van Schooten, F.J., Godschalk, R.W.L., 2016. Inflammation-associated extracellular  $\beta$ -glucuronidase alters cellular responses to the chemical carcinogen benzo[a]pyrene. *Arch. Toxicol.* 90, 2261–2273. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1593-7>.
- Shultz, C.A., Quinn, A.M., Park, J.H., Harvey, R.G., Bolton, J.L., Maser, E., Penning, T.M., 2011. Specificity of human aldo-keto reductases, NAD(P)H:quinone oxidoreductase, and carbonyl reductases to redox-cycle polycyclic aromatic hydrocarbon diones and 4-hydroxyquinoline-o-quinone. *Chem. Res. Toxicol.* 24, 2153–2166. <https://doi.org/10.1021/tx200294c>.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.-C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–221. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2280\(2000\)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2280(2000)35:3<206::AID-EM8>3.0.CO;2-J).
- Turner, M.C., Andersen, Z.J., Baccarelli, A., Diver, W.R., Gapstur, S.M., Pope, C.A., Prada, D., Samet, J., Thurston, G., Cohen, A., 2020. Outdoor air pollution and cancer: An overview of the current evidence and public health recommendations. *CA Cancer J. Clin.* 70, 460–479. <https://doi.org/10.3322/caac.21632>.
- Urban, R.C., Alves, C.A., Allen, A.G., Cardoso, A.A., Campos, M.L.A.M., 2016. Organic aerosols in a Brazilian agro-industrial area: speciation and impact of biomass burning. *Atmos. Res.* 169, 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2015.10.008>.
- US EPA, 2011. Exposure Factors Handbook 2011 Edition (Final Report). U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC. EPA/600/R-09/052F. <https://cfpub.epa.gov/ncea/risk/recordisplay.cfm?deid=236252> (Accessed 07 Dec 2022).
- Vallabani, N.V.S., Alijagic, A., Persson, A., Odnevall, I., Samdahl, E., Karlsson, H.L., 2022. Toxicity evaluation of particles formed during 3D-printing: cytotoxic, genotoxic, and inflammatory response in lung and macrophage models. *Toxicology* 467, 153100. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2022.153100>.
- Vicente, A., Alves, C.A., Monteiro, C., Nunes, T., Mirante, F., Cerqueira, M., Calvo, A., Pio, C., 2012. Organic speciation of aerosols from wildfires in Central Portugal during summer 2009. *Atmos. Environ.* 57, 186–196. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.04.030>.
- Vicente, A., Calvo, A., Fernandes, A.P., Nunes, T., Monteiro, C., Pio, C., Alves, C.A., 2017. Hydrocarbons in particulate samples from wildfire events in Central Portugal in summer 2010. *J. Environ. Sci. (China)* 53, 122–131. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2016.02.022>.
- Wilsson, L.B., McClure, R.S., Waters, K.M., Simonich, M.T., Tanguay, R.L., 2022. Concentration-response gene expression analysis in zebrafish reveals phenotypically anchored transcriptional responses to retene. *Front Toxicol.* 4, 950503. <https://doi.org/10.3389/ftox.2022.950503>.
- Yu, Y., Katsoyannis, A., Bohlin-Nizzetto, P., Brorstrom-Lunden, E., Ma, J., Zhao, Y., Wu, Z., Tych, W., Mindham, D., Sverko, E., Barresi, E., Dryfhout-Clark, H., Fellin, P., Hung, H., 2019. Polycyclic aromatic hydrocarbons not declining in Arctic air despite global emission reduction. *Environ. Sci. Technol.* 53 (5), 2375–2382. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b05353>.
- Zhang, H., Zhang, X., Wang, Y., Bai, P., Hayakawa, K., Zhang, L., Tang, N., 2022. Characteristics and influencing factors of polycyclic aromatic hydrocarbons emitted from open burning and stove burning of biomass: a brief review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 19 (7), 3944. <https://doi.org/10.3390/ijerph19073944>.

**APÊNDICE E**

---

---





# Particulate matter from a tropical city in southeast Brazil: Impact of biomass burning on polycyclic aromatic compounds levels, health risks, and *in vitro* toxicity

Caroline Scaramboni<sup>a,\*</sup>, Roberta Cerasi Urban<sup>b</sup>, Danielle Palma de Oliveira<sup>c,d</sup>, Daniel Junqueira Dorta<sup>a,d</sup>, Maria Lucia Arruda Moura Campos<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Chemistry, Faculty of Philosophy, Sciences and Letters at Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 14040-901, Brazil

<sup>b</sup> Chemistry Department, Federal University of São Carlos, São Carlos, SP, 13565-905, Brazil

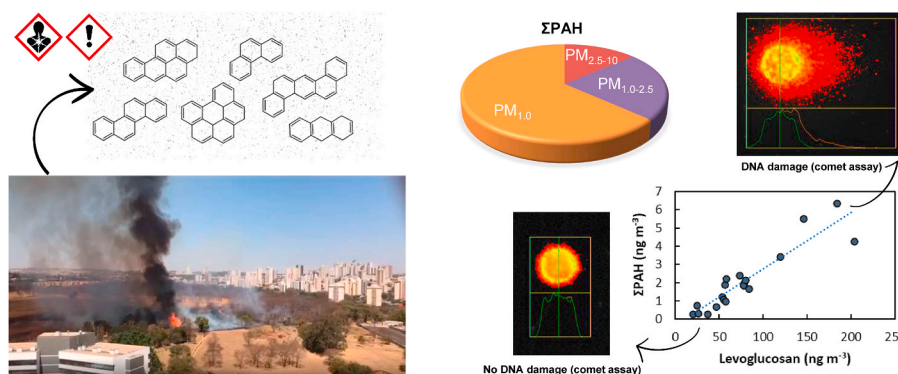
<sup>c</sup> School of Pharmaceutical Sciences at Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 14040-901, Brazil

<sup>d</sup> National Institute for Alternative Technologies of Detection, Toxicological Evaluation and Removal of Micropollutants and Radioactives (INCT-DATREM), Araraquara, SP, Brazil

## HIGHLIGHTS

- Biomass burning was the main source of PAH and OPAH in PM<sub>2.5</sub>.
- NPAH was mainly derived from diesel emissions.
- B[a]P<sub>eq</sub> was higher in the dry season when most fires occur.
- Dry season PM<sub>1.0</sub> extracts were cytotoxic and genotoxic to HepG2 cells.
- Persistent DNA damage on HepG2 cells was observed.

## GRAPHICAL ABSTRACT



## ARTICLE INFO

Handling editor: Derek Muir

### Keywords:

HepG2  
PAHs  
Nitro-PAHs  
Oxy-PAHs

## ABSTRACT

In the context of a rising global temperature, biomass burning represents an increasing risk to human health, due to emissions of highly toxic substances such as polycyclic aromatic hydrocarbon (PAHs). Size-segregated particulate matter (PM) was collected in a region within the sugarcane belt of São Paulo state (Brazil), where biomass burning is still frequent, despite the phasing out of manual harvesting preceded by fire. The median of the total concentration of the 15 PAHs determined was  $2.3 \pm 1.8 \text{ ng m}^{-3}$  ( $n = 19$ ), where 63% of this content was in PM<sub>1.0</sub>. Concentrations of OPAHs and NPAHs were about an order of magnitude lower. PM<sub>2.5</sub> collected in the dry season, when most of the fires occur, presented PAHs and OPAHs total concentrations three times higher than in the wet season, showing positive correlations with fire foci number and levoglucosan (a biomass burning marker). These results, added to the fact that biomass burning explained 65% of the data variance (PCA analysis),

\* Corresponding author.

E-mail addresses: [carolinesc@usp.br](mailto:carolinesc@usp.br), [carol\\_scaramboni@hotmail.com](mailto:carol_scaramboni@hotmail.com) (C. Scaramboni), [roberta.urban@ufscar.br](mailto:roberta.urban@ufscar.br) (R.C. Urban), [dpalma@usp.br](mailto:dpalma@usp.br) (D.P. Oliveira), [djdorta@ffclrp.usp.br](mailto:djdorta@ffclrp.usp.br) (D.J. Dorta), [lcamos@ffclrp.usp.br](mailto:lcamos@ffclrp.usp.br) (M.L.A.M. Campos).

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.141072>

Received 26 June 2023; Received in revised form 21 November 2023; Accepted 28 December 2023

Available online 29 December 2023

0045-6535/© 2024 Elsevier Ltd. All rights reserved.

evidenced the importance of this practice as a source of PAHs and OPAHs to the regional atmosphere. Conversely, NPAHs appeared to be mainly derived from diesel-powered vehicles. The B[a]P equivalent concentration was estimated to be 4 times higher in the dry season than in the wet season, and was greatly increased during a local fire event. Cytotoxicity and genotoxicity of PM<sub>1,0</sub> organic extracts were assessed using *in vitro* tests with human liver HepG2 cells. For both types of tests, significant toxicity was only observed for samples collected during the dry season. Persistent DNA damage that may have impaired the DNA repair system was also observed. The results indicated that there was a health risk associated with the air particulate mixture, mainly related to biomass burning, demonstrating the urgent need for better remediation actions to prevent the occurrence of burning events.

## 1. Introduction

Exposure to air pollution is a major risk factor for human health globally, causing chronic respiratory and cardiovascular diseases, as well as cancer (Abbafati et al., 2020). According to the World Health Organization (WHO), ambient air pollution led to estimated 4.2 million premature deaths worldwide in 2019, mainly due to exposure to particulate matter with aerodynamic diameter ( $d_p$ ) < 2.5  $\mu\text{m}$  (PM<sub>2.5</sub>) (WHO, 2022). In October 2013, the International Agency for Research on Cancer (IARC) classified outdoor air pollution as carcinogenic to humans (Group 1) (IARC, 2016). Among the organic compounds present in the particulate phase, the polycyclic aromatic compounds (PACs) are of great concern, due to their mutagenic and carcinogenic potentials (Mallah et al., 2022). They are formed during incomplete combustion of organic material, with sources including biomass burning, automobile exhaust, maritime transport, fireworks, industrial power generation, incinerators, and production of coal tar, coke, and asphalt (Boström et al., 2002; Pongpiachan et al., 2015, 2017).

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a class of organic compounds formed by carbon and hydrogen atoms, with chemical structures consisting of two or more aromatic rings condensed together (Kim et al., 2013). They are widespread environmental contaminants present in different compartments, such as air, soils, sediments and agricultural products (Pongpiachan, 2022; Pongpiachan et al., 2022a). PAHs derivatives such as nitrated PAHs (NPAHs) and oxygenated PAHs (OPAHs) have substitutions of one or more hydrogen atoms by oxygen and nitrogen atoms, respectively (Idowu et al., 2019). In addition to the primary sources, NPAHs and OPAHs can be formed in the atmosphere by photochemical reactions involving ozone (O<sub>3</sub>), hydroxyl radicals ( $\cdot\text{OH}$ ), and nitrogen oxides (NO<sub>x</sub>) (Idowu et al., 2019).

Various PAHs associated with atmospheric PM have been shown to play important roles in causing cancer in humans (WHO Europe, 2021). Benzo[a]pyrene (B[a]P) is the most widely studied PAH and is often used as a surrogate marker of total exposure to PAHs mixtures (WHO, 2000). Another approach is to summarize the contribution from each PAH into a single index denoted “B[a]P equivalent” (Mueller et al., 2019). This approach assumes additivity of cancer potency risk, so it does not consider intra-mixture interactions and probably underestimates the actual exposure risk to human health (Drej et al., 2017; Jarvis et al., 2013).

Controlled toxicity studies with relevant biological endpoints complement chemical analysis for risk assessment of complex environmental mixtures such as PM (Kelly and Fussell, 2012). In the context of new approach methodologies (NAMs) for toxicity testing, *in vitro* models such as *Salmonella*/microsome assay (Alves et al., 2016; Brito et al., 2013; Umbuzeiro et al., 2008), human lung cell lines (de Oliveira Alves et al., 2017; de Oliveira Galvão et al., 2018; Lepers et al., 2014), and human liver cells (Jarvis et al., 2014; Senthilkumar et al., 2014; Xin et al., 2014) have been used to evaluate the genotoxic effects of PM exposure. Since most PAHs exert their toxic effects after being metabolized to more reactive intermediates, liver-derived cell lines, such as HepG2 cells, have been suggested as good *in vitro* models for investigating the genotoxic potential of complex mixtures containing PAHs, due to their high metabolic capability (Knasmüller et al., 1998).

It is well known that biomass burning, such as indoor firewood burning and wildfires, accounts for more than 50% of the global total atmospheric emissions of PAHs (Zhang et al., 2022). In Brazil, wildfires are estimated to represent 60.1% of the total PAHs emissions, followed by indoor firewood burning (17.7%) and motor vehicles (15.0%) (Shen et al., 2013). Wildfires are notorious in the Brazilian Amazon; however, other regions of the country can also be highly affected by the use of fire (Urban et al., 2012, 2016).

The present study was performed in Ribeirão Preto, a municipality within an agro-industrial region of São Paulo state, with economic activities based mainly on sugarcane cultivation and processing for ethanol fuel and sugar production. For decades, fire was employed to remove the outer leaves of the sugarcane to facilitate the process of manual harvesting. Several epidemiological studies have identified respiratory and cardiovascular problems in the population affected by air pollution from sugarcane burning (Arbex et al., 2010, 2014; Cançado et al., 2006). Since 2006, a public policy to progressively replace manual by mechanical harvesting has been implemented, with mechanical harvesting now accounting for around 98% of the total 2022/23 harvest (CONAB, 2022).

However, despite the drastic reduction in the use of fire during sugarcane harvesting, high numbers of fire foci are still recorded in São Paulo state, with an increase of around 80% in 2020 and 2021 (6123 and 5469), compared to the average for the 9 previous years (3,190) (INPE, 2023a). The persistent high number of fire foci in the dry season is attributed to the use of fire for land clearance in agriculture, as well as accidental and/or criminal wildfires in local forests and plantations. This situation has been aggravated in the context of climate change, with longer periods of drought and poor distribution of rainfall.

Another important source of biomass burning emissions in the study region is the use of dry sugarcane residue (bagasse) as a fuel within the sugarcane industry. Furthermore, the excess bagasse is later used for thermoelectric power generation and by other regional industries, such as orange processing (Urban et al., 2014).

Given the high fire frequency and the regional population density, the impact of biomass burning on human health needs to be further investigated. Therefore, the aims of this work were as follows: (i) Determination of the PACs concentrations in size-fractionated PM; (ii) Investigation of the importance of biomass burning as a source of PACs, using the marker compound levoglucosan; (iii) Estimation of the excess lifetime cancer risk for the exposed population; (iv) Assessment of the *in vitro* cytotoxicity and genotoxicity of the organic extract of PM < 1  $\mu\text{m}$ , using HepG2 cells.

## 2. Experimental

### 2.1. Chemicals and solvents

The HPLC-grade solvents acetonitrile, dichloromethane and methanol were obtained from Merck (USA). A complete list of the PACs and anhydrosugars standards used is available in Table S1.

## 2.2. Study site and sampling

Particulate matter samples were collected in the city of Ribeirão Preto, located in São Paulo state, Brazil (Fig. 1). The Metropolitan Region of Ribeirão Preto comprises 34 municipalities, with a population of 1.74 million inhabitants and a fleet of 580,675 vehicles (CETESB, 2020a; IBGE, 2021), and the main industrial activity is based on sugarcane production and processing.

Sample collection was performed between January 2020 and July 2021 ( $n = 19$ ), at two sites. One (semi-urban) was located on the outskirts of the city ( $-21.161274S$ ,  $-47.858257W$ ), on the university campus (indicated by the letter “A” in Fig. 1). This site was about 1 km distant from extensive sugarcane plantations and had minimal circulation of vehicles and people. The second site (urban) was located in the city center ( $-21.178233S$ ,  $-47.811086W$ ), in an area with intense traffic of people and vehicles (indicated by the letter “B” in Fig. 1). At both sites, sample collections were preferably performed on weekdays.

The Ribeirão Preto region has a tropical climate characterized by dry winters (June to August) and rainy summers (December to February), with modest seasonal variations of temperature and solar radiation. Average monthly temperatures vary by only 5.3 °C during the year, so seasonal differences are usually related to rainfall patterns (Climate-data.org, 2021). In this work, the dry season was considered to be from April to September, while the wet season was from October to March, based on the monthly rainfall amounts during the sampling period (Fig. S1).

Samples were collected using a Micro-Orifice Uniform Deposit Impactor (MOUDI 100S4; MSP Corporation), with aerodynamic cutoffs for the individual stages of 18, 10, 2.5, and 1.0  $\mu\text{m}$ , and a final stage that collected particles  $< 1 \mu\text{m}$ . Therefore, the following PM size fractions were obtained:  $\text{PM}_{>18}$  ( $d_p > 18 \mu\text{m}$ ),  $\text{PM}_{10-18}$  ( $10 \mu\text{m} < d_p \leq 18 \mu\text{m}$ ),  $\text{PM}_{2.5-10}$  ( $2.5 \mu\text{m} < d_p \leq 10 \mu\text{m}$ ),  $\text{PM}_{1.0-2.5}$  ( $1.0 \mu\text{m} < d_p \leq 2.5 \mu\text{m}$ ), and  $\text{PM}_{1.0}$  ( $d_p \leq 1.0 \mu\text{m}$ ). Fine mode particles ( $\text{PM}_{2.5}$ ) were defined as those smaller than 2.5  $\mu\text{m}$ , which corresponded to the sum of the two smallest particle fractions collected ( $\text{PM}_{1.0-2.5} + \text{PM}_{1.0}$ ). Coarse mode particles were defined as  $2.5 \mu\text{m} < d_p \leq 10 \mu\text{m}$  ( $\text{PM}_{2.5-10}$ ).  $\text{PM}_{>18}$  and  $\text{PM}_{10-18}$  will be treated as such when pertinent.

Samples were collected on quartz fiber filters (47 mm diameter, Whatman), at a flow rate of 30  $\text{L min}^{-1}$ , during 3–5 days (depending on the expected PM mass). The filters were previously baked at 600 °C for 6

h. After PM collection, they were wrapped in aluminum foil, placed in a plastic bag, and stored at  $-22 \text{ }^\circ\text{C}$  until analysis.

The entire areas of the filters corresponding to the cut-offs of 18, 10, 2.5, and 1.0  $\mu\text{m}$  were extracted, due to the uneven distributions of the particles on the filter surfaces. The final filter containing particles  $\leq 1.0 \mu\text{m}$  presented a homogeneous distribution, so it was divided into two parts, with one used for chemical analysis and the other for *in vitro* toxicity experiments.

## 2.3. Determination of PACs

PACs were extracted following the methodology described by Scaramboni et al. (2021). Briefly, the filters were extracted three times with 4.0 mL of acetonitrile (Supelco), for 34 min, in an ultrasonic bath. The combined extract was evaporated down to approximately 0.5 mL under reduced pressure, filtered (0.2  $\mu\text{m}$  pore size membrane), and dried under a gentle flow of nitrogen. After resuspension in 100  $\mu\text{L}$  of acetonitrile, a volume of 2  $\mu\text{L}$  was injected into a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer (GCMS-QP2010, Shimadzu), with automatic injection using an AOC-20i autosampler (Shimadzu). The column used was an SLB®-5ms Capillary GC Column (Sigma-Aldrich). Analysis was performed in selected ion monitoring (SIM) mode.

Fifteen PAHs were determined: fluorene (Flu), phenanthrene (Phe), anthracene (Ant), fluoranthene (Flt), pyrene (Pyr), retene (Ret), benz[a]anthracene (B[a]A), chrysene (Chry), benzo[b]fluoranthene (B[b]F), benzo[k]fluoranthene (B[k]F), benzo[e]pyrene (B[e]P), benzo[a]pyrene (B[a]P), indeno[1,2,3-cd]pyrene (Ind), dibenz[a,h]anthracene (DBA), and benzo[ghi]perylene (B[ghi]P). Four OPAHs were determined: 9,10-phenanthrenequinone (9,10-PQ), 9,10-antraquinone (9,10-AQ), benzo[a]fluorenone (BFLO), and 6H-benzo[cd]pyren-6-one (6H-BPO). Six NPAHs were determined: 5-nitroacenaphthene (5-NAce), 2-nitrofluorene (2-NFlu), 9-nitroanthracene (9-NAnt), 3-nitrofluoranthene (3-NFlt), 1-nitropyrene (1-NPyr), and 6-nitrobenzo[a]pyrene (6-NB[a]P). These OPAHs and NPAHs were selected due to their toxicity and abundance in the atmosphere. For instance, 9,10-AQ is one of the most abundant OPAHs in the atmospheric PM while 6H-BPO has been shown to be mutagenic and a strong tumor promotor in human cell lines (Clergé et al., 2019). The compound 9-NAnt is one of the most abundant NPAHs in atmospheric PM (Bandowe and Meusel, 2017). In the case of 1-NPyr, 2-NFlu and 5-NAnt, they are classified as probably or/possibly



Fig. 1. Map showing the location of the city of Ribeirão Preto in São Paulo state, Brazil. The sampling sites are indicated by A (semi-urban) and B (urban).



carcinogenic to humans (IARC, 2012), while 3-NFlt has mutagenic activity on *Salmonella typhimurium* (Idowu et al., 2019).

#### 2.4. Determination of anhydrosugars

Part of the same extract used for PACs analysis was used for the determination of levoglucosan (LEV), mannosan (MAN), and galactosan (GAL), also by GC-MS. After injection for PAHs determination, the remaining extract was dried under a gentle flow of nitrogen and derivatized for 3 h, at 70 °C, with 40 µL of N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide (BSTFA) containing 1% trimethylchlorosilane (TMCS; Sigma-Aldrich) and 10 µL of pyridine (Merck). Hexane (950 µL) was added to the derivatized extract, the mixture was homogenized, and 1 µL was injected into the GC-MS system. The chromatographic parameters for the anhydrosugars determination were as described by Carvalho et al. (2023).

#### 2.5. Quality assurance/quality control (QA/QC)

The complete analytical, quality assurance and quality control procedures for the determination of PAHs, NPAHs, and OPAHs are presented in detail elsewhere (Scaramboni et al., 2021). The instrumental limit of detection (LOD) was established based on a signal-to-noise ratio of 3, while the limit of quantification (LOQ) was set as the lowest concentration of the analytical curves (ICH, 2005). The LOD for PM analysis was then conservatively estimated by dividing the instrumental LOD by the lowest sampled volume (128 m<sup>3</sup>). LOD and LOQ for all PACs and anhydrosugars are listed in Table S2 in both units, ng mL<sup>-1</sup> and ng m<sup>-3</sup>. Among 1596 data points, only 10% of the values were below LOD.

All analytical curves were built by spiking target and internal standards in blank filters that were extracted prior analysis. The deuterated internal standards used were: phenanthrene-*d*<sub>10</sub>, chrysene-*d*<sub>12</sub>, perylene-*d*<sub>12</sub>, 9,10-anthraquinone-*d*<sub>8</sub>, 9-nitroanthracene-*d*<sub>8</sub>, and levoglucosan-<sup>13</sup>C. Linear working ranges and correlation coefficients are provided for all PACs and anhydrosugars in Table S2. Precision was better than 19% (n = 9), and the accuracy was assessed using two different approaches (IUPAC, 2002). In the first case, known amounts of PAH certified standards were spiked onto a sampled filter to preserve the matrix. Recoveries ranges were: 76–128% (PAHs), 80–117% (OPAHs), and 48–113% (NPAHs) (Scaramboni et al., 2021). Another accuracy test was performed using 2 p.m.<sub>1.0</sub> samples collected in parallel using two identical samplers. Two different extraction procedures were used: one using the solvent employed here (acetonitrile), and another one that is employed in the reference method (dichloromethane and methanol; Urban et al., 2016). The good agreement between both extraction methods is shown by the ratios between signal responses with a mean of 0.90 ± 0.18 (n = 28; Scaramboni et al., 2021). To validate the method for the anhydrosugars, both types of extraction were also performed using 16 p.m.<sub>1.0</sub> samples. The good agreement between the methods is indicated by the angular and correlation coefficients close to the unit (Fig. S2).

Blank tests were performed extracting and analyzing blank quartz fiber filters, which resulted into < LOD signals for all studied PACs and anhydrosugars.

#### 2.6. Cancer risk assessment

The carcinogenic activity of the environmental mixtures of PAHs was expressed in terms of the benzo[a]pyrene equivalent concentration (B[a]P<sub>eq</sub>), calculated according to Equation (1) (USEPA, 2010).

$$B[a]P_{eq} = \sum_{i=1}^{n=i} (C_i \times RPF_i) \quad \text{Equation 1}$$

where,  $C_i$  is the concentration and  $RPF_i$  is the relative potency factor of the individual 'i' PAHs classified as carcinogenic by IARC (Table S3).

The lifetime excess cancer risk (LECR) was estimated using only B[a]P as an index compound of the PAHs mixture, by multiplying the concentration of B[a]P by the unit risk value of  $8.7 \times 10^{-5}$  per ng m<sup>-3</sup>, which was suggested by the World Health Organization based on epidemiological studies with coke-oven workers. It means that approximately 9 out of 100,000 people may develop lung cancer when chronically exposed to 1 ng m<sup>-3</sup> of B [a]P over an adult lifetime of 70 years (WHO, 2000).

#### 2.7. Cell culture and extract preparation

Human-derived hepatocellular carcinoma cells (HepG2) were obtained from the American Type Culture Collection (HB-8065, ATCC, Rockville, MD, USA). The cells were grown in minimal essential medium (MEM, Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1 mmol/L sodium pyruvate, 0.1 mmol/L nonessential amino acids, 100 units/mL penicillin, and 0.1 mg/mL streptomycin (Sigma), at 37 °C, in 5% CO<sub>2</sub>.

Three representative samples were studied, consisting of two from the dry season and one from the wet season. Half of the final filter containing PM < 1 µm was extracted using the same method employed for the chemical analysis, dried under a gentle flow of nitrogen, and redissolved in sterile dimethyl sulfoxide (DMSO, >99.7%, Merck). The final concentration of the organic extracts corresponded to 1 m<sup>3</sup> of sampled air in 1 mL of medium containing the cells. A field blank membrane was submitted to the same extraction procedure, redissolved in DMSO, and used as a blank control in the *in vitro* studies. DMSO was used as the negative control (NC) in all the assays, as well as to dissolve the positive controls. The final DMSO concentration in the medium did not exceed 1.0% (v/v).

#### 2.8. MTT assay

Cell viability was evaluated indirectly by measuring the reduction of MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) to the formazan salt by metabolically active cells (Mosmann, 1983). HepG2 cells ( $5 \times 10^4$ /well) were plated in 96-well plates (Corning Inc., USA) and incubated for 24 h before exposure. The cells were exposed to PM extract for 24, 48, and 72 h. DMSO and carbonyl cyanide-3-chlorophenylhydrazone (CCCP, 10 µmol/L) were used as negative and positive controls, respectively. Following exposure, the cells were incubated for 3 h with MTT solution (0.5 mg/mL) in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) without phenol red. The formazan salt produced was dissolved in DMSO and the plates were analyzed spectrophotometrically at 570 nm (SpectraMax i3x, Molecular Devices).

#### 2.9. Comet assay

DNA strand breaks were detected using the alkaline comet assay, according to the protocol described by Tice et al. (2000). HepG2 cells ( $1 \times 10^6$ /well) were plated in 12-well plates (Corning Inc., USA) and incubated for 24 h before exposure. The cells were exposed to PM extracts for 4 and 24 h. DMSO and methyl methanesulfonate (MMS, 0.13 µmol/L) were used as negative and positive controls, respectively. Nucleoids were visualized using an Olympus Bx50 fluorescence microscope. Tail intensity (DNA percentage in the comet tail) was measured using Comet Assay IV software (Perspective, UK).

#### 2.10. Supporting and meteorological data

Air mass back-trajectories were generated using the Hybrid Single Particle Lagrangian Integrated Trajectory (HYSPPLIT) model developed by the Air Resources Laboratory of the National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) (Stein et al., 2015). The numbers of fire spots in São Paulo state were obtained from the National Institute for Space Research website (INPE, 2023b).

Meteorological data for air temperature, relative humidity, precipitation, wind speed, and solar radiation were obtained from the São Paulo State Integrated Center of Agrometeorological Information website (CIIAGRO, 2023).

### 2.11. Statistical analysis

The normality of the chemical analysis data was evaluated using the Shapiro-Wilk test. Due to the non-normal distribution of the data, median values  $\pm$  interquartile ranges (IQR) were obtained, with nonparametric tools being employed to compare medians (Mann-Whitney test) and to find correlations between variables (Spearman's rank correlation coefficient,  $\rho$ ), using the software Statistica 14.0 (TIBCO)

Principal component analysis (PCA) was used to reduce the large number of variables to a smaller number of factors, in order to better understand the emission sources. Before the statistical analysis, values below the limit of detection (LOD) were substituted by LOD/2 and all the values were autoscaled. Components with eigenvalues higher than 1 were extracted from the covariance matrix.

The toxicological data were obtained as mean values  $\pm$  standard errors (SE) for at least three independent experiments. Differences between the dose groups and the negative control were tested for significance using one-way or two-way analysis of variance (ANOVA), followed by Dunnett's multiple comparison test. Differences between the positive and negative controls were tested for significance ( $p < 0.05$ ) using the unpaired *t*-test. GraphPad Prism 8 (GraphPad Inc.) software was used for these tests.

## 3. Results and discussion

### 3.1. PACs size distribution according to molecular weight and vapor pressure

Although they are mostly associated with fine particles, PAHs and derivatives can migrate from fine to coarse particles by volatilization and sorption (Zhang et al., 2020). Due to their semi-volatility, the proportions of PAHs, OPAHs, and NPAHs in the coarse and fine modes are influenced by ambient temperature, proximity to the emission source, and physicochemical properties such as molecular weight (MW) and vapor pressure (Vp) (Keyte et al., 2013). Here, it was observed that low MW compounds (LMW, 3–4 aromatic rings) had a higher proportion in the coarse mode (9–27%), compared to PACs with 5 or more aromatic rings (4–12%), which were more abundant in the fine mode. The mass fractions of PAHs, OPAHs, and NPAHs in the coarse mode were positively correlated with Vp ( $\rho = 0.736$ ,  $p < 0.05$ ,  $n = 25$ ) and negatively correlated with MW ( $\rho = -0.798$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 2). High MW (HMW) PAHs generally have lower Vp, so the time required to partition from fine to large particles is longer than for LMW PAHs. Partitioning is also influenced by the ambient temperature, but no correlation was found

between the coarse mode mass fraction and ambient temperature, for any compound, which was probably due to only small variations in temperature during the year in the study region.

It is well known that the environmental fate and health effects of particulate PAHs are strongly dependent on PM size (Zhang et al., 2020). HMW PAHs, which are more carcinogenic than LMW PAHs, tend to be bound to finer particles and consequently can penetrate deeper into the human respiratory system, increasing the risk to human health. In addition, fine particles have extended atmospheric residence times and can be transported over long distances.

### 3.2. Distribution of PACs

The larger PM size fractions ( $PM_{10-18}$  and  $PM_{>18}$ ) represented on average only 4% of the total aromatic compounds determined in all the fractions, so they were not the subject of further investigation in this work. The complete dataset with the individual PAC concentrations determined at each fraction is presented as a supplement spreadsheet in the Excel format.

In  $PM < 10 \mu m$  ( $PM_{1.0} + PM_{1.0-2.5} + PM_{2.5-10}$ ), the total concentrations of the 15 PAHs ( $\Sigma PAH$ ) ranged from 0.29 to  $7.2 \text{ ng m}^{-3}$ , with a median of  $2.3 \pm 1.8 \text{ ng m}^{-3}$  ( $n = 19$ ; Fig. 3A). The  $\Sigma PAH$  contributions were greater in  $PM_{1.0}$  ( $63 \pm 21\%$ ) and  $PM_{1.0-2.5}$  ( $23 \pm 9\%$ ) than in  $PM_{2.5-10}$  ( $13 \pm 10\%$ ). This was expected, given the influence of fine PM emissions from biomass burning and fossil fuel combustion in the study region (Urban et al., 2012).

The total concentrations of the 4 OPAHs ( $\Sigma OPAH$ ) were around an order of magnitude lower than  $\Sigma PAH$ , ranging from 0.02 to  $0.81 \text{ ng m}^{-3}$ , with a median of  $0.23 \pm 0.21 \text{ ng m}^{-3}$  ( $n = 19$ ; Fig. 3B). As observed for the PAHs, the  $\Sigma OPAH$  fractions were higher in  $PM_{1.0}$  ( $63 \pm 10\%$ ) and  $PM_{1.0-2.5}$  ( $21 \pm 7\%$ ) than in  $PM_{2.5-10}$  ( $17 \pm 7\%$ ). Besides being emitted directly from combustion processes, OPAHs can be formed from the parent PAHs by photooxidation in the atmosphere (Walgraeve et al., 2010). These secondary OPAHs undergo mass transfer from the gas phase to particles with similar size distribution as combustion particles, so OPAHs are also expected to be mainly associated with fine PM (Allen et al., 1997).

The total concentrations of the 6 NPAHs ( $\Sigma NPAH$ ) ranged from 0.27 to  $1.31 \text{ ng m}^{-3}$ , with a median of  $0.46 \pm 0.41 \text{ ng m}^{-3}$  and higher fractions in  $PM_{1.0}$  ( $51 \pm 19\%$ ) and  $PM_{1.0-2.5}$  ( $29 \pm 15\%$ ) than in  $PM_{2.5-10}$  ( $17 \pm 12\%$ ) (Fig. 3C). A higher proportion of NPAHs is expected to be associated with fine particles, since these compounds are generated by incomplete combustion and pyrolysis of fossil fuels and biomass, as well as by heterogeneous oxidation of particle-bound PAHs (Bandowe and Meusel, 2017).

The concentrations of  $\Sigma PAH$  found for all the fractions were similar to those observed in  $PM_{10}$  collected in the city of São Carlos from 2015 to 2018 (annual means between 0.98 and  $2.03 \text{ ng m}^{-3}$ ; Carvalho et al., 2023), as well as in  $PM_{2.5}$  collected in Araraquara in 2014 (average of

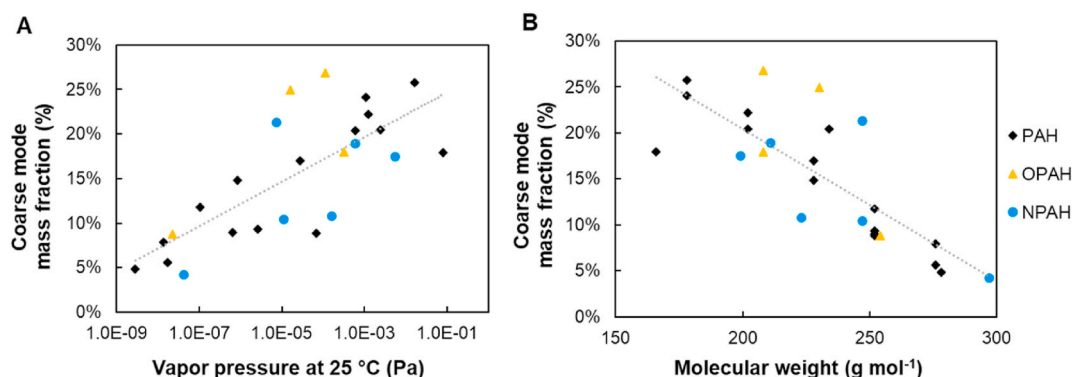
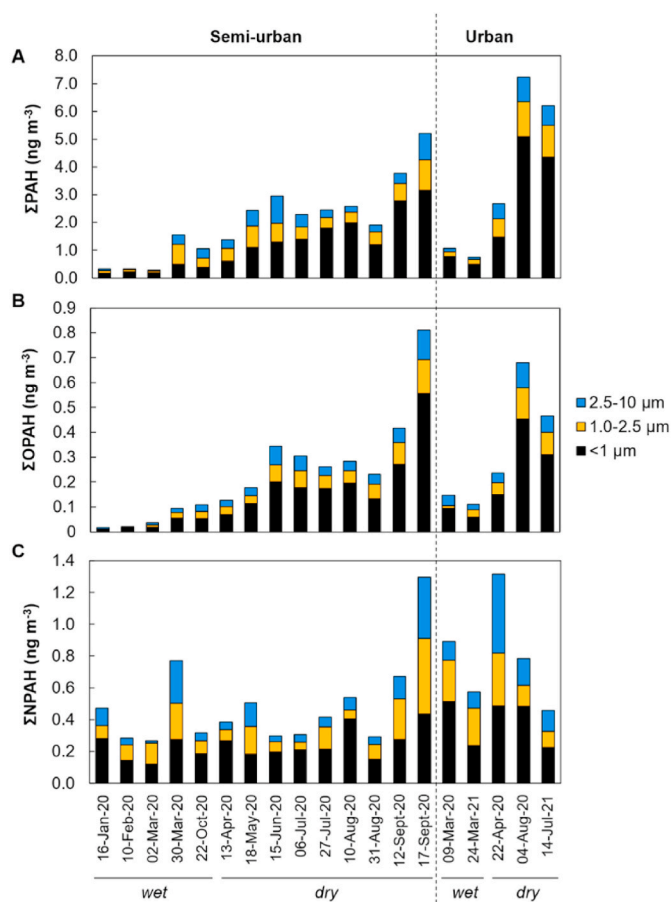


Fig. 2. Median PAHs, OPAHs, and NPAHs mass fractions in the coarse mode ( $PM_{2.5-10}$ ), according to (A) vapor pressure and (B) molecular weight.



**Fig. 3.** Size and seasonal distributions of the total concentrations of PAHs, OPAHs, and NPAHs in PM collected at the semi-urban ( $n = 14$ ) and urban ( $n = 5$ ) sites in Ribeirão Preto.

$2.1 \text{ ng m}^{-3}$ ; Gonçalves et al., 2017). Both cities are located  $\sim 80 \text{ km}$  from Ribeirão Preto and are also strongly impacted by biomass burning and industrial use of sugarcane bagasse as fuel. These relatively recently reported  $\Sigma\text{PAH}$  values are about 2–8 times lower than those observed for the same region in previous years (2008–2010), when manual harvesting using fire represented an important proportion of the sugarcane production (Silva et al., 2010; Souza et al., 2014). Concentrations of  $\Sigma\text{PAH}$  found in this work were also similar to those reported in  $\text{PM}_{10}$  collected in the arc of deforestation in the Brazilian Amazon, where biomass burning is notorious (means:  $2.0\text{--}3.4 \text{ ng m}^{-3}$ ; de Oliveira Alves et al., 2015). The emissions of PAHs during biomass burning are greatly influenced by the type of biomass, as well as the type of fire, whether smoldering or flaming (Alves et al., 2011). High inputs of PAHs due to vehicular emissions were observed in 2014 in the city of São Paulo (ca. 12 million inhabitants), with a mean concentration of  $18.4 \text{ ng m}^{-3}$  in  $\text{PM}_{2.5}$  (Pereira et al., 2017).

The temporal profiles of  $\Sigma\text{PAH}$  and  $\Sigma\text{OPAH}$  were similar (Fig. 3A and B), with concentrations being lower in the wet season and higher in the dry season. A strong positive significant correlation was observed between these two compound classes in  $\text{PM} < 2.5 \mu\text{m}$  ( $\rho = 0.932$ ,  $p < 0.01$ ), indicating that they had similar sources and/or that OPAHs were formed from oxidation of the parent PAHs in the atmosphere. In contrast,  $\Sigma\text{NPAH}$  showed no clear trend and did not correlate with either  $\Sigma\text{PAH}$  or  $\Sigma\text{OPAH}$ , indicating that different sources contributed to the NPAHs.

The median concentrations of  $\Sigma\text{PAH}$  and  $\Sigma\text{OPAH}$  in  $\text{PM} < 2.5 \mu\text{m}$  from the urban site ( $2.1$  and  $0.20 \text{ ng m}^{-3}$ , respectively) were not significantly different from those for the semi-urban site ( $1.8$  and  $0.17$

$\text{ng m}^{-3}$ , respectively), despite the intense vehicle traffic (including buses) in the vicinity of the urban site, evidencing the importance of biomass burning sources. In contrast, the median concentration of  $\Sigma\text{NPAH}$  for the urban site ( $0.62 \text{ ng m}^{-3}$ ) was approximately double the value for the semi-urban site ( $0.38 \text{ ng m}^{-3}$ ), although this difference was not statistically significant (Mann-Whitney test,  $p = 0.058$ ). This suggested that vehicular sources, especially diesel vehicle exhaust, could have made the greatest contribution to the NPAHs present in the samples.

### 3.3. Seasonality

Compared to the effect of sampling location, seasonality had a greater influence on the concentrations of the PAHs and derivatives. Concentrations of 19 out of 20 PAHs and OPAHs were significantly higher in the dry season than in the wet season (Fig. 4). The percentage of data points below LOD in the wet and dry seasons were 9% and 3% respectively, corresponding to a small proportion of the total, and therefore should not diminish the reliability of the results (Table S4).

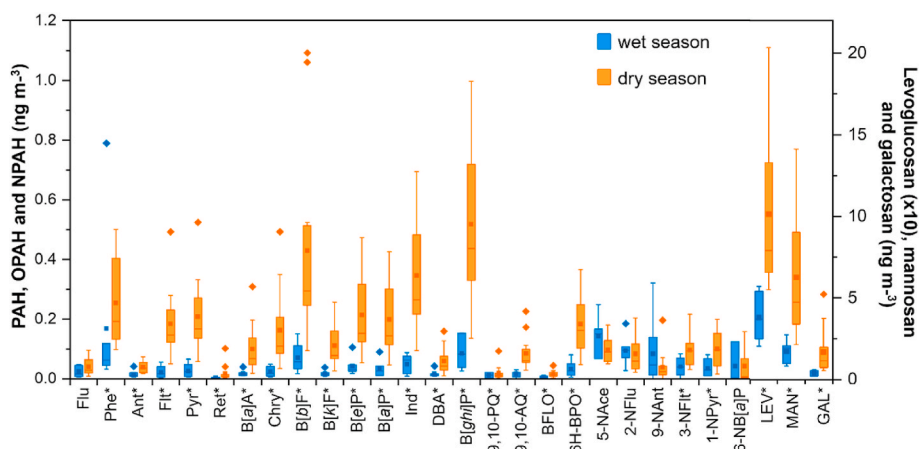
Among the NPAHs, only 3-NFlt and 1-NPyr presented significantly higher concentrations in the dry season. The concentrations of 2-NFlu and 9-NAnt were higher than their parent PAHs in  $\text{PM}_{2.5}$  collected in both wet and dry seasons. A possible reason for that is the fact that these NPAHs have higher molecular weight and lower vapor pressure (2-NFlu:  $5.9 \times 10^{-4} \text{ Pa}$ ; 9-NAnt:  $1.6 \times 10^{-4} \text{ Pa}$  at  $25^\circ\text{C}$ ) than their parent PAHs (Flu:  $8.0 \times 10^{-2} \text{ Pa}$ ; Ant:  $1.1 \times 10^{-3} \text{ Pa}$  at  $25^\circ\text{C}$ ). Therefore, they are more likely to be present in the particulate phase compared to their relatively volatile parent PAHs (Souza et al., 2014). Moreover, specific polar interactions of the NPAHs with carbonaceous materials in PM (which is different from those of non-polar compounds) may contribute to the higher fraction of NPAHs in the particulate phase (Bandowe and Meusel, 2017). It is known that the concentrations of light PAHs, such as Flu and Ant, are higher in the gas phase than in the particulate phase (Kim et al., 2013) and that is the reason why we see lower concentration of these compounds in PM compared with their nitrated congeners.

The concentrations of levoglucosan, a specific tracer for cellulose pyrolysis (Simoneit et al., 1999; Urban et al., 2012), as well as its isomers mannosan and galactosan, were also higher in the dry season than in the wet season (Fig. 4), providing further evidence of the important influence of biomass burning in the study region. Other chemical markers such as water-soluble ionic species and the diagnostic ratio between organic carbon and elemental carbon (OC/EC) are also widely used as biomass burning tracers (Pongpiachan et al., 2022b). The concentration of species such as potassium and water-soluble dissolved carbon in rainwater and PM collected in the same study region showed a large increase during the dry season, when the majority of the biomass fires occurs (Gonçalves et al., 2017; Godoy-Silva et al., 2017; Coelho et al., 2011). Moreover, Gonçalves et al. (2017) observed a good correlation between potassium and levoglucosan in  $\text{PM}_{2.5}$ . In this work, we selected levoglucosan and its isomers as tracers of biomass burning due to their high specificity and their atmospheric stability (Janta et al., 2020; Urban et al., 2012). Additionally, the fact that we were able to use the same organic extract to determine PAHs and levoglucosan simplified the analysis.

Meteorological variables are known to affect the concentrations and compositions of particles in the atmosphere (Tai et al., 2010). As expected, during sampling, the local relative humidity was lower in the dry season, while the numbers of fire foci in São Paulo state were higher than in the wet season. Temperature and wind speed did not significantly differ between seasons (Table S5).

The concentrations of most of the PAHs, particularly those for which the medians were significantly different between the dry and wet seasons, were negatively correlated with relative humidity, while positive correlations were obtained with levoglucosan, the number of previous days without rain, and the number of fire foci (Table S6). No correlations were found with solar radiation and temperature. These results





**Fig. 4.** Box plots of the concentrations of PAHs, OPAHs, NPAHs, and anhydrosugars in  $PM_{2.5}$  collected at both semi-urban and urban sites in Ribeirão Preto, during the wet season ( $n = 7$ ) and dry season ( $n = 12$ ). The middle line in the box represents the median; the lower box is the first quartile; the upper box is the third quartile; the error bars indicate minimum and maximum values; (■) mean; (◆) outliers. An asterisk (\*) next to the compound name indicates a significant difference between the medians for each season (Mann-Whitney test;  $p < 0.05$ ). Note that the values shown for levoglucosan (LEV) have been reduced by a factor of ten.

suggested that the observed seasonality was mainly influenced by rain, relative humidity, and biomass burning in the region. Since the burning occurred more frequently during the dry season, it led to higher emissions to the atmosphere, aggravated by the low removal of particle-bound PAHs by wet deposition, as observed in other tropical Brazilian cities (Carvalho et al., 2023; de Oliveira Alves et al., 2015; de Oliveira Galvão et al., 2018). Only in the southern region of Brazil, where the climate is temperate, could higher concentrations of PAHs during winter be explained by lower temperatures and lower boundary layer heights that prevented the dispersion of pollutants (Agudelo-Castañeda and Teixeira, 2014).

### 3.4. Identification of emission sources

The contributions of different sources to PM emission can be identified and quantified by several methods, such as positive matrix factorization (PMF), principal component analysis (PCA), and chemical mass balance (CMB) (Galvão et al., 2021). CMB requires detailed knowledge of the sources and emission profiles at the receptor areas, which are currently not available at the studied sites. PMF and PCA require only ambient observations (including measurement uncertainties for PMF), therefore they would be more suitable for our study. Several attempts were made to run PMF, however it had not resolved the data satisfactorily, resulting in unadjusted models. This was probably due to the limited number of samples ( $n = 19$ ) relative to the number of compounds determined ( $n = 28$ ). Additionally, the effectiveness of PMF can be weakened when source emissions have a temporal correlation or when meteorology has a relevant impact on PM variability (Gianini et al., 2013). In our study region, the seasonality has a strong effect on the PM composition, and therefore, PMF model may not disclose the real emission sources. Therefore, PCA was selected to simplify the complexity of the high-dimensional data, while at the same time retaining trends and patterns that could assist in elucidating possible emission sources of the PAHs at the sampling sites. Although PCA has limitations to resolve strongly non-linear relationships between the variables and to capture the full complexity of source contributions, it is a useful technique widely applied to identify major sources (Lara et al., 2022), which in our case, is sufficient to accomplish the aims here proposed.

The extraction of three components was able to explain 84.8% of the variability in the data, with the first and second components (PC1 and PC2) accounting for 65.3% and 10.8% of the variability, respectively (Table S7). The scores plot, which represents the similarity relations between samples, clearly indicated separation between the two groups

of samples corresponding to the wet and dry seasons, which was mainly driven by PC1 (Fig. 5A). The loadings plot for PC1 and PC2 (correlation between the principal components and the original variables), shown in Fig. 5B, indicates the analytes that most contributed to the groupings observed in the scores plot.

PC1 showed high loadings for the anhydrosugars levoglucosan, mannosan, and galactosan, which are specific markers of biomass burning (Fig. 5B and Table S7). Most of the PAHs and OPAHs also presented high loadings in PC1, suggesting that these compounds shared a source with the biomass burning markers. A second cluster of variables was separated from the main group in PC1 (Fig. 5B). Considering the compounds in this cluster, 2-NFlu, 9-NAnt, and 6-NB[a]P have been reported in particles from diesel exhaust emissions (IARC, 2012; Papatuta-Peck et al., 1983). Interestingly, 2-NFlu was the most abundant PAC found in  $PM_{1.0}$  and  $PM_{2.5}$  from diesel engines fueled with diesel blended with biofuels (biodiesel and ethanol), which are extensively used in Brazil (Paim et al., 2023). Phe is a light PAH that can be emitted from biomass burning and/or diesel-powered vehicles (Ravindra et al., 2008; Simoneit, 2002). There was a significant positive correlation between 9, 10-PQ and Phe ( $\rho = 0.755$ ,  $p < 0.01$ ; Table S6), which could be explained by the fact that 9,10-PQ can be either emitted directly or be formed by Phe oxidation (Wang et al., 2007). These observations were indicative of a substantial contribution of diesel exhaust emissions in PC2.

The compound 5-NAce presented near-zero loadings in PC1 and PC2. Few studies have reported ambient concentrations of 5-NAce, which in chamber studies was observed as a product of OH radical-initiated gas-phase reactions (Arey et al., 1989; Bamford and Baker, 2003). PC3 explained 8.7% of the total variance and had low loadings, so no specific source could be associated with this component.

Evaluation of seasonal trends revealed that the most abundant PAHs in  $PM_{2.5}$  in the wet season were Phe (18%), B[ghi]P (15%), B[b]F (12%), B[e]P (7.4%), and Ind (6.9%), while in the dry season the most abundant were B[ghi]P (19%), B[b]F (14%), Ind (12%), Pyr (7.9%), and Flt (6.9%). Among these, B[b]F and Ind are classified by IARC as possibly carcinogenic to humans (Group 2B), with sufficient evidence of carcinogenicity in experimental animals (IARC, 2010).

The most abundant OPAHs in both seasons were 6H-BFO and 9,10-AQ, accounting for 43 and 28%, respectively, of  $\Sigma$ OPAH in the wet season, and for 61 and 27%, respectively, in the dry season. 6H-BFO has been shown to be mutagenic and a strong tumor promotor in human cell lines (Clergé et al., 2019). Among the NPAHs, 5-NAce (31%), 2-NFlu (21%), and 9-NAnt (15%) were the most abundant in the wet season, while 1-NPyr (22%), 5-NAce (21%), and 3-NFlt (20%) were the most

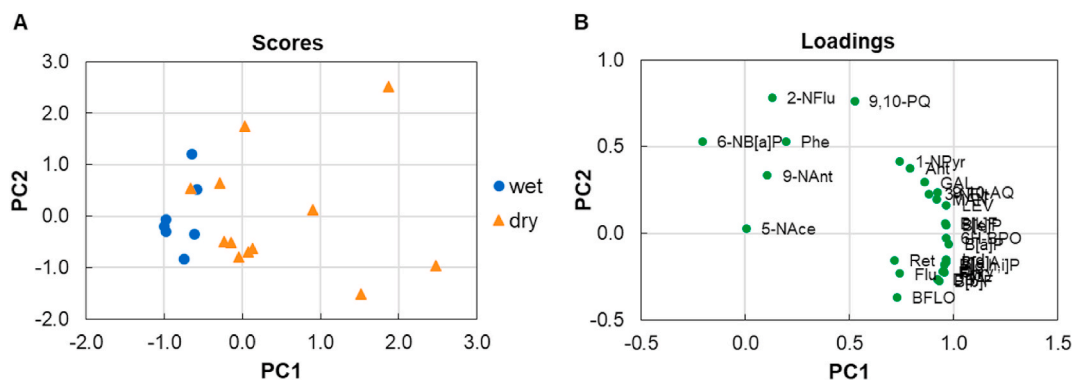


Fig. 5. (A) Scores plot and (B) loadings plot for PC1 vs. PC2, obtained from principal component analysis of the 19 samples of PM<sub>2.5</sub>.

abundant in the dry season. 1-NPyr is classified as probably carcinogenic to humans (Group 2A), while 2-NFlu and 5-NAce are possibly carcinogenic to humans (Group 2B) (IARC, 2012; OEHHA, 2011). Therefore, it was evident that the PM characterized here contained organic compounds that are potentially harmful to human health, indicating the need to investigate health risks.

### 3.5. Cancer risk assessment

The carcinogenic activity of the PAHs mixture was expressed as B[a]P equivalent (B[a]P<sub>eq</sub>) concentrations, using a relative potency factor (RPF) for each carcinogenic PAH determined (Table S3). In this work, the B[a]P<sub>eq</sub> concentrations in PM<sub>2.5</sub> ranged from 0.13 to 3.0 ng m<sup>-3</sup> (n = 19), with the median for the dry season (0.82 ng m<sup>-3</sup>) being approximately four times higher than the median for the wet season (0.22 ng m<sup>-3</sup>), indicating a higher carcinogenic activity of PM mainly associated with biomass burning. The B[a]P<sub>eq</sub> concentration was also determined for an extreme event that occurred on September 18<sup>th</sup>, 2020, when 10 fire foci were recorded within the perimeter of the municipality of Ribeirão Preto, resulting in the burning of over 10 ha of vegetation and sugarcane crops. During the following morning, an intense layer of haze covered the city and sampling of total PM was performed during 6 h (07:35–13:50). The levoglucosan concentration obtained was 1225 ng m<sup>-3</sup>, which was 15 times higher than the median concentration determined for the dry season. The B[a]P<sub>eq</sub> concentration for this sample was 18.8 ng m<sup>-3</sup>, which was ~23 times higher than the median B[a]P<sub>eq</sub> determined in PM<sub>2.5</sub> collected in the dry season, evidencing that health risks can be greatly enhanced due to extreme events. Besides the large number of local fires, a general increase in the levels of PM was observed across the whole of São Paulo state between September 18<sup>th</sup> and 19<sup>th</sup>, associated with wildfires in the mid-west region of the country (Fig. S3) (CETESB, 2020b). Light winds at low levels of the atmosphere, together with lowering of the mixed boundary layer, resulted in an average PM<sub>2.5</sub> concentration (24 h) of 113 μg m<sup>-3</sup> in Ribeirão Preto, which was 7.5 times higher than the guideline value established by the World Health Organization (CETESB, 2020b, WHO, 2021). Ribeirão Preto had the poorest air quality among all the cities monitored in São Paulo state on September 19<sup>th</sup>, 2020, showing that biomass burning could still be considered a relevant risk factor for the health of the population living in the area.

Although several studies have employed B[a]P<sub>eq</sub> concentrations to calculate lifetime excess cancer risk (LECR), using the WHO unit risk value, this approach has been questioned, since the WHO unit risk was estimated from the concentration of B[a]P alone as a surrogate for the entire mixture of PAHs (Aquilina and Harrison, 2023). Therefore, in this work, the LECR was calculated by multiplying only the B[a]P concentrations determined for the PM<sub>2.5</sub> samples by the WHO unit risk value ( $8.7 \times 10^{-5}$  lung cancer cases per ng m<sup>-3</sup> of B[a]P). The LECR ranged from  $9.4 \times 10^{-7}$  to  $3.7 \times 10^{-5}$ , which corresponds to an excess of

approximately 0.1–3.7 lung cancer cases per 100,000 people. These estimated cancer risk values were similar to those calculated here based on the B[a]P concentrations reported in the Amazon region (0.2–5.0 lung cancer cases per 100,000 people; de Oliveira Alves et al., 2015), but were 1–2 orders of magnitude lower than those calculated from data reported for the megacity of São Paulo, where there are high vehicular and industrial inputs (6–200 lung cancer cases per 100,000 people; Caumo et al., 2022).

Some limitations related to the cancer risk estimation performed here should be mentioned. PACs with high toxic potential, such as NPAHs and PAHs with MW > 300, including isomers of dibenzopyrenes, were not included in the calculation of B[a]P<sub>eq</sub> concentrations according to USEPA, therefore the LECR values calculated here are probably underestimated. It has also been suggested that assessing the risk of cancer due to exposure to environmental PAHs using a single marker or a component-based factors approach may not accurately represent the actual health risk of exposure to complex mixtures of PAHs, which should preferably be studied as whole mixtures (Aquilina and Harrison, 2023; Dreij et al., 2017).

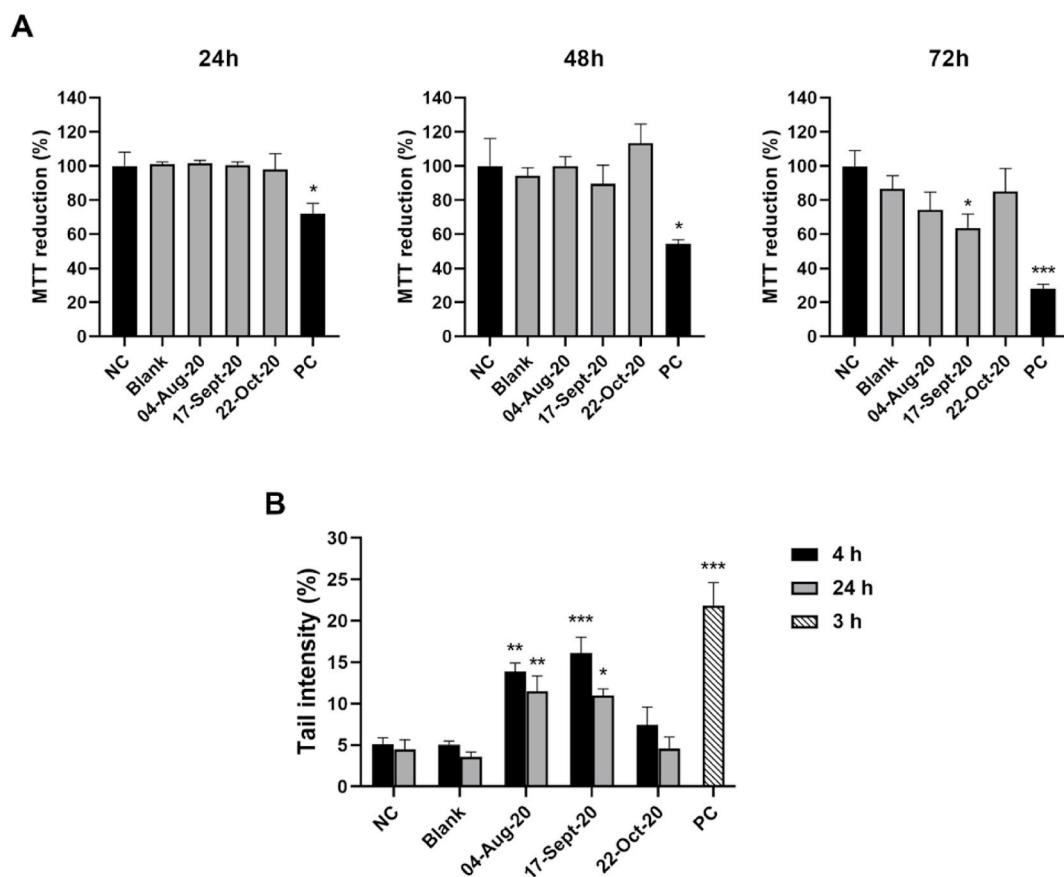
### 3.6. In vitro toxicity of PM extracts

The cytotoxic and genotoxic effects of the PM were evaluated by exposing HepG2 cells to three different organic extracts of PM<sub>1.0</sub> samples. These extracts were adjusted to have the same final concentration, which was equivalent to 1 m<sup>3</sup> of sampled air in 1 mL of the medium containing the cells (Table 1).

The MTT assay was used to determine HepG2 cell viability following exposure to the extracts. No significant changes were observed in cell viability after 24 and 48 h of exposure to any of the samples tested (Fig. 6A). However, at 72 h, cell viability decreased significantly ( $p < 0.05$ ) to 64% after exposure to the extract of the sample collected on September 17<sup>th</sup>, 2020, indicating that this extract was potentially cytotoxic to HepG2 cells. Interestingly, this sample presented lower ΣPAH and B[a]P<sub>eq</sub> concentrations than the sample collected on August 4<sup>th</sup>, 2020, which resulted in a cell viability decrease that was not statistically significant. This could be explained by the fact that effects

**Table 1**  
Concentrations of PACs and levoglucosan obtained for the samples used in the *in vitro* study.

Sample (PM < 1 μm)	ΣPAH (ng m <sup>-3</sup> )	ΣOPAH (ng m <sup>-3</sup> )	ΣNPAH (ng m <sup>-3</sup> )	B[a]P <sub>eq</sub> (ng m <sup>-3</sup> )	Levoglucosan (ng m <sup>-3</sup> )
<i>Dry season</i>					
04-Aug-20	5.10	0.45	0.48	3.00	138
17-Sept-20	3.17	0.56	0.44	1.59	139
<i>Wet season</i>					
22-Oct-20	0.38	0.05	0.19	0.25	18.3



**Fig. 6.** (A) Percentage of MTT reduction by HepG2 cells after exposure to PM<sub>1</sub> extracts at 1 m<sup>3</sup> air equivalent per mL for 24, 48, and 72 h. CCCP (10 μmol/L) was used as a positive control (PC). (B) Tail intensity of HepG2 nucleoids after exposure to PM<sub>1</sub> extracts at 1 m<sup>3</sup> air equivalent per mL for 4 and 24 h, assessed by comet assay. MMS (0.13 μmol/L) was used as a positive control (PC). Data are shown as mean ± SE (n = 3), with \*\*\*p < 0.001, \*\*p < 0.01, and \*p < 0.05, when compared to the DMSO control (NC).

caused by PAHs are not simply based on additive mixture effects, but may result from unknown intra-mixture interactions (Jarvis et al., 2013).

The induction of DNA strand breaks in HepG2 cells was evaluated using the comet assay. The two extracts corresponding to the samples collected during the dry season caused DNA damage 4 h post-exposure, with a significant increase of ~3-fold, compared to the negative control (p < 0.01-0.001; Fig. 6B). Conversely, the wet season extract did not cause a significant increase in DNA damage, compared to the negative control. Corroborating the MTT assay results, the sample collected on September 17<sup>th</sup>, 2020 had a slightly stronger effect than the one collected on August 4<sup>th</sup>, 2020, despite the lower ΣPAH and B[a]P<sub>eq</sub> concentrations.

The dry season PM extracts showed higher inputs from biomass burning, as evidenced by the higher levoglucosan concentrations, when compared to the wet season extract. Therefore, the increased genotoxicity could be associated with the impact of biomass burning as a source of hazardous chemicals in the PM from Ribeirão Preto, as observed previously for the effects of extracts of PM from the Amazon region on human lung cells (De Oliveira Alves et al., 2014; de Oliveira Galvão et al., 2018).

Interestingly, after exposure for 24 h, which was sufficient time for recruitment of cellular repair mechanisms, the DNA damage detected by the comet assay for the dry season extracts remained significantly higher than for the negative control, reaching a ~2.5-fold increase (p < 0.05-0.01; Fig. 6B). This indicated that these PM extracts induced persistent DNA damage and may have impaired the DNA repair system. Previous studies of PM genotoxicity showed that PM exposure could induce DNA strand breaks and deregulate the expression of DNA repair proteins from

different human cell lines (Quezada-Maldonado et al., 2021, and references therein). Defects in the DNA repair pathways can cause genomic instability, predisposing mutagenesis, especially if DNA damage is persistent and accumulates (Hanahan and Weinberg, 2011). Nevertheless, there is still limited information available concerning the balance between DNA damage and repair capacity, as well as the repair pathways that might be most affected by exposure to PM (Quezada-Maldonado et al., 2021). Therefore, further investigation is needed of genotoxic damage and alterations in DNA repair pathways caused by PM.

#### 4. Conclusions

The findings of this study showed that biomass burning is an important source of hazardous compounds found in the atmosphere of Ribeirão Preto, a municipality within a metropolitan region with 1.74 million inhabitants, located in the sugarcane belt of São Paulo state (Brazil). Despite the public policy of reducing the pre-harvest burning of sugarcane leaves in São Paulo state, agricultural and wildfires remain widespread, especially during the dry season, when the weather conditions create a favorable environment for their occurrence.

Biomass burning accounted for 65% of the PAC sources, followed by diesel combustion (11%). This source masked any relevant differences between urban and semi-urban sites for PAHs and OPAHs in PM, although diesel-fueled vehicles appeared to contribute most to NPAHs.

The concentrations of PAHs and LECR found in this work were comparable to those in PM collected in the arc of deforestation in the Brazilian Amazon, regardless of the disparity between the areas burned. The carcinogenic activity of the PM samples, assessed as B[a]P<sub>eq</sub>

concentration, was 4 times higher in the dry season than in the wet season, and was greatly enhanced after a local fire event. Cytotoxicity towards HepG2 cells was only observed for PM samples collected in the dry season. This pattern was repeated in genotoxicity tests, which also evidenced persistent DNA damage that could have impaired the DNA repair system.

Therefore, lung cancer risk estimation, together with the *in vitro* cytotoxicity and genotoxicity test results, revealed the urgent need for more effective actions to prevent the occurrence of burning events, especially in view of the increasing number of forest fires related to global climate change.

## Funding

This work was funded by the São Paulo State Research Foundation (FAPESP, grant numbers #2018/16554-9, #2018/04820-6, #2021/10187-7, #2022/03087-9, and INCT-DATREM, 2014/50945-4), the National Council for Scientific and Technological Development (INCT-DATREM 465571/2014-0) and Coordination for Improvement of Higher Education Personnel – Brazil (CAPES) – Financing Code 001. C.S. was supported by FAPESP (#2018/17931-0).

## CRedit authorship contribution statement

**Caroline Scaramboni:** Conceptualization, Formal analysis, Investigation, Writing – original draft, Writing – review & editing. **Roberta Cerasi Urban:** Conceptualization, Formal analysis, Funding acquisition, Resources, Writing – review & editing. **Danielle Palma de Oliveira:** Funding acquisition, Resources, Writing – review & editing. **Daniel Junqueira Dorta:** Conceptualization, Funding acquisition, Resources, Writing – review & editing. **Maria Lucia Arruda Moura Campos:** Conceptualization, Funding acquisition, Resources, Supervision, Writing – review & editing.

## Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

## Data availability

Data will be made available on request.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.141072>.

## References

- Abbatini, C., et al., 2020. Global burden of 87 risk factors in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* 396, 1223–1249. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30752-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30752-2).
- Agudelo-Castañeda, D.M., Teixeira, E.C., 2014. Seasonal changes, identification and source apportionment of PAH in PM1.0. *Atmos. Environ.* 96, 186–200. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2014.07.030>.
- Allen, J.O., Dookeran, N.M., Taghizadeh, K., Lafleur, A.L., Smith, K.A., Sarofim, A.F., 1997. Measurement of oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons associated with a size-segregated urban aerosol. *Environ. Sci. Technol.* 31, 2064–2070. <https://doi.org/10.1021/es960894g>.
- Alves, C.A., Vicente, A., Monteiro, C., Gonçalves, C., Evtyugina, M., Pio, C., 2011. Emission of trace gases and organic components in smoke particles from a wildfire in a mixed-evergreen forest in Portugal. *Sci. Total Environ.* 409, 1466–1475. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.12.025>.
- Alves, D.K.M., Kummrow, F., Cardoso, A.A., Morales, D.A., Umbuzeiro, G.A., 2016. Mutagenicity profile of atmospheric particulate matter in a small urban center subjected to airborne emission from vehicle traffic and sugar cane burning. *Environ. Mol. Mutagen.* 57, 41–50. <https://doi.org/10.1002/em.21970>.
- Aquilina, N.J., Harrison, R.M., 2023. Evaluation of the cancer risk from PAHs by inhalation: are current methods fit for purpose? *Environ. Int.* 107991 <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.107991>.
- Arbex, M.A., Saldiva, P.H.N., Pereira, L.A.A., Braga, A.L.F., 2010. Impact of outdoor biomass air pollution on hypertension hospital admissions. *J. Epidemiol. Community Health* 64, 573–579. <https://doi.org/10.1136/jech.2009.094342>.
- Arbex, M.A., Pereira, L.A.A., Carvalho-Oliveira, R., Saldiva, P.H. do N., Braga, A.L.F., 2014. The effect of air pollution on pneumonia-related emergency department visits in a region of extensive sugar cane plantations: a 30-month time-series study. *J. Epidemiol. Community Health* 68, 669–674. <https://doi.org/10.1136/jech-2013-203709>.
- Arey, J., Zielinska, B., Atkinson, R., Aschmann, S.M., 1989. Nitroarene products from the gas-phase reactions of volatile polycyclic aromatic hydrocarbons with the OH radical and N2O5. *Int. J. Chem. Kinet.* 21, 775–799. <https://doi.org/10.1002/kin.550210906>.
- Bamford, H.A., Baker, J.E., 2003. Nitro-polycyclic aromatic hydrocarbon concentrations and sources in urban and suburban atmospheres of the Mid-Atlantic region. *Atmos. Environ.* 37, 2077–2091. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(03\)00102-X](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(03)00102-X).
- Bandow, B.A.M., Meusel, H., 2017. Nitrated polycyclic aromatic hydrocarbons (nitro-PAHs) in the environment – a review. *Sci. Total Environ.* 581–582, 237–257. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.12.115>.
- Boström, C.E., Gerde, P., Hanberg, A., Jernström, B., Johansson, C., Kyrklund, T., Rannug, A., Törnqvist, M., Victorin, K., Westerholm, R., 2002. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air. *Environ. Health Perspect.* 110, 451–488. <https://doi.org/10.1289/ehp.110-1241197>.
- Brito, K.C.T. de, Lemos, C.T. De, Rocha, J.A.V., Mielli, A.C., Matzenbacher, C., Vargas, V. M.F., 2013. Comparative genotoxicity of airborne particulate matter (PM2.5) using Salmonella, plants and mammalian cells. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 94, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.04.014>.
- Cançado, J.E.D., Saldiva, P.H.N., Pereira, L.A.A., Lara, L.B.L.S., Artaxo, P., Martinelli, L. A., Arbex, M.A., Zanobetti, A., Braga, A.L.F., 2006. The impact of sugar cane-burning emissions on the respiratory system of children and the elderly. *Environ. Health Perspect.* 114, 725–729. <https://doi.org/10.1289/ehp.8485>.
- Carvalho, J.S., Nascimento, R.K.S., Cintra, J.V.F.R.F., Rosa, N.L.C., Grosseli, G.M., Fadini, P.S., Urban, R.C., 2023. Source apportionment and health impact assessment of atmospheric particulate matter in the city of São Carlos, Brazil. *Chemosphere* 326, 138450. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2023.138450>.
- Caumo, S., Yera, A.B., Vicente, A., Alves, C., Roubicek, D.A., de Castro Vasconcellos, P., 2022. Particulate matter-bound organic compounds: levels, mutagenicity, and health risks. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 29, 31293–31310. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-17965-7>.
- Coelho, C.H., Allen, A.G., Fornaro, A., Orlando, E.A., Grigoletto, T.L.B., Campos, M.L.A. M., 2011. Wet deposition of major ions in a rural area impacted by biomass burning emissions. *Atmos. Environ.* 45, 5260–5265. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2011.06.063>.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2020a. Dados - Frota circulante no Estado de São Paulo. <https://cetesb.sp.gov.br/veicular/relatorios-e-publicacoes/>. (Accessed 17 April 2023).
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo, 2020b. Relatório de Qualidade do Ar no Estado de São Paulo-2020. <https://cetesb.sp.gov.br/ar/publicacoes-relatorios/>. (Accessed 17 April 2023).
- CIAGRO - Centro integrado de informações agrometeorológicas, 2023. Rede Meteorológica Automática - Dados Horários. <http://www.ciagro.org.br/ema/>. (Accessed 15 March 2023).
- Clergé, A., Le Goff, J., Lopez, C., Ledauphin, J., Delépée, R., 2019. Oxy-PAHs: occurrence in the environment and potential genotoxic/mutagenic risk assessment for human health. *Crit. Rev. Toxicol.* 49, 302–328. <https://doi.org/10.1080/10408444.2019.1605333>.
- Climate-data.org, 2021. Historical Average Temperature. <https://en.climate-data.org/>. (Accessed 7 February 2023).
- CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento, 2022. Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar, 2022/2023, 2º levantamento. Brasília. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>. (Accessed 7 February 2023).
- de Oliveira Alves, N., de Souza Hacon, S., de Oliveira Galvão, M.F., Simões Peixoto, M., Artaxo, P., de Castro Vasconcellos, P., de Medeiros, S.R.B., 2014. Genetic damage of organic matter in the Brazilian Amazon: a comparative study between intense and moderate biomass burning. *Environ. Res.* 130, 51–58. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2013.12.011>.
- de Oliveira Alves, N., Brito, J., Caumo, S., Arana, A., de Souza Hacon, S., Artaxo, P., Hillamo, R., Teinilä, K., Batistuzzo de Medeiros, S.R., de Castro Vasconcellos, P., 2015. Biomass burning in the Amazon region: aerosol source apportionment and associated health risk assessment. *Atmos. Environ.* 120, 277–285. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2015.08.059>.
- de Oliveira Alves, N., Vessoni, A.T., Quinet, A., Fortunato, R.S., Kajitani, G.S., Peixoto, M. S., De Souza Hacon, S., Artaxo, P., Saldiva, P., Menck, C.F.M., De Medeiros, S.R.B., 2017. Biomass burning in the Amazon region causes DNA damage and cell death in human lung cells. *Sci. Rep.* 7, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11024-3>.
- de Oliveira Galvão, M.F., de Oliveira Alves, N., Ferreira, P.A., Caumo, S., de Castro Vasconcellos, P., Artaxo, P., de Souza Hacon, S., Roubicek, D.A., Batistuzzo de Medeiros, S.R., 2018. Biomass burning particles in the Brazilian Amazon region: mutagenic effects of nitro and oxy-PAHs and assessment of health risks. *Environ. Pollut.* 233, 960–970. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.068>.
- Drejlik, K., Mattsson, Å., Jarvis, I.W.H., Lim, H., Hurkmans, J., Gustafsson, J., Bergvall, C., Westerholm, R., Johansson, C., Stenius, U., 2017. Cancer risk assessment of airborne



- PAHs based on in vitro mixture potency factors. *Environ. Sci. Technol.* 51, 8805–8814. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02963>.
- Galvão, E.S., de Cassia Feroni, R., D'Azeredo Orlando, M.T., 2021. A review of the main strategies used in the interpretation of similar chemical profiles yielded by receptor models in the source apportionment of particulate matter. *Chemosphere* 269, 128746. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.128746>.
- Gianini, M.F.D., Piot, C., Herich, H., Besombes, J.L., Jaffrezo, J.L., Hueglin, C., 2013. Source apportionment of PM10, organic carbon and elemental carbon at Swiss sites: an intercomparison of different approaches. *Sci. Total Environ.* 454, 99–108. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.043>. –455.
- Godoy-Silva, D., Nogueira, R.F.P., Campos, M.L.A.M., 2017. A 13-year study of dissolved organic carbon in rainwater of an agro-industrial region of São Paulo State (Brazil) heavily impacted by biomass burning. *Sci. Total Environ.* 609, 476–483. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.145>.
- Gonçalves, C., Figueiredo, B.R., Alves, C.A., Cardoso, A.A., Vicente, A.M., 2017. Size-segregated aerosol chemical composition from an agro-industrial region of São Paulo state, Brazil. *Air Qual. Atmos. Heal.* 10, 483–496. <https://doi.org/10.1007/s11869-016-0441-0>.
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- IARC – International Agency for Research on Cancer, 2010. Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures, Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France. <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Some-Non-heterocyclic-Polycyclic-Aromatic-Hydrocarbons-And-Some-Related-Exposures-2010>. (Accessed 23 June 2023).
- IARC – International Agency for Research on Cancer, 2012. Diesel and gasoline engine exhausts and some nitroarenes. In: IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, vol. 105. Lyon, France. <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Diesel-And-Gasoline-Engine-Exhausts-And-Some-Nitroarenes-2013>. (Accessed 23 June 2023).
- IARC – International Agency for Research on Cancer, 2016. Outdoor Air Pollution - Volume 109 - Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, IARC Monographs. Lyon, France. <https://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Iarc-Monographs-On-The-Identification-Of-Carcinogenic-Hazards-To-Humans/Outdoor-Air-Pollution-2016>. (Accessed 23 June 2023).
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2021. Panorama das cidades. <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/ribeirao-preto/panorama>. (Accessed 14 March 2023).
- ICH - International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2005. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2. R1.
- Idowu, O., Semple, K.T., Ramadass, K., O'Connor, W., Hansbro, P., Thavamani, P., 2019. Beyond the obvious: environmental health implications of polar polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Int.* 123, 543–557. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2018.12.051>.
- INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2023a. Monitoring of Active Fire Spots by States. Portal do Programa Queimadas do INPE. [http://www.inpe.br/queimadas/portal/estatistica\\_estados](http://www.inpe.br/queimadas/portal/estatistica_estados). (Accessed 12 April 2023).
- INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2023b. Banco de Dados de queimadas. <http://www.inpe.br/queimadas/bdqueimadas>. (Accessed 15 March 2023).
- IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry, 2002. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. *Pure Appl. Chem.* 74, 835–855. <https://doi.org/10.1351/pac200274050835>.
- Janta, R., Sekiguchi, K., Yamaguchi, R., Sopajaree, K., Pongpiachan, S., Chetiyankornkul, T., 2020. Ambient PM2.5, polycyclic aromatic hydrocarbons and biomass burning tracer in Mae Sot District, western Thailand. *Atmos. Pollut. Res.* 11 (1), 27–39.
- Jarvis, I.W.H., Bergvall, C., Bottai, M., Westerholm, R., Stenius, U., Dreij, K., 2013. Persistent activation of DNA damage signaling in response to complex mixtures of PAHs in air particulate matter. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 266, 408–418. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.11.026>.
- Jarvis, I.W.H., Dreij, K., Mattsson, Å., Jernström, B., Stenius, U., 2014. Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons in complex mixtures and implications for cancer risk assessment. *Toxicology* 321, 27–39. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2014.03.012>.
- Kelly, F.J., Fussell, J.C., 2012. Size, source and chemical composition as determinants of toxicity attributable to ambient particulate matter. *Atmos. Environ.* 60, 504–526. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.06.039>.
- Keyte, I.J., Harrison, R.M., Lammel, G., 2013. Chemical reactivity and long-range transport potential of polycyclic aromatic hydrocarbons – a review. *Chem. Soc. Rev.* 42, 9333. <https://doi.org/10.1039/c3cs60147a>.
- Kim, K.H., Jahan, S.A., Kabir, E., Brown, R.J.C., 2013. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environ. Int.* 60, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.07.019>.
- Knasmüller, S., Parzefall, W., Sanyal, R., Ecker, S., Schwab, C., Uhl, M., Mersch-Sundermann, V., Williamson, G., Hietsch, G., Langer, T., Darroudi, F., Natarajan, A. T., 1998. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 402, 185–202. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(97\)00297-2](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(97)00297-2).
- Lara, S., Villanueva, F., Martín, P., Salgado, S., Moreno, A., Sánchez-Verdú, P., 2022. Investigation of PAHs, nitrated PAHs and oxygenated PAHs in PM10 urban aerosols. A comprehensive data analysis. *Chemosphere* 294, 133745. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133745>.
- Lepers, C., Dergham, M., Armand, L., Billet, S., Verdin, A., Andre, V., Pottier, D., Courcot, D., Shirali, P., Sichel, F., 2014. Mutagenicity and clastogenicity of native airborne particulate matter samples collected under industrial, urban or rural influence. *Toxicol. Vitro.* 28, 866–874. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2014.03.011>.
- Mallah, Manthar Ali, Changxing, L., Mallah, Mukhtiar Ali, Noreen, S., Liu, Y., Saeed, M., Xi, H., Ahmed, B., Feng, F., Mirjat, A.A., Wang, W., Jabar, A., Naveed, M., Li, J.H., Zhang, Q., 2022. Polycyclic aromatic hydrocarbon and its effects on human health: an overview. *Chemosphere* 296. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133948>.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- Mueller, A., Ulrich, N., Hollmann, J., Zapata Sanchez, C.E., Rolle-Kampczyk, U.E., von Bergen, M., 2019. Characterization of a multianalyte GC-MS/MS procedure for detecting and quantifying polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and PAH derivatives from air particulate matter for an improved risk assessment. *Environ. Pollut.* 255, 112967. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.112967>.
- OEHHA - Office of Environmental Health Hazard Assessment, 2011. Chemical-specific Summaries of the Information Used to Derive Unit Risk and Cancer Potency Values. Appendix B. <https://oehha.ca.gov/air/crmr/technical-support-document-cancer-potency-factors-2009>. (Accessed 23 June 2023).
- Paim, J.N., Santos, A.G., Araujo, R.G.O., Nascimento, M.M., De Andrade, J.B., Guarieiro, L.L.N., 2023. Emissions of PAHs, nitro-PAHs and quinones (Oxy-PAHs) associated to PM1.0 and PM2.5 emitted by a diesel engine fueled with diesel-biodiesel-ethanol blends. *Atmosphere* 14, 1–20. <https://doi.org/10.3390/atmos14040656>.
- Paputa-Peck, M.C., Marano, R.S., Schuetzle, D., Riley, T.L., Hampton, C.V., Prater, T.J., Skewes, L.M., Jensen, T.E., Ruehle, P.H., Bosch, L.C., Duncan, W.P., 1983. Determination of nitrated polynuclear aromatic hydrocarbons in particulate extracts by capillary column gas chromatography with nitrogen selective detection. *Anal. Chem.* 55, 1946–1954. <https://doi.org/10.1021/ac00262a027>.
- Pereira, G.M., Teinilä, K., Custódio, D., Gomes Santos, A., Xian, H., Hillamo, R., Alves, C. A., Bittencourt De Andrade, J., Olímpio Da Rocha, G., Kumar, P., Balasubramanian, R., De Fátima Andrade, M., Vasconcellos, P.D.C., 2017. Particulate pollutants in the Brazilian city of São Paulo: 1-year investigation for the chemical composition and source apportionment. *Atmos. Chem. Phys.* 17, 11943–11969. <https://doi.org/10.5194/acp-17-11943-2017>.
- Pongpiachan, S., Hattayanone, M., Choochuay, C., Mekmok, R., Wuttijak, N., Ketratanakul, A., 2015. Enhanced PM10 bounded PAHs from shipping emissions. *Atmos. Environ.* 108, 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2015.02.072>.
- Pongpiachan, S., Hattayanone, M., Suttinun, O., Khumsup, C., Kitikoon, I., Hirunyatrakul, P., Cao, J., 2017. Assessing human exposure to PM10-bound polycyclic aromatic hydrocarbons during fireworks displays. *Atmos. Pollut. Res.* 8 (5), 816–827. <https://doi.org/10.1016/j.apr.2017.01.014>.
- Pongpiachan, S., 2022. Discrimination of the geographical origins of rice based on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ. Geochem. Health* 44 (5), 1619–1632. <https://doi.org/10.1007/s10653-021-01039-1>.
- Pongpiachan, S., Tipmanee, D., Choochuay, C., Deelman, W., Iadtem, N., Wang, Q., et al., 2022a. Concentrations and source identification of priority polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment cores from south and northeast Thailand. *Heliyon* 8 (10), e10953. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10953>.
- Pongpiachan, S., Wang, Q., Chetiyankornkul, T., Li, L., Xing, L., Li, G., et al., 2022b. Emission factors of PM2.5-Bounded selected metals, organic carbon, elemental carbon, and water-soluble ionic species emitted from combustions of biomass materials for source Apportionment—a new database for 17 plant species. *Atmos. Pollut. Res.* 13 (7), 101453. <https://doi.org/10.1016/j.apr.2022.101453>.
- Quezada-Maldonado, E.M., Sánchez-Pérez, Y., Chirino, Y.I., García-Cuellar, C.M., 2021. Airborne particulate matter induces oxidative damage, DNA adduct formation and alterations in DNA repair pathways. *Environ. Pollut.* 287. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.117313>.
- Ravindra, K., Sokhi, R., Van Grieken, R., 2008. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons: source attribution, emission factors and regulation. *Atmos. Environ.* 42, 2895–2921. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2007.12.010>.
- Scaramboni, C., Neris, J.B., do Nascimento, R. de K.S., Chiaranda da Rosa, N.L., Carvalho, J.S., Grosseli, G.M., Campos, M.L.A.M., Fadin, P.S., Urban, R.C., 2021. Optimization of a low volume extraction method to determine polycyclic aromatic hydrocarbons in aerosol samples. *Front. Environ. Sci.* 9, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2021.742251>.
- Senthilkumar, S., Manju, A., Muthuselvam, P., Shalini, D., Indhumathi, V., Kalaiselvi, K., Palanivel, M., Chandrasekar, P.P., Rajaguru, P., 2014. Characterization and genotoxicity evaluation of particulate matter collected from industrial atmosphere in Tamil Nadu State, India. *J. Hazard Mater.* 274, 392–398. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.04.017>.
- Shen, H., Huang, Y., Wang, R., Zhu, D., Li, W., Shen, G., Wang, B., Zhang, Y., Chen, Y., Lu, Y., Chen, H., Li, T., Sun, K., Li, B., Liu, W., Liu, J., 2013. Global atmospheric emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons from 1960 to 2008 and future predictions. *Environ. Sci. Technol.* 47, 6415–6424. <https://doi.org/10.1021/es400857z>.
- Silva, F.S., Cristale, J., André, P.A., Saldiva, P.H.N., Marchi, M.R.R., 2010. PM 2.5 and PM10: the influence of sugarcane burning on potential cancer risk. *Atmos. Environ.* 44, 5133–5138. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2010.09.001>.
- Simoneit, B.R.T., Schauer, J.J., Nolte, C.G., Oros, D.R., Elias, V.O., Fraser, M.P., Rogge, W.F., Cass, G.R., 1999. Levoglucosan, a tracer for cellulose in biomass burning and atmospheric particles. *Atmos. Environ.* 33, 173–182. [https://doi.org/10.1016/S1352-2310\(98\)00145-9](https://doi.org/10.1016/S1352-2310(98)00145-9).



- Simoneit, B.R.T., 2002. Biomass burning — a review of organic tracers for smoke from incomplete combustion. *Appl. Geochem.* 17 (3), 129–162. [https://doi.org/10.1016/S0883-2927\(01\)00061-0](https://doi.org/10.1016/S0883-2927(01)00061-0).
- Souza, K.F., Carvalho, L.R.F., Allen, A.G., Cardoso, A.A., 2014. Diurnal and nocturnal measurements of PAH, nitro-PAH, and oxy-PAH compounds in atmospheric particulate matter of a sugar cane burning region. *Atmos. Environ.* 83, 193–201. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2013.11.007>.
- Stein, A.F., Draxler, R.R., Rolph, G.D., Stunder, B.J.B., Cohen, M.D., Ngan, F., 2015. NOAA's HYSPLIT atmospheric transport and dispersion modeling system. *Bull. Am. Meteorol. Soc.* 96, 2059–2077. <https://doi.org/10.1175/BAMS-D-14-00110.1>.
- Tai, A.P.K., Mickley, L.J., Jacob, D.J., 2010. Correlations between fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) and meteorological variables in the United States: implications for the sensitivity of PM<sub>2.5</sub> to climate change. *Atmos. Environ.* 44, 3976–3984. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2010.06.060>.
- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, a, Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., 2000. Single cell gel/comet assay : guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* 35, 206–221. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2280\(2000\)35:3<206::aid-em8>3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2280(2000)35:3<206::aid-em8>3.0.co;2-j).
- Umbuzeiro, G.D.A., Franco, A., Magalhães, D., De Castro, F.J.V., Kummrow, F., Rech, C. M., De Carvalho, L.R.F., Vasconcellos, P.D.C., 2008. A preliminary characterization of the mutagenicity of atmospheric particulate matter collected during sugar cane harvesting using the salmonella/microsome microsuspension assay. *Environ. Mol. Mutagen.* 49, 249–255. <https://doi.org/10.1002/em.20378>.
- Urban, R.C., Lima-Souza, M., Caetano-Silva, L., Queiroz, M.E.C., Nogueira, R.F.P., Allen, A.G., Cardoso, A.A., Held, G., Campos, M.L.A.M., 2012. Use of levoglucosan, potassium, and water-soluble organic carbon to characterize the origins of biomass-burning aerosols. *Atmos. Environ.* 61, 562–569. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.07.082>.
- Urban, R.C., Alves, C.A., Allen, A.G., Cardoso, A.A., Queiroz, M.E.C., Campos, M.L.A.M., 2014. Sugar markers in aerosol particles from an agro-industrial region in Brazil. *Atmos. Environ.* 90, 106–112. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2014.03.034>.
- Urban, R.C., Alves, C.A., Allen, A.G., Cardoso, A.A., Campos, M.L.A.M., 2016. Organic aerosols in a Brazilian agro-industrial area: speciation and impact of biomass burning. *Atmos. Res.* 169, 271–279. <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2015.10.008>.
- USEPA – United States Environmental Protection Agency, 2010. Development of a Relative Potency Factor (RPF) Approach for Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Mixtures (External Review Draft). Washington, DC. [https://cfpub.epa.gov/si\\_public\\_record\\_Report.cfm?Lab=NCEA&dirEntryId=194584](https://cfpub.epa.gov/si_public_record_Report.cfm?Lab=NCEA&dirEntryId=194584). (Accessed 23 June 2023).
- Walgraeve, C., Demeestere, K., Dewulf, J., Zimmermann, R., Langenhove, H. Van, 2010. Oxygenated polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particulate matter : molecular characterization and occurrence. *Atmos. Environ.* 44, 1831–1846. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2009.12.004>.
- Wang, L., Atkinson, R., Arey, J., 2007. Formation of 9,10-phenanthrenequinone by atmospheric gas-phase reactions of phenanthrene. *Atmos. Environ.* 41, 2025–2035. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2006.11.008>.
- WHO - World Health Organization, 2000. Air Quality Guidelines for Europe, second ed. Copenhagen. <https://www.who.int/publications/i/item/9789289013581>. (Accessed 23 June 2023).
- WHO - World Health Organization, 2021. WHO Global Air Quality Guidelines. Particulate Matter (PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub>), Ozone, Nitrogen Dioxide, Sulfur Dioxide and Carbon Monoxide. Geneva. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/345329>. (Accessed 23 June 2023).
- WHO - World Health Organization, 2022. Ambient (Outdoor) Air Pollution [WWW Document]. URL. [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/ambient-\(outdoor\)-air-quality-and-health](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/ambient-(outdoor)-air-quality-and-health). (Accessed 10 January 2023).
- WHO Europe - WHO Regional Office for Europe, 2021. Human Health Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons as Ambient Air Pollutants: Report of the Working Group on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons of the Joint Task Force on the Health Aspects of Air Pollution. Copenhagen. <https://www.who.int/europe/publications/i/item/9789289056533>. (Accessed 23 June 2023).
- Xin, L., Wang, J., Guo, S., Wu, Y., Li, X., Deng, H., Kuang, D., Xiao, W., Wu, T., Guo, H., 2014. Organic extracts of coke oven emissions can induce genetic damage in metabolically competent HepG2 cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 37, 946–953. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2014.03.012>.
- Zhang, H., Zhang, X., Wang, Y., Bai, P., Hayakawa, K., Zhang, L., Tang, N., 2022. Characteristics and influencing factors of polycyclic aromatic hydrocarbons emitted from open burning and stove burning of biomass: a brief review. *Int. J. Environ. Res. Publ. Health* 19. <https://doi.org/10.3390/ijerph19073944>.
- Zhang, L., Yang, L., Zhou, Q., Zhang, X., Xing, W., Wei, Y., Hu, M., Zhao, L., Toriba, A., Hayakawa, K., Tang, N., 2020. Size distribution of particulate polycyclic aromatic hydrocarbons in fresh combustion smoke and ambient air: a review. *J. Environ. Sci. (China)* 88, 370–384. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2019.09.007>.