

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS E SUAS MISTURAS PRESENTES NOS FUMOS DE ASFALTO**

GABRIELA GÖETHEL

PORTO ALEGRE, 2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS
AROMÁTICOS E SUAS MISTURAS PRESENTES NOS FUMOS DE ASFALTO**

Tese apresentada por **Gabriela Göethel**
como pré-requisito para obtenção do
TÍTULO DE DOUTORA em Ciências
Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dr. Solange Cristina Garcia

Co-Orientador: Prof. Dr. Marcelo Dutra Arbo

PORTO ALEGRE, 2018

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e avaliada pela Banca Examinadora constituída por:

Dra. Liliana Rockenbach

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof^a. Dra. Flávia Valladão Thiesen

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

Prof^a. Dra. Tiana Tasca

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Diogo André Pilger (Banca Suplente)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

CIP - Catalogação na Publicação

Göethel, Gabriela
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE HIDROCARBONETOS
POLICÍCLICOS AROMÁTICOS E SUAS MISTURAS PRESENTES NOS
FUMOS DE ASFALTO / Gabriela Göethel. -- 2018.
129 f.
Orientador: Solange Cristina Garcia.

Coorientador: Marcelo Dutra Arbo.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. Caenorhabditis elegans. 2. Modelo preditivo. 3. Misturas. 4. Estresse oxidativo. I. Garcia, Solange Cristina, orient. II. Dutra Arbo, Marcelo, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Agradecimentos ao CNPq, órgão que financiou a bolsa de estudos para o desenvolvimento deste trabalho; à Faculdade de Farmácia desta Universidade aos Laboratórios de Toxicologia (LATOX), Laboratório de Síntese Orgânica Medicinal (LASOM) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), ao Departamento de Química, da Universidade Federal de Santa Maria – RS (UFSM) e ao UCIBIO-REQUIMTE, Laboratório de Toxicologia do Departamento de Ciências Biológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, Portugal, necessários para a realização dos experimentos práticos e para a elaboração da presente tese.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora Aparecida, pelo dom da vida, pelas bênçãos concedidas, por me darem um caminho de felicidade, muita força e proteção para realizar sonhos, como este que agora se torna realidade.

A Prof.^a Solange agradeço pela confiança, pela paciência que teve comigo, compreensão, amizade, oportunidade de compor o seu grupo de pesquisa e pela orientação deste trabalho. Muito obrigado por tudo!

Ao Prof.^o Marcelo agradeço pela co-orientação deste trabalho. Muito obrigada por me orientar, por sempre me incentivar, pela tua amizade e teu carinho comigo. Obrigada de coração!

Aos meus pais Verena e Rogério por todos os esforços e apoio incondicional. Mãe e pai: este trabalho só foi possível pelo amparo, amor e pela base que sempre recebi, por acreditarem em mim e me manterem durante a vida acadêmica. Amo muito vocês!

Ao meu esposo Diego pelo companheirismo, paciência e carinho de todas as horas. Agradeço a você que me fez sorrir em muitos momentos difíceis e me fez acreditar que sou capaz e que conseguiria chegar até aqui. Obrigada, Te Amo!

A toda a família, (primos): Rose, João, Carol, João Pedro, Mari, Valmir, Guto, Dudu, Pri, Grazi, Alexandre, Pati, Caio, Pedro, Dani, Clara, Luciano, Diego, Marcelo, Marione, Bruna, Júlia, (tios): Victória e Eugênio (*in memoriam*), Vera e Juca, Rejane e Arno, Renato e Elani Teresinha, muito obrigado pelo apoio, carinho e torcida em todos os momentos. Vocês viveram tudo isso comigo!

A pessoas especiais: Arcélio, Dica, Dado e Vó Tita, o carinho e o amor de vocês é uma benção divina!

Aos colegas do LATOX: Elisa, Bruna, Carol, Sabrina, Larissa, Jéssica, Nury, Guilherme, Ingrid, Otávio, Wesley, Shanda, Yasmin, Kim, Nicolás, Daiane, agradeço pela ajuda de cada um de vocês neste trabalho, pelo companheirismo, conversas, risadas, momentos de descontração e pelas grandes amizades e parcerias formadas nesse grupo, tenho certeza que somos uma grande família.

Aos amigos de Venâncio Aires – RS , agradeço pela amizade, parceria, paciência e simplesmente por dividir tantos bons momentos durante todos esses anos de amizade verdadeira.

Aos professores Jose Maria Monserrat, Flávia Valladão Thiesen e Tiana Tasca por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta tese.

A UFRGS e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela estrutura para realizar este curso.

A todos os amigos e demais pessoas que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao CNPq pelo fomento através da concessão da bolsa.

APRESENTAÇÃO

De acordo com as normas vigentes no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, a presente tese foi redigida na forma de encarte para publicações e está organizada em seções dispostas da seguinte maneira: Parte I: Introdução e Objetivos; Parte II: Manuscritos I e II; Parte III: Discussão, Conclusões, Perspectivas e Referências Bibliográficas.

A **Introdução** apresenta o embasamento teórico que nos levou ao desenvolvimento desta proposta de trabalho. Nos **Objetivos** constam os principais questionamentos do trabalho realizado.

Os **Materiais e Métodos**, **Resultados** e as **Referências específicas** encontram-se no corpo do manuscrito, apresentados na forma de **Capítulo I** e **Capítulo II**.

A seção **Discussão** contém uma interpretação geral dos resultados obtidos e que estão descritos nos manuscritos.

A seção **Conclusões** aborda as conclusões gerais dos principais resultados da tese. Em seguida, está apresentada a seção **Perspectivas**, a qual aborda os próximos estudos a serem realizados com os resultados gerados nesta tese.

A seção **Referências Bibliográficas** lista a bibliografia utilizada nas seções Introdução e Discussão da tese.

RESUMO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) representam risco à saúde humana, pois alguns são comprovadamente cancerígenos. No presente estudo, foram avaliadas as toxicidades aguda e crônica dos HPAs: fluoreno, benzo(b)fluoranteno, 2-nitrofluoreno e benzo(a)pireno, individualmente e em mistura, no modelo alternativo *in vivo* *Caenorhabditis elegans*. Foram avaliados a letalidade dos vermes (dose letal 50% - DL₅₀), o efeito dos HPAs sobre o desenvolvimento e estresse oxidativo após exposição aguda (30 min) ou crônica (12h). Os dados experimentais obtidos individualmente foram utilizados para prever os efeitos tóxicos agudos combinados de três misturas. Duas misturas foram preparadas combinando os quatro constituintes proporcionalmente às suas respectivas DL₅₀ (Mix A – toxicidade equipotente) ou DL₀₁ (Mix B), cujos constituintes foram misturados em doses não tóxicas. A mistura C baseou-se em níveis ambientais de HPAs. As DL₅₀ individuais obtidas na avaliação da toxicidade aguda para fluoreno, benzo(b)fluoranteno, 2-nitrofluoreno e benzo(a)pireno foram, respectivamente, 15,44; 8,14; 14,03 e 17,43 mg.L⁻¹. Na avaliação da toxicidade crônica as DL₅₀ individuais encontradas para o fluoreno, benzo(b)fluoranteno, 2-nitrofluoreno e benzo(a)pireno foram 5,47; 2,92; 1,33 e 1,93 mg.L⁻¹. Foram aplicados os modelos farmacológicos de adição da dose (AD) e ação independente (AI) para prever os efeitos das misturas. As previsões de DL₅₀ para Mix A, Mix B e Mix C considerando o modelo AD, foram 13,80, 16,64 e 12,07 mg.L⁻¹. Para AI, as previsões foram 9,84, 15,70 e 8,31 mg.L⁻¹. A DL₅₀ experimental observada para Mix A foi de 30,91 mg.L⁻¹ caracterizando um antagonismo em *C. elegans*. Foram observados sinergismos para Mix B (DL₅₀ 10,08 mg.L⁻¹) e Mix C (DL₅₀ 7,20 mg.L⁻¹). O desenvolvimento dos vermes foi afetado tanto após exposição aguda ou crônica, bem como as misturas de HPAs. Este efeito foi acompanhado por níveis aumentados de radicais livres, seguido de aumento das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD) na avaliação aguda. Na exposição crônica aos HPAs foi observado também alterações na reprodução dos vermes. Verificamos atraso na postura dos ovos, indicando atraso na reprodução do *C.elegans*. Os desvios encontrados entre os dados experimentais e os dados previstos podem estar relacionados ao perfil

metabólico dos componentes da mistura, o que não é previsto pelos modelos matemáticos. Esses resultados demonstram a toxicidade dos HPAs estudados assim como o efeito sinérgico da exposição a mistura destes poluentes. Além disso, foi evidente a participação do estresse oxidativo como um dos mecanismos de toxicidade envolvidos.

Palavras-Chave: Fumos de asfalto; hidrocarbonetos policíclicos aromáticos; *C. elegans*; misturas; toxicidade aguda; toxicidade crônica.

ABSTRACT

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) pose a risk to human health, as some are known to be carcinogenic. In the present study, the acute and chronic toxicities of PAHs: fluorene, benzo(b)fluoranthene, 2-nitrofluorene, and benzo(a)pyrene were evaluated individually and in mixture in the alternative in vivo model *Caenorhabditis elegans*. The lethality of worms (lethal dose 50% - LD₅₀), the effect of HPAs on development and oxidative stress after acute (30 min) or chronic exposure (12 h) were evaluated. The experimental data obtained individually were used to predict the combined acute toxic effects of three mixtures. Two blends were prepared by combining the four constituents proportionally to their respective LD₅₀ (Mix A - equipotent toxicity) or LD₀₁ (Mix B), whose constituents were mixed in non-toxic doses. Mixture C was based on environmental levels of PAHs. The individual LD₅₀s obtained in the acute toxicity assessment for fluorene, benzo(b)fluoranthene, 2-nitrofluorene, and benzo(a)pyrene were, respectively, 15.44; 8.14; 14.03 and 17.43 mg.L⁻¹. In the evaluation of chronic toxicity, the individual LD₅₀s found for fluorene, benzo(b)fluoranthene, 2-nitrofluorene, and benzo(a)pyrene were 5.47; 2.92; 1.33 and 1.93 mg.L⁻¹. Pharmacological dose addition (DA) and independent action (IA) models were applied to predict the effects of the mixtures. The predictions of LD₅₀ for Mix A, Mix B and Mix C considering the model DA were 13.80, 16.64, and 12.07 mg.L⁻¹. For IA, the predictions were 9.84, 15.70, and 8.31 mg.L⁻¹. The experimental LD₅₀ observed for Mix A was 30.91 mg.L⁻¹ characterizing an antagonism in *C. elegans*. Synergisms were observed for Mix B (LD₅₀ 10.08 mg.L⁻¹) and Mix C (LD₅₀ 7.20 mg.L⁻¹). The development of worms was affected either after acute or chronic exposure, as well as mixtures of PAHs. This effect was accompanied by increased levels of free radicals, followed by increased catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) enzymes in the acute evaluation. In chronic exposure to PAHs, changes in the reproduction of worms were also observed. We found delay in egg laying, indicating delay in reproduction of *C.elegans*. The deviations found between the experimental data and the predicted data may be related to the metabolic profile of the components of the mixture, which is not predicted by the mathematical models. These results demonstrate the toxicity of PAHs studied as well as the

synergistic effect of exposure to mixtures of these pollutants. In addition, it was evident the participation of oxidative stress as one of the mechanisms of toxicity involved.

Keywords: Asphalt fumes; polycyclic aromatic hydrocarbons; *C. elegans*; mixtures; acute toxicity; chronic toxicity.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO

Figura 1. Classificação das misturas asfálticas de acordo com a temperatura.

Figura 2. Esquema da biotransformação dos HPAs.

Figura 3. Esquema representativo do sistema de defesa antioxidante endógeno.

Figura 4. Ciclo de vida dos *C. elegans*.

MANUSCRITO 1

Figure 1. Lethality of the PAHs fluorene (green), benzo(b)fluoranthene (blue), benzo(a)pyrene (black) and 2-nitrofluorene (red) after 30 minute-exposures of *C. elegans*. The mean effects were fitted to the Logit function. Data were obtained from at least 3 independent experiments performed in duplicate.

Figure 2. Body areas of *C. elegans* after acute treatment with PAHs in different concentrations. Values are expressed as means \pm SEM from three independent experiments (n=3). (A) Fluorene; (B) Benzo(b)fluoranthene; (C) 2-nitrofluorene; (D) Benzo(a)pyrene. Statistical comparisons were made using one-way ANOVA/Bonferroni post-hoc test. (** $p < 0.001$ vs control).

Figure 3. ROS levels measure by DCF-DA: (A) Fluorene; (B) Benzo(b)fluoranthene (C) 2-Nitrofluorene (D) Benzo(a)pyrene. Data are expressed as mean \pm SEM (n=3 independent experiments performed in duplicate). Statistical comparisons were made using repeated measures ANOVA/Bonferroni post-hoc test. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs control).

Figure 4. CAT and SOD levels of *C. elegans* after acute treatment with PAHs in different concentrations. Results are expressed as mean \pm SEM (n=3 independent experiments performed in duplicate). **CAT:** (A) Fluorene; (B) Benzo(b)fluoranthene; (C) 2-Nitrofluorene; (D) Benzo(a)pyrene. **SOD:** (E) Fluorene; (F) Benzo(b)fluoranthene; (G) 2-Nitrofluorene; (H) Benzo(a)pyrene. Statistical comparisons were made using one way ANOVA/Bonferroni post-hoc test. (* $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ vs control).

Figure 5. Body area of *C. elegans* after acute treatment with MixA, MixB and MixC at different concentrations and Results of ROS through the DCF-DA method. Results are expressed as mean SEM (n=3 independent experiments performed in duplicate). **Body area:** (A) MIXEC₅₀; (B) MIXEC₀₁; (C) MIXREAL and **ROS:** (D) MIXEC₅₀; (E) MIXEC₀₁; (F) MIXREAL. Statistical comparisons were made using ANOVA/Bonferroni. (*** $p < 0.001$ vs. control) and measures ANOVA/Bonferroni. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs control group), respectively.

Figure 6. Predicted and observed data for the toxicity of three mixtures of fluorene, benzo(b)fluoranthene, benzo(a)pyrene and 2-nitrofluorene in *C. elegans* after 30 minute-exposition. (A) Mix A: mixture of PAHs combined in proportion to their LD₅₀ values. (B) Mix B: mixture of PHAs combined in proportion to their LD₀₁ values. (C) Mix C: mixture of PHAs presented in asphalt fumes (NASCIMENTO *et al.*, 2015). (D) Individual effects of fluorene (A), benzo(b)fluoranthene (B), benzo(a)pyrene (C) and 2-nitrofluorene (D) at the concentrations present in 1.6133 mgL⁻¹ of mixture B (which is the concentration of the mixture when all compounds are mixed at their LD₀₁). CA: Concentration addition prediction. Mix: observed effect of 1.6133 mgL⁻¹ of mixture B. Data are from at least three independent experiments run in duplicate. The dashed red line corresponds to the sum of the individual effects of all mixture components. Error bars represent SEM. **** show statistically significant differences between the mixture and all other treatments. (**** $p > 0.0001$).

MANUSCRITO 2

Figure 1. Survival of the PAHs after 12 hours of exposure of *C. elegans*. Data were obtained from at least 3 independent experiments performed in duplicate.

Figure 2. Body areas of *C. elegans* with PAHs in different concentrations. Values are expressed as means \pm SEM from three independent experiments (n=3). (A) Fluorene; (B) Benzo(b)fluoranthene; (C) 2-Nitrofluorene; (D) Benzo(a)pyrene. Statistical comparisons were made using Kruskal-Wallis/Dunn. (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs control).

Figure 3. ROS levels measure by DCF-DA: (A) Fluorene; (B) Benzo(b)fluoranthene; (C) 2-nitrofluorene; (D) Benzo(a)pyrene. Data are expressed as mean \pm SEM (n=3 independent experiments performed in duplicate). Statistical comparisons were made using repeated measures ANOVA/Bonferroni post-hoc test. (** $p < 0.001$ vs control).

Figure 4. Number of eggs and larvae per day of reproduction. (A) Fluorene; (B) Benzo(b)fluoranthene; (C) 2-nitrofluorene; (D) Benzo(a)pyrene. Values are expressed as means \pm SEM of three independent experiments (n = 3), except for fluorene (n = 1). Statistical comparisons were made using one-way ANOVA/Bonferroni post-hoc test. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs control).

LISTA DE ABREVIATURAS

AD – Adição da Dose

AI – Ação Independente

ATP – Adenosina Trifosfato

BTX - Benzeno, Tolueno e Xileno

CO₂ - Gás Carbônico

CAT – Catalase

C.elegans - *Caenorhabditis elegans*

CGC - Caenorhabditis Genetics Center

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DL₅₀ - Dose letal média para 50% da população teste

E.coli – OP50 – *Escherichia coli*

ERs - Espécies Reativas

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

ES – Efeito Somatório

GEE - Gases de Efeito Estufa

GPx – Glutathione Peroxidase

H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio

HPAs - Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos

MP - Material Particulado

NGM - Nematode Growth Media

NO_x – Número de Oxidação

O₂ – Oxigênio

RLs – Radicais Livres

SOD - Superóxido Dismutase

VOCs - Compostos Orgânicos Voláteis

SUMÁRIO

PARTE I	13
INTRODUÇÃO	14
1. Asfalto e fumos de asfalto	14
1.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos.....	16
1.1.1 Biotransformação dos HPAs.....	18
2. Estresse Oxidativo.....	19
3. Uso de modelos alternativos para avaliação toxicológica.....	22
3.1 Modelo <i>in vivo</i> : <i>Caenorhabditis elegans</i>	23
4. Avaliação dos efeitos de uma mistura: modelos de previsão.....	24
4.1 Definindo Adição.....	26
4.1.1 Adição da Dose.....	27
4.1.2 Ação Independente.....	27
4.1.3 Avaliação e eficácia dos modelos AD e IA.....	28
4.1.4 Antagonismo e Sinergismo.....	30
OBJETIVOS	30
1. Objetivo geral.....	30
2. Objetivos específicos.....	30
PARTE II.....	31
CAPÍTULO 1	32
Individual toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their mixtures present in asphalt fumes	32
CAPÍTULO 2	50
Chronic toxicity of most prevalent polycyclic aromatic hydrocarbons in bitumen fumes.....	50
PARTE III.....	58
DISCUSSÃO	59
CONCLUSÕES	64
PERSPECTIVAS	65
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

PARTE I

1. Asfalto e Fumos de Asfalto

O asfalto tem grande utilidade quando se apresenta na forma de uma rua asfaltada e nivelada, dando conforto aos passageiros e motoristas dos veículos. Mas, apesar dessa utilidade, para os trabalhadores em pavimentação pode trazer riscos. Guimarães (2003) observou que os pavimentadores, motoristas de rolo compressor, motoristas da máquina de aplicar a camada asfáltica e motoristas de caminhão basculante, além, da equipe de aplicação propriamente dita, não utilizavam proteções respiratórias e, assim, inalavam compostos químicos tóxicos. A exposição às emissões de asfalto em pavimentação de ruas e estradas acontece tanto por gases e vapores, quanto por material particulado (MP). Entre o MP, a maioria das partículas é menor que 2,5 μm , o que facilita não apenas a sua inalação, mas devido ao seu pequeno tamanho aerodinâmico, essas partículas podem atingir os alvéolos pulmonares, diminuindo a capacidade respiratória do indivíduo e provocando processos inflamatórios (LINTELMANN *et al.*, 2010).

Quando o asfalto se enquadra em uma determinada classificação particular que, em geral, se baseia em propriedades físicas que pretendem assegurar o bom desempenho do material na obra, ele passa a ser denominado de cimento asfáltico de petróleo ou simplesmente ligante asfáltico. E, quando este está acrescido de materiais agregados, como seixo, brita e areia, recebe o nome de mistura asfáltica (BERNUCCI, 2008).

As misturas asfálticas são classificadas de acordo com as temperaturas em que são operadas (figura 1), como: misturas quentes, com temperaturas em torno de 150°C a 180°C, misturas mornas, com temperaturas variando entre 60°C e 140°C e misturas frias, com manuseio à temperatura ambiente (FERREIRA *et al.*, 2011).

A mistura quente é a mais utilizada, devido à sua alta resistência mecânica, porém são grandes os números de impactos ambientais causados por essa mistura. Estas são preparadas a partir do aquecimento dos agregados pétreos e do ligante asfáltico, sendo a usinagem executada em níveis elevados de temperatura, da ordem de 150°C a 180°C. Para se chegar a essas temperaturas, são utilizados combustíveis fósseis, como o carvão, o diesel e o gás natural que são os principais emissores dos chamados gases de efeito

estufa (GEE), especialmente o gás carbônico (CO₂). Em temperaturas mais baixas, como as misturas mornas, é possível reduzir a emissão desses poluentes, já que parte do combustível que seria utilizado no processo de mistura deixa de ser queimado. Quando a temperatura da mistura atinge valores em torno de 150°C, vapores são emitidos e são visivelmente observados (FERREIRA *et al.*, 2011).

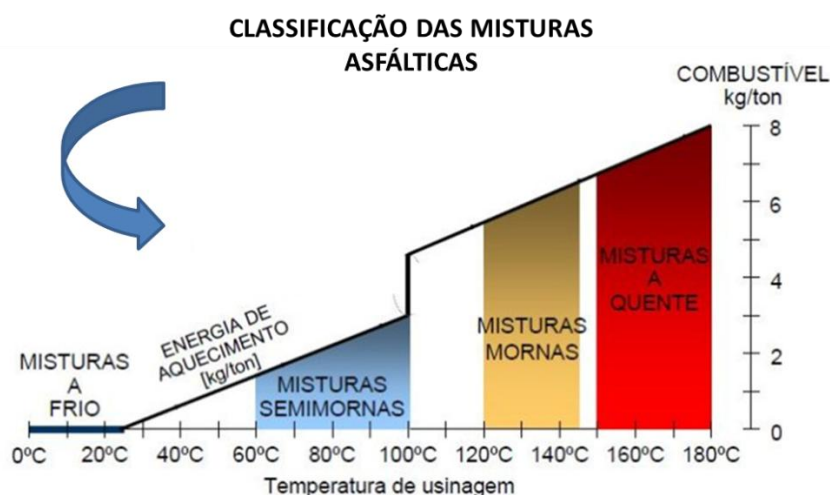


Figura 1. Classificação das misturas asfálticas de acordo com a temperatura. Adaptado de (FERREIRA *et al.*, 2011).

Em obras de pavimentação de ruas ou estradas, ocorre a geração de “nuvens” que são formadas durante a aplicação do asfalto no piso, geralmente de cor azulada. Essas “nuvens” são misturas de fumos de asfalto com vapores de asfalto. Ao esfriar, os vapores condensam-se e formam os fumos de asfalto. Assim, os trabalhadores que usam asfalto aquecido estão expostos a fumos e a vapores de asfalto (GUIMARÃES, 2003).

Os vapores e fumos são constituídos de elementos poluentes na forma de material particulado e gases, como os compostos orgânicos voláteis (VOCs). Os VOCs são compostos que se volatilizam facilmente à pressão atmosférica, pois possuem ponto de ebulição de até 130° C, e contribuem para a formação de oxidantes fotoquímicos, pois reagem com os NO_x na atmosfera e levam à formação de ozônio. Além disso, alguns VOCs são ainda considerados tóxicos ou carcinogênicos (LOPES, 2008).

Dentre as emissões gasosas destacam-se o metano, o dióxido de enxofre, o monóxido de carbono e o dióxido de nitrogênio. Como diluentes do asfalto geralmente se usam a querosene ou a nafta. A querosene é uma mistura de hidrocarbonetos alifáticos, olefínicos e aromáticos tendo como principais componentes os alifáticos (87%), com faixa entre 10 a 16 átomos de carbono (GUIMARÃES, 2003).

São encontrados também outros solventes aromáticos, como benzeno, tolueno e xileno (BTX), mas os agentes químicos que mais se destacam negativamente nas emissões do asfalto são os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), dados a sua ação carcinogênica. Eles representam os compostos de maior risco para a saúde dos trabalhadores diretamente envolvidos nas operações de pavimentação (GUIMARÃES, 2003).

A temperatura é um fator crucial no controle das emissões asfálticas, pois a temperatura em que os fumos são gerados afeta a proporção relativa de cada HPA nestes fumos, bem como a quantidade de vapores emitidos. Tanto a proporção relativa como a quantidade de vapores, são fatores que influenciam nos níveis de exposição e no potencial toxicológico destes xenobióticos. Deste modo, o uso das misturas mornas e frias pode contribuir na redução da exposição ocupacional às emissões (MOTTA, 2011).

Um estudo realizado pela *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) (NIOSH, 2000) apresentou uma relação de alguns HPAs como: benzo(a)pireno, fluoreno, naftaleno, fenantreno, antraceno, benzo[ghi]perileno, 1-nitronaftaleno e 1-nitropireno após a retirada de 131 amostras de limpeza da pele da testa e das palmas das mãos de trabalhadores em pavimentação de ruas, na aplicação de mantas asfálticas em telhados e em operadores de tanques na transferência de asfalto para caminhões (NIOSH, 2000). Outro estudo indicou exposição excessiva dos trabalhadores aos fumos de asfalto e ao benzo(a)pireno (ARMSTRONG *et al.*, 2003).

De acordo com NASCIMENTO *et al.* (2015), trabalhadores envolvidos na preparação e aplicação de asfalto são vulneráveis à exposição direta ao asfalto e suas emissões contendo HPAs. Organizações reguladoras já advertiram sobre os possíveis riscos de câncer causados pelos efeitos de fumos de asfalto para humanos, mas os dados ainda são insuficientes.

No Brasil, o Ministério da Saúde, desde 2001, já referencia estudos sobre as emissões de asfalto e também relaciona a atividade de pavimentação com asfalto com o risco de desenvolvimento de câncer de pulmão e brônquios, epitelomas (câncer de pele) e câncer de bexiga. Desta forma, estudos toxicológicos são vitais para assegurar a segurança destes trabalhadores (MOTTA, 2011).

1.1 Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs)

Os HPAs estão presentes no ambiente em concentrações muito pequenas, na ordem de microgramas (μg) ou nanogramas (ng). São substâncias orgânicas com dois ou mais anéis aromáticos formados por átomos de carbono e hidrogênio, pouco solúveis em água, possuem baixa pressão de vapor e altos pontos de fusão e ebulição. Adicionalmente, podem existir em grande número de estruturas e em diferentes isômeros. À temperatura ambiente os HPAs são sólidos, podendo variar desde moléculas semi-voláteis até moléculas com alto ponto de ebulição (LUO, 2015).

A combustão do carvão, queima de biomassa, exaustão veicular e uso de óleos lubrificantes são fontes ambientalmente relevantes de HPAs. Estes produtos ainda são utilizados como intermediários na produção de plastificantes, pigmentos, corantes e agrotóxicos, e as emissões mais significativas são provenientes da combustão incompleta de materiais orgânicos durante processos industriais e outras atividades antropogênicas (BERNARDO, 2016).

A exposição humana aos HPAs ocorre principalmente por inalação da fumaça do cigarro e de poluentes atmosféricos urbanos e por ingestão de água e de alimentos assados e defumados. No caso de exposições ocupacionais, a inalação é a principal via de exposição e a absorção dérmica também pode ser relevante (RAMESH *et al.*, 2004). Além disso, raramente estamos expostos somente a um único HPA, o mais comum é a exposição a misturas complexas destas substâncias (LIMA, 2008; USEPA, 2008).

No organismo humano os HPAs são substâncias lipofílicas e, portanto, são rapidamente dissolvidas e transportadas pelas lipoproteínas das

membranas celulares. A taxa de absorção depende do HPA e da via de entrada no organismo. De forma geral, são amplamente distribuídos por todo o organismo, podendo ser encontrados em qualquer órgão ou tecido, em especial os tecidos ricos em lipídios e no trato gastrointestinal, pela reabsorção do produto de excreção hepatobiliar (NETO, 2000).

Os HPAs apresentam efeitos sistêmicos que podem ser: anemias agudas, náuseas, vômitos, convulsões, distúrbios de consciência, letargias e dermatites (CAVALIERI, 2012). Além disso, são amplamente reconhecidos os efeitos carcinogênicos, onde existe uma propensão dos HPAs de atuarem como carcinógenos nos locais onde são via de acesso ao organismo (IARC, 2010).

Estudos epidemiológicos verificaram uma relevante contribuição dos HPAs para carcinogênese (JACOB e SEIDEL, 2002; GODSCHALK, 2003). Dados estatísticos revelaram evidência de risco de câncer e relação entre carcinogênese e a estrutura das moléculas dos HPAs (CAMPO *et al.*, 2006).

Sisinno *et al.*, (2003) avaliaram uma área de disposição de resíduos industriais no Estado do Rio de Janeiro, e identificaram diversos HPAs (fluoranteno, fenantreno, antraceno, pireno, criseno, benzo(a)pireno, benzo(k)fluoranteno, indeno (1,2,3-cd)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, dentre outros), sendo que em todas amostras foram identificados mais de um HPA, o que confere alta periculosidade aos resíduos, uma vez que os dados de toxicidade e carcinogenicidade são descritos individualmente para alguns HPAs e não para a exposição à misturas complexas destas substâncias.

Um estudo de FERNADES *et al.*, 2009 avaliou 16 HPAs em aglutinante de asfalto produzido na Fazenda Campo Alegre (Espírito Santo, Brasil). Os HPAs encontrados em maiores concentrações foram o benzo(b)fluoranteno, benzo(a)pireno, perileno-d12, indeno (1,2,3-cd)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e benzo(g,h,i)perileno com concentrações médias de 10,2-20,7 mg/kg.

O departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria – UFSM/RS realizou um estudo onde foi possível fazer a caracterização química de fumos de asfalto (NASCIMENTO *et al.*, 2015). Os testes para avaliação da toxicidade aguda e crônica do presente trabalho foram realizados com base nos resultados dos compostos que apresentaram maiores concentrações neste estudo. As moléculas escolhidas para os experimentos foram as seguintes:

benzo(b)fluoranteno, 2-nitrofluoreno, fluoreno e o benzo(a)pireno.

1.1.1 Biotransformação dos HPAs

A biotransformação dos HPAs, esquematizada na figura 2, envolve uma série de enzimas que catalisam reações de oxidação, redução e hidrólise (oxigenases de função mista, citocromo P450, NADPH-citocromo-c-redutase) e de enzimas que catalisam reações de conjugação (sulfotransferase, epóxido hidrolase, glutathione-S-transferase e UDP-glicotransferase). Estas enzimas estão distribuídas em todos os tecidos orgânicos (PATRI, 2009).

As monoxigenases dependentes do citocromo P450 (CYP1A) são responsáveis pela oxidação enzimática dos HPAs. Elas agem principalmente sobre a região de elevada densidade eletrônica ou a nível da região angular da molécula do HPA formando óxidos de arenos (epóxidos) que podem espontaneamente formar fenóis (DUTRA, 2007; NETTO *et al.*, 2000).

Destes fenóis, alguns são oxidados a quinonas e outros podem sofrer nova epoxidação levando à formação de epóxidos secundários (dihidrodiolépóxidos). O carbono benzílico dos dihidrodiolépóxidos é capaz de reagir com as bases nucleofílicas do DNA, notadamente a guanidina e, eventualmente, iniciar um processo mutagênico. Reações semelhantes são observadas com outras macromoléculas tais como a albumina e a hemoglobina (NETTO *et al.*, 2000).

Os fenóis, as quinonas e os di-hidrofenóis podem sofrer conjugação formando sulfatos e glucuronatos. Os óxidos de arenos, as quinonas e os diolépóxidos também reagem com a glutathione e podem ser eliminados através da urina sob a forma de tioéteres (DUTRA, 2007).

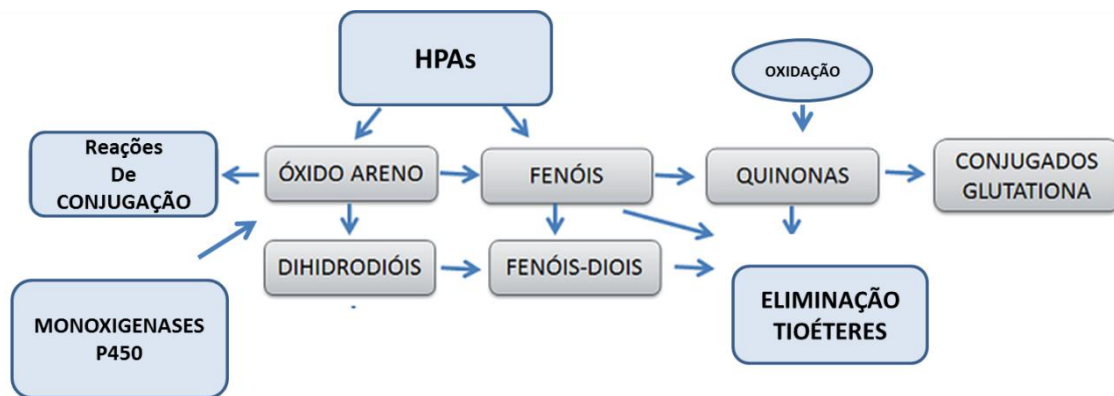


Figura 2. Esquema da biotransformação dos HPA's (Adaptado de MUTTI, 1996).

2. Estresse oxidativo

Quando um elétron se encontra sozinho em um orbital atômico, ele é considerado desemparelhado. Espécies que contenham um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada de valência são chamadas de radicais livres (RLs) e geralmente são muito reativas (HALLIWELL *et al.*, 2004).

A produção de espécies reativas (ERs) ocorre durante processos biológicos, essa produção constitui um processo contínuo, envolvendo algumas funções biológicas relevantes. Durante os processos metabólicos, esses radicais atuam como mediadores para a transferência de elétrons nas várias reações bioquímicas. Sua produção, em proporções adequadas, possibilita a geração de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP) como, por exemplo, por meio da cadeia transportadora de elétrons (SHAMI *et al.*, 2004).

Entretanto, a produção em excesso pode causar dano oxidativo a muitas biomoléculas. Uma situação onde há um desequilíbrio entre a geração de radicais livres e o sistema de defesa antioxidante é conhecida como estresse oxidativo. Esse processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos, podendo, se não for combatido, levar à morte celular (HALLIWELL *et al.*, 2004; BARBOSA *et al.*, 2010). A produção de espécies reativas pode levar a danos oxidativos nas proteínas, membranas e no ácido desoxiribonucleico (DNA). Além disso, ERs podem atuar nas vias de sinalização celular que modulam várias funções (GALLEY, 2011).

Para combater a produção excessiva de radicais livres, os organismos possuem sistemas de defesa antioxidante que tem basicamente o objetivo de limitar os níveis intracelulares dessas espécies reativas e controlar a ocorrência de danos decorrentes (FERREIRA *et al.*, 1997). Um antioxidante é definido como qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz (SIES e STAHL, 1995). Esses agentes reagem diretamente com as ERs, levando à formação de produtos menos reativos, e podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007).

Os antioxidantes atuam em diferentes níveis na proteção do organismo. O primeiro mecanismo de defesa endógena contra as ERs é impedir a sua formação, principalmente pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre. Os antioxidantes são capazes de evitar os ataques das espécies reativas de oxigênio (EROS), eles impedem a formação ou sequestram as espécies reativas de oxigênio e, dessa forma, não permitem sua interação com alvos celulares (ROVER JÚNIOR *et al.*, 2001; BARBOSA *et al.*, 2010).

O sistema de defesa enzimático inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). Essas enzimas agem impedindo e/ou controlando a formação de EROS. A SOD catalisa a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2), por sua vez, pode ser convertido à $2H_2O$ pela GPx ou $O_2 + H_2O$ pela CAT (ROVER JÚNIOR *et al.*, 2001), como demonstrado na figura 3.

Além da proteção fornecida pelos antioxidantes endógenos, o organismo também dispõe dos antioxidantes exógenos provenientes da dieta para combater as espécies reativas. Entre esses compostos, estão o β -caroteno, α -tocoferol (vitamina E), retinol (vitamina A) e ácido ascórbico (vitamina C) (BARREIROS e DAVID, 2006; CHARÃO *et al.*, 2012).

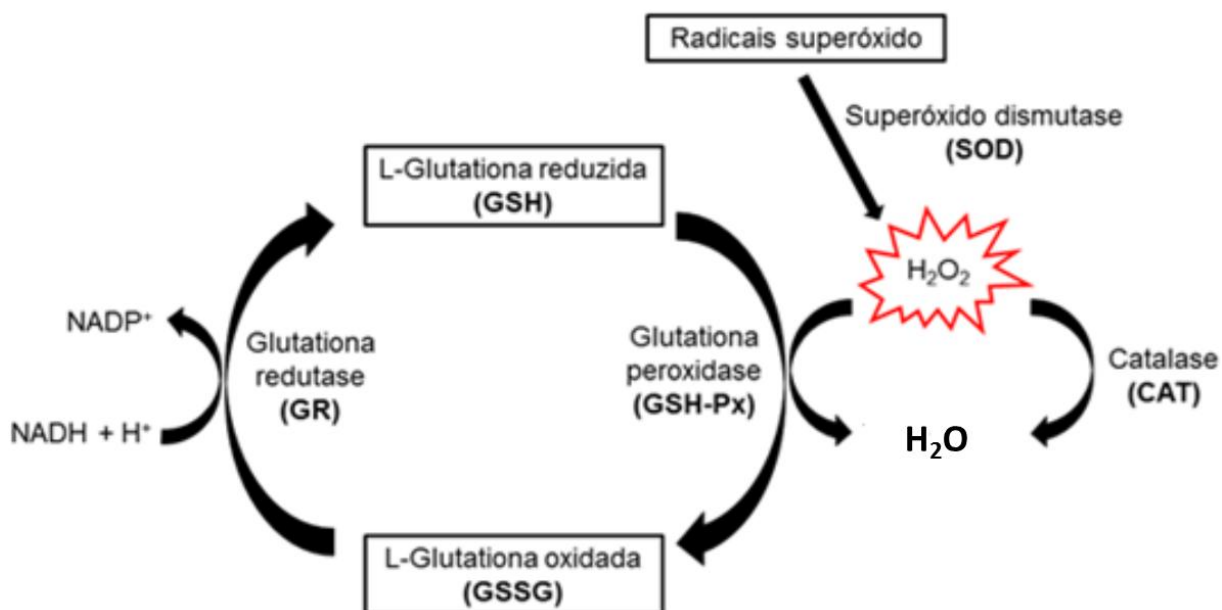


Figura 3. Esquema representativo do sistema de defesa antioxidante endógeno (Adaptado de ROVER JUNIOR *et al.*, 2001).

Entre as moléculas biológicas conhecidas, os lipídios são considerados extremamente suscetíveis à presença de EROS. Em particular, os ácidos graxos insaturados são propensos ao ataque de EROS, produzindo peróxidos lipídicos (PATRI *et al.*, 2009).

Os HPAs perturbam o sistema de defesa antioxidante, são responsáveis por induzir o estresse oxidativo e tem grande potencial para causar efeitos adversos devido ao seu ciclismo redox podendo aumentar o estresse oxidativo e gerar danos ao DNA (HALLIWELL, 2006).

3. Uso de modelos alternativos para avaliação toxicológica

O desenvolvimento de métodos alternativos é baseado no conceito dos “3 Rs”, de Russell e Burch (1959): *Reduction, Refinement, Replacement*. Isto é, redução do número de animais em experimentação, refinamento dos procedimentos (diminuindo dor e estresse aos animais) e substituição de métodos animais por “não-animais” (*in vitro, ex vivo, in silico*) (RUSSEL e BURCH, 1959). É importante observar que quando não é possível a substituição total do uso de animais, deve-se levar em conta a possibilidade da

redução e do refinamento da experimentação. Portanto, um método alternativo pode ser definido como qualquer método que tem por finalidade reduzir, refinar ou substituir o uso animal. Certamente métodos alternativos devem ser utilizados sempre que possível e a busca dessas metodologias deve ser um dos alvos da ciência moderna (Blomme e Will, 2016).

3.1 Modelo *in vivo*: *Caenorhabditis elegans*

O nematoide *Caenorhabditis elegans*, é considerado um modelo alternativo e bem caracterizado e tem sido de grande relevância para avaliar substâncias benéficas e tóxicas ao organismo bem como para identificar novos alvos para intervenções farmacológicas. Os *C. elegans* são nematoides de vida livre, encontrados na porção líquida do solo e comum em todo o mundo (Lilienblum *et al.*, 2008). É um organismo bem caracterizado, sendo que em 1998, os pesquisadores John Sulston e Robert Waterstone mapearam o seu genoma, tornando-se o primeiro eucarionte pluricelular a ter o genoma completamente sequenciado, com 97 milhões de pares de bases.

Muitos atributos experimentais tornam o *C. elegans* um modelo animal bem sucedido e com um número cada vez maior de publicações em biologia do desenvolvimento, genética, envelhecimento e ecotoxicologia (MOTA, 2001). Inicialmente o pequeno comprimento do verme (aproximadamente 1mm), o que possibilita a fácil manutenção de grandes quantidades de espécimes (10000 vermes/placa) em placas de petri NGM (*Nematode Growth Media*) suplementadas com *Escherichia coli*. Outra facilidade é a grande capacidade reprodutiva, pois um hermafrodita gera entre 200 e 300 descendentes, já quando um macho (0,02% da população) cruza com um hermafrodita este número pode passar de 1000 (NAYAK *et al.*, 2004). Além disso, sua reprodução é por autofecundação, o que permite que a população seja mantida isogênica.

O hermafrodita grávido expelle o ovo e após sua eclosão, passa por quatro estágios larvais (L1, L2, L3 e L4) até chegar à fase adulta (Figura 4). Os hermafroditas adultos se autofecundam, iniciando um novo ciclo de vida. O verme possui um ciclo de vida curto, de aproximadamente 21 dias, possibilitando a execução de estudos relacionados à longevidade em um

espaço temporal menor quando comparado aos modelos mamíferos clássicos (KALETTA e HENGARTER, 2006).

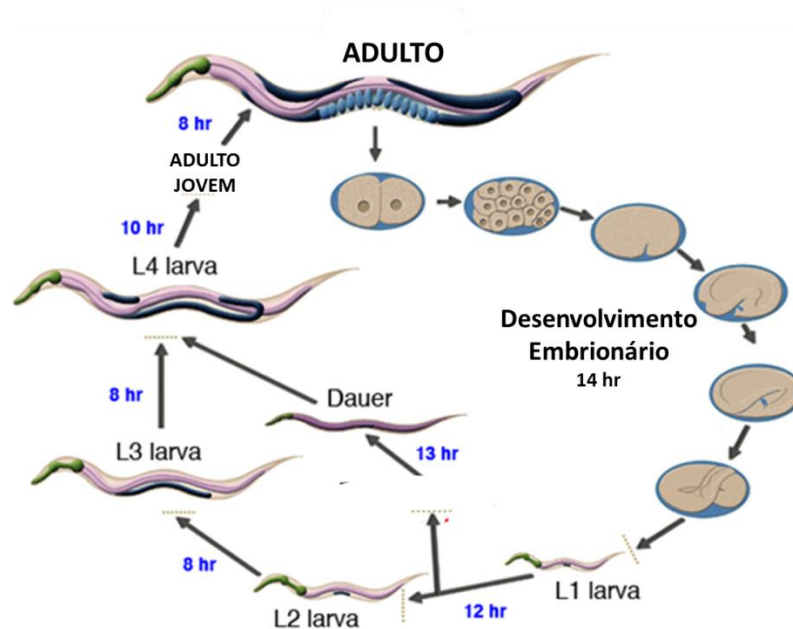


Figura 4. Ciclo de vida dos *C. elegans* (Adaptado de Worm Atlas).

Com relação à genética, cerca de 80% dos genes de *C. elegans* possuem homólogos em mamíferos (MUSCHIOL *et al.*, 2009);). Além disso, existe um grande suporte e trabalho em conjunto de vários laboratórios espalhados pelo mundo para a criação, manutenção e ampliação de bases de dados, como o Worm Book, e armazenamento e venda de cepas mutantes e/ou transgênicas, como o CGC (Caenorhabditis Genetics Center - USA).

Em comparação aos estudos *in vitro*, o *C. elegans* apresenta grandes vantagens em relação à cultura de células, pois ele é um organismo multicelular que permite que a ação dos compostos seja avaliada de forma sistêmica (KALETTA e HENGARTNER, 2006). Por ser um verme transparente, marcadores fluorescentes, como por exemplo, genes repórteres, podem ser observados nos animais vivos. Assim, o fato do seu genoma já ser conhecido e da disponibilidade de mutantes para a maioria dos seus genes, permite que os mecanismos da resposta ao estresse nos vermes sejam facilmente investigados *in vivo* (KALETTA e HENGARTNER, 2006).

O nematoide *C. elegans* têm sido empregado em estudos de avaliação toxicológica. Dentre os ensaios de toxicidade avaliados está a dose letal (DL₅₀), que corresponde à concentração da substância capaz de matar 50% dos nematoides expostos (MUSCHIOL *et al.*, 2009); análise comportamental, que está relacionada com a neurotoxicidade, produção de espécies reativas, avaliação do desenvolvimento, expressão gênica de enzimas antioxidantes, entre outros (WEN *et al.*, 2011).

4. Avaliação dos efeitos de uma mistura: modelos de previsão

Modelos baseados em efeitos tóxicos estão ganhando popularidade, e alguns foram expandidos para incluir os efeitos das misturas (ASHAUER *et al.*, 2010). Nas últimas décadas, vários estudos sobre toxicidade de misturas compararam dois modelos de previsão de efeito bem estabelecidos (DRESCHER e BOEDEKER 1995): o modelo de adição da dose (AD), definida pela primeira vez por Loewe e Muchnik (1926), e o modelo da ação independente (AI), tal como descrito por Bliss (1939).

Estes conceitos são baseados em suposições gerais a respeito dos mecanismos de ação dos constituintes da mistura (KORTENKAMP, 2007). Resumidamente, o conceito de AD é baseado na suposição de que os componentes de mistura possuem modos de ação semelhantes, o que significa que qualquer componente pode ser substituído totalmente ou parcialmente por outro componente sem alterar o efeito global da mistura (BACKHAUS *et al.*, 2000a). Neste caso, cada componente individualmente contribui para o efeito global do conjunto, agindo em proporção com a sua concentração, mesmo em concentrações que não produzam qualquer efeito. A abordagem de AI funciona de outra forma e descreve melhor os efeitos da combinação de moléculas com diferentes mecanismos de ação (BACKHAUS *et al.*, 2000a). As derivações matemáticas de modelos de previsão (AD e AI) foram descritos por Payne *et al.*, (2000).

Como os fumos de asfalto são uma matriz complexa, é importante avaliar a toxicidade de misturas de HPAs através dos dois modelos, classificando cada tipo de interação (PAYNE *et al.*, 2000). As interações possíveis são: (1) aditividade, onde dois agentes químicos atuam

independentemente sobre o mesmo sistema biológico de tal maneira que o efeito resultante é a soma dos efeitos; (2) sinergismo, a interação entre os agentes tóxicos produz um efeito maior que o esperado em relação às ações individuais, ou seja, maior que o efeito aditivo; e (3) antagonismo, uma redução do efeito, ou seja, os agentes químicos produzem um efeito menor que o aditivo (BERENBAUM, 1989).

4.1 Definindo Adição

Do ponto de vista realista, o teste direto de todas as combinações hipotéticas de drogas seria inviável. Assim, as abordagens preditivas que permitem a avaliação de misturas são extremamente importantes. A fim de avaliar corretamente os efeitos da combinação de produtos químicos, é crucial formular uma hipótese sobre o efeito esperado da mistura. Esta hipótese fornece a base necessária para a avaliação dos efeitos da mistura em termos de sinergismo ou antagonismo. Um ponto de referência adequado para tais análises é a expectativa de que os efeitos conjuntos são o resultado de interações puramente aditivas de todos os componentes da mistura (BERENBAUM, 1989; KORTENKAMP, 2007).

Os efeitos de uma mistura de drogas podem ser menores ou maiores do que a soma dos efeitos individuais de todos os componentes da mistura. No entanto, a partir dessa premissa é frequentemente assumido que as expectativas de efeitos conjuntos podem ser obtidas diretamente pelo cálculo da soma aritmética de todos os efeitos individuais. De acordo com Kortenkamp (2007), esta suposição fica evidente quando consideramos, por exemplo, 10 agentes, cada qual provocando 15% de uma determinada resposta. O efeito conjunto resultante deveria ser de $10 \times 15\% = 150\%$ e esse resultado acaba por ser biologicamente impossível se o efeito máximo só pode ser de 100%. Este equívoco é baseado no modelo de previsão do efeito somatório (ES) e tem se destacado em vários trabalhos no campo da toxicologia de misturas (BERENBAUM, 1981; KORTENKAMP e ALTENBURGER, 2000). No modelo ES os efeitos dos compostos individuais são somados para prever o efeito global da mistura. Infelizmente, esta abordagem não é válida para produtos químicos que produzem curvas sigmóides de concentração-resposta (como é o

caso da maioria) e só é aplicável às curvas de concentração-resposta linear. O conceito de ES é muitas vezes erroneamente utilizado, levando a conclusões equivocadas (KORTENKAMP e ALTENBURGER, 2000).

A avaliação dos efeitos de combinação em termos de sinergismo, antagonismo e adição baseia-se na previsão precisa dos efeitos esperados de uma mistura. Existem muitos debates sobre como os efeitos aditivos devem ser calculados (KORTENKAMP e ALTENBURGER, 2000).

4.1.1 Adição da Dose

O primeiro e mais reconhecido modelo para prever efeitos aditivos foi apresentado por Loewe e Muchnick (1926), baseado na obra de Fraser (1872). Esta abordagem, conhecida como adição da dose (AD) ou adição da concentração, baseia-se na suposição de que os componentes de uma mistura produzem o mesmo efeito tóxico no mesmo órgão alvo através do mesmo mecanismo de ação. Logo, cada composto na mistura pode ser substituído por uma determinada concentração, sem diminuir o efeito global da mistura. Isso significa que cada componente da mistura contribui para o efeito global da combinação na proporção da sua concentração. Este modelo foi desenvolvido e descrito por Berenbaum, (1985) e tem sido amplamente aceito por inúmeros cientistas.

4.1.2 Ação Independente

O conceito de ação independente (AI) ou a independência de Bliss foi desenvolvido pela primeira vez por Bliss (1939). Também tem sido referida como ação independente por Plackett e Hewlett (1948), além de resposta e efeito de multiplicação (COLBY, 1967). Este conceito tem sido aplicado com sucesso para a avaliação de misturas (BACKHAUS *et al.*, 2000a; BACKHAUS *et al.*, 2004a), baseia-se na ideia de independência probabilística (GRECO *et al.*, 1995). A parte do pressuposto de que os efeitos dos componentes individuais da mistura são independentes um do outro, de modo que cada componente de uma mistura atua de uma maneira que não interfere com os outros, mas contribuem para o efeito global. Portanto, o efeito relativo de um

produto químico permanece inalterado na presença de outro composto (FAUST *et al.*, 2001). Por exemplo, a substância A atua na presença de substância B, como aconteceria na ausência da substância B. Isto significa que a ação da substância A é independente e não é influenciada pela substância B. Este conceito pressupõe que os efeitos da mistura são o resultado de interações, dos constituintes da mistura com diferentes alvos de um sistema biológico.

4.1.3 Avaliação e eficácia dos modelos AD e AI

Nos últimos anos, várias tentativas têm sido feitas para discriminar entre previsões derivadas dos dois conceitos de AD e AI (ALTENBURGER *et al.*, 2000; BACKHAUS *et al.*, 2000a; MARQUES *et al.*, 2012).

É aceito que a AD irá produzir previsões válidas para os efeitos conjuntos de drogas que interferem com um mesmo alvo. Por outro lado, o conceito de AI deve provar ser confiável em antecipar as ações conjuntas destes agentes, uma vez que pressupõe que os diferentes componentes de uma mistura causam um efeito biológico integrante comum (por exemplo, a morte celular) através da interação com diferentes sítios-alvos moleculares (ALTENBURGER *et al.*, 2000).

Takakura e colaboradores (2012) investigaram a citotoxicidade induzida por dois cocktails compostos de dois e cinco agrotóxicos anteriormente identificados na dieta francesa, em linhagens celulares humanas, utilizando o ensaio de vermelho neutro. Os dois modelos de AD e AI mostraram resultados quase idênticos para as curvas de concentração-resposta em todos os casos. Backhaus e colaboradores (2004b) validaram os modelos de AD e AI para prever a toxicidade da mistura de múltiplos componentes da fenilureia, e observaram cálculos de previsão idênticos. Outros exemplos de previsões que se sobrepõem são amplamente relatados na literatura (BACKHAUS *et al.*, 2004b; CEDERGREEN *et al.*, 2007a; HUANG *et al.*, 2011; OHLSSON *et al.*, 2010; PETERSEN e TOLLEFSEN, 2012).

Embora a diferença entre os dois modelos de previsão aconteça, conforme mencionado acima, AD frequentemente prevê um efeito de toxicidade superior ao AI (ALTENBURGER *et al.*, 2000; BACKHAUS *et al.*, 2000a; FAUST *et al.*, 2003). De acordo com Drescher e Boedeker (1995), a discriminação entre

as predições de AD e AI baseia-se no número de componentes da mistura, na sua proporção de concentração na mistura, das suas funções de resposta à concentração e ao modelo de regressão utilizado para descrever as relações entre as concentrações e os efeitos dos agentes individuais. Tem sido demonstrado que, através do aumento do número de componentes individuais da mistura, a separação entre as duas previsões ocorrerá (DRESCHER e BOEDEKER, 1995).

4.1.4 Antagonismo e Sinergismo

Plackett e Hewlett (1952) propuseram que os produtos químicos podem, basicamente, se comportar de duas maneiras: podem ter uma ação comum (zero-interação) ou eles podem interagir. Antagonismo é definido como um tipo de "interação" em que os compostos produzem toxicidade mais baixa quando combinados do que seria esperado através das suas ações se estivessem separados. Logo, são necessárias maiores quantidades de droga, para se obter exatamente o mesmo efeito quando as substâncias estão presentes em conjunto do que seria previsível a partir dos seus efeitos individuais. O sinergismo é o inverso, maior efeito produzido, ou menos droga necessária, do que o previsto (DRESCHER e BOEDEKER, 1995).

Por esta razão, um dos principais objetivos deste estudo foi comparar a aplicabilidade de AD e AI em prever os efeitos tóxicos conjuntos dos HPAs fluoreno, 2-nitrofluoreno, benzo(a)pireno e benzo(b)fluoranteno presentes em fumos de asfalto utilizando *C. elegans*, com base em informações sobre a toxicidade individual de cada HPA.

1. Objetivo geral

Avaliar a toxicidade aguda e crônica de HPAs, individuais e em mistura, presentes em fumos de asfalto utilizando o nematoide *Caenorhabditis elegans* como modelo alternativo *in vivo*.

2. Objetivos específicos

- ❖ Avaliar a toxicidade aguda e crônica isolada dos seguintes HPAs: fluoreno, benzo(a)pireno, 2-nitrofluoreno e benzo(b)fluoranteno no modelo *C. elegans*;
- ❖ Avaliar o efeito oxidativo como mecanismo de toxicidade;
- ❖ Avaliar a toxicidade aguda de três tipos de misturas dos HPAs envolvidos no estudo, aplicando os modelos farmacológicos de adição da dose (AD) e ação independente (AI).

PARTE II

CAPÍTULO 1

**Individual toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their
mixtures present in asphalt fumes**

Manuscrito submetido à revista *Journal of Applied Toxicology*

Individual toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their mixtures present in asphalt fumes

Gabriela Göethel^{a,b}, Mariele F Charão^c, Caroline Souto^a, Ingrid Flesch^a, Denise Bohrer^d, Daiana S Ávila^e, Vera L Eifler-Lima^{f,b}, Diana Dias da Silva^g, Marcelo D Arbo^{a,b}, Solange Cristina Garcia^{a,b*}

^aLaboratório de Toxicologia (LATOX), Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

^cUniversidade FEEVALE, Novo Hamburgo, RS, Brasil.

^dDepartamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

^eGrupo de Pesquisa em Bioquímica e Toxicologia em *Caenorhabditis elegans* (GBToxCE), Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA, Uruguaiana, RS, Brasil.

^fLaboratório de Síntese Orgânica Medicinal (LaSOM), Departamento de Produção de Matéria Prima, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

^g UCIBIO-REQUIMTE, Laboratório de Toxicologia, Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade do Porto, Porto, Portugal.

*Corresponding author: Prof Dr Solange C. Garcia. (S.C. Garcia).
Email: solange.garcia@ufrgs.br

Address: Avenida Ipiranga 2752/605B, Santa Cecília, Porto Alegre, RS, Brazil. CEP: 90610-000. Tel.: (+55) 51 3308-5297. Fax: (+55) 51 3308-5437.

ABSTRACT

Asphalt fumes contain toxic polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). The toxic effects of fluorene, benzo(b)fluoranthene, 2-nitrofluorene and benzo(a)pyrene were evaluated individually and in mixtures using *Caenorhabditis elegans*. LD₅₀, worm development, and reactive oxygen species (ROS) were evaluated after acute exposure to the PAHs. Data obtained experimentally for individual agents were used to predict the combined toxic effects of three mixtures. Two mixtures were performed by combining the four constituents proportionally to their respective LD₅₀ (Mix A) or LD₀₁ (Mix B), whose constituents were mixed at non toxic doses. Mix C was based on the environmental levels of these PAHs. The pharmacological models of dose addition (DA) and independent action (IA) were applied. Individual LD₅₀ for fluorene, benzo(b)fluoranthene, 2-nitrofluorene, and benzo(a)pyrene were 18.43, 11.0, 15.45 and 19.88 mg.L⁻¹. The experimental LD₅₀ observed for Mix A was 30.91 mg.L⁻¹ characterizing an antagonistic effect in *C. elegans*. Synergistic effects were observed for Mix B (LD₅₀ 10.08 mg.L⁻¹) and Mix C (LD₅₀ 7.20 mg.L⁻¹). The DA LD₅₀ predictions for Mix A, Mix B and Mix C were 13.80, 16.64, 12.07 mg.L⁻¹. For IA, the predictions were 9.84, 15.70, 8.31 mg.L⁻¹. The development of worms was impaired by exposure to single PAHs or their mixtures. This effect was accompanied by increased ROS production, catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD) levels. Therefore, the deviations between experimental and predicted data could be related to metabolic profile of the mixture components, which is not predicted by the mathematical models. This reinforces the importance to perform *in vivo* experimental modeling.

Keywords: acute exposure, *Caenorhabditis elegans*, mixtures, predictive model, oxidative stress.

1. Introduction

Asphalt is a complex mixture containing many organic compounds, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), amines, alkanes, cycloalkanes, and heterocyclic compounds containing oxygen, sulphur, and nitrogen. In paving streets, there is the generation of "clouds" that are formed during application of the asphalt floor, usually bluish in color. After heating, the vapor of these components is produced. When the fumes cool, they condense and form the asphalt fumes. Emissions of asphalt fumes, generated after heating, may contain the organic compounds present in asphalt (Paigen et al., 1985).

PAHs are composed of carbon and hydrogen atoms without a substitution branch, and have a nonpolar, neutral property that is difficult to be degraded by natural organisms (Mastral and Callen, 2000). The International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified the PAHs benzo(a)pyrene, benz(a)anthracene and dibenz(a,h)anthracene as probable (2A) human carcinogens. On the other hand, benzo(b)fluoranthene, indeno(1,2,3-cd)pyrene, naphthalene and benzo(k)fluoranthene are classified as possible (2B) human carcinogens (Mishra et al., 2015). The risks to human health makes the monitoring and identification of sources of PAHs as a top priority, especially in urban areas (Collins et al., 1998). PAHs are known to have carcinogenic, immunotoxic, mutagenic and teratogenic properties, hence their presence in the environment is of great concern (Zhang et al., 2010; Varjani and Upasani, 2017c).

Most PAHs are not genotoxic as individual compounds (Thomas et al., 2002; Mazzeo et al., 2011). But when they are metabolized with other components their epoxides and dihydrodiols are formed which can cause genetic defects (Schwerdtle et al., 2010; Ma et al., 2012). Epoxides and dihydrodiols of aromatic hydrocarbons bind with DNA and change nucleotide codon which is referred to as mutation (Zhang et al., 2014). Regulatory organizations have warned about the possible carcinogenic effects of asphalt fumes for humans, however, these data are still insufficient.

With respect to *in vivo* studies evaluating the toxicological effects of substances, a large number of rodents is often used. As a result, many government agencies have collaborated to outline the need to develop rapid, reliable and alternative methods (Hardin et al., 1992). An alternative and well-

characterized model that has been used for the assessment of efficacy and toxicity is the nematode *Caenorhabditis elegans* (Delgado-Saborit et al., 2011). It was the first multicellular organism to have its genome completely sequenced, which has been found to have a high level of conservation with the vertebrate genome (The *C. elegans* Sequencing Consortium 1998).

Noteworthy, organisms never encounter a single chemical in the environment; parallel exposure to multiple stressors is the norm. Even though there is still a strong single-chemical focus in ecotoxicology, mixture toxicity has become a well-established discipline (Altenburger et al., 2013). For the evaluation of mixtures, two reference concepts are broadly employed for predicting mixture outcomes: the Loewe additivity or dose addition (DA) (Loewe and Muchnik, 1926); and the independent action (IA), developed by Bliss (1939). Dose addition is based on the principle that the components of a certain mixture have a common site/mechanism of action (Silva et al., 2002; Dias Da Silva et al., 2013). The IA model relies on the assumption that the compounds of a given mixture work independently, by acting in different molecular targets and having different modes of action (Backhaus et al., 2000).

In this line, the purpose of this study was to evaluate the acute toxicity of four PAHs, namely benzo(b)fluoranthene, fluorene, 2-nitrofluorene, and benzo(a)pyrene, and their mixtures in *C. elegans*. Additionally, the models DA and IA were applied to predict the potential toxicity of the mixtures. These four PAHs were chosen because showed the highest doses in the asphalt specimens in a previous work (Nascimento et al., 2015).

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Fluorene, benzo(b)fluoranthene, 2-nitrofluorene, benzo(a)pyrene, and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St.Louis, MO, USA). Bacto-agar and bacto-peptona were obtained from Becton Dickinson BD® (New Jersey, USA) and HiMedia Laboratories® (Mumbai, India), respectively.

2.2. Strains

The *C. elegans* strains N2 (wild-type) and the green fluorescent protein (GFP)-marked strains CF1553 [muls84] superoxide dismutase-3 (SOD::GFP) and GA800 [wuls154] catalase-1, 2 and 3 (CAT-1,2,3::GFP) were maintained on nematode growth medium (NGM) plates seeded with *Escherichia coli* OP50, as source of food, at 20°C.

2.3. Synchronization

Gravid *C. elegans* were rinsed off the plates into centrifuge tubes and were lysed with a bleaching mixture (1% NaOCl; 0.25 M NaOH), followed by flotation on a 30% sucrose solution (m/v) to separate eggs. The eggs were washed with M9 buffer (0.02 M KH₂PO₄, 0.04 M Na₂HPO₄, 0.08 M NaCl, and 0.001 M MgSO₄) and allowed to hatch overnight in NGM agar plates without bacteria.

2.4. Treatment

Without using bacteria, 1.500 L1 worms previously synchronized were exposed for 30 minutes at 20°C, by constant agitation in a rotator, to fluorene, benzo(b)fluoranthene, 2-nitrofluorene and benzo(a)pyrene at crescent doses ranging from 1.5 to 25.0 mg.L⁻¹ in a 0.5% NaCl liquid media. Stock solutions of PAHs were made in DMSO. Additionally, worms treated with saline and 5% DMSO were used as controls. After exposure, worms were washed 3 times with 0.5% NaCl to remove the treatments and then, transferred to NGM recovery plates inoculated with *Escherichia coli* - OP50 for posterior assays.

2.5. Worm mortality and LD₅₀ determination

After treatment, worms were washed three times with M9 buffer and placed on OP50-seeded NGM plates. The number of surviving worms on each plate was verified 24 hours after exposure. The lethality data was normalized to controls and presented as percentage. All PAHs were tested in three independent experiments with each concentration tested in two replicates within each experiment.

2.6. Worm development

For the evaluation of development, adult worms (20 nematodes per treatment) were photographed and their body contour was measured. For this, the NGM plates were washed with distilled water and the resulting solution was transferred to a centrifuge tube, where the worm is allowed to settle, separating from the bacteria in suspension. The process is repeated until the solution became clear. After this procedure, 15 μ L of the solution with the worms were deposited on a blade covered by agarose and added of 15 μ L of 2.25% levamisole. Pictures were acquired from 20 worms per treatment, which were manually contoured and measured with AxioVision software LE version 4.8.2.0 for windows.

2.7. Measurement of reactive oxygen species (ROS)

After the exposure, worms were re-suspended in 100 μ L of 0.5% NaCl and transferred to 96-well plates. Additionally, 100 μ L of 0.05 mM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) was added and the fluorescence (excitation: 485 nm; emission: 535 nm) was measured using a microplate reader (Spectramax Me2; Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, USA) at 20°C. The fluorescence from each well was measured every 10 min for up to 90 min. The values were expressed as percentage of fluorescence intensity relative to control. All PAHs and mixtures were tested in three independent experiments with each concentration tested in two replicates within each experiment.

2.8. SOD and CAT fluorescence quantification

The GFP expressing strains (CF1553 [muls84] and GA800 [wuls154]) were submitted to the acute exposure as described above. Worms were maintained in 100 μ L of saline buffer and transferred to a 96-well plate, where total GFP fluorescence was measured using 485 nm excitation and 530 nm emission filters using a microplate reader (Spectramax Me2; Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, USA) at 20°C. The fluorescence from each well was measured for 10 min at 1 min intervals. Results were expressed as the mean percentage of fluorescence intensity relative to control wells.

2.10. Mixture testing

In this work, three mixtures containing four PAHs were prepared by combining the drugs at different ratios (see table 1 in results section). In mixture Mix A, all chemicals were combined in proportion to their LD₅₀, such that they were present at doses that produced the same effect, i.e., individual compounds were combined at equipotent doses. Mixture, Mix B was prepared in a similar manner, but in this case, the four components of the blend were combined in proportion to their individual LD₀₁. Finally, the mixture Mix C was prepared based on a real scenario of known concentrations of PAHs and their derivatives in asphalt fumes (Nascimento et al., 2015).

Then, the stock solutions were serially diluted without changing the ratio between each component. These serial dilutions were performed to cover a large range of doses, so that allowing the production of complete and robust dose-response relationships, which are necessary for the calculations (Dias Da Silva, et al., 2013). For the three designed mixtures, eight doses were tested.

2.11. Prediction models

The normalized data obtained in the worm mortality test for each PAHs were fitted to the dosimetric Logit model: $y = \theta_{\min} + (\theta_{\max} - \theta_{\min}) / \{1 + \exp [\theta_1 - \theta_2 \cdot \log(x)]\}$, where θ_{\min} and θ_{\max} are the minimal and maximal observed effects, respectively, x is the dose of test agent, θ_1 is the parameter for location and θ_2 is the slope parameter (Dias Da Silva, et al., 2013). This nonlinear fit regression model was chosen based on a statistical goodness-of-fit principle after comparison with a large number of other models (Hill, Gompertz, Probit, Weibull, Langmuir, General Logit I and II, etc.).

Then, by using the parameters of the Logit fit of each constituent, the expected effects for the different mixtures were calculated using the DA and IA approaches, as reported by (Dias da Silva et al., 2017). These additivity expectations were further used as a reference for the assessment of combination effects in terms of synergism (if the observed effects are greater than additive predictions), drug additivity (if the experimental mixture outcomes equal the prediction), and antagonism (if the experimental joint effects fall short of additivity).

2.12. Statistical analysis

Nonlinear regression analysis was performed using the specialized software program NLREG—Nonlinear Regression, version 6.6 (Phillip H. Sherrod, USA). As referred, a sigmoidal dose-response Logit model was applied to draw the curves and determine the LD₅₀ value reported in the graph. Comparisons between curves of each substance were made using the extra sum-of-squares F-test. All other statistical analyses and figures were generated with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). Normality of the data distribution was assessed by Kolmogorov-Smirnov normality test. Statistical analysis of significance was carried out by one-way ANOVA followed by Bonferroni post-hoc test. The results were expressed as mean ± SEM. Values of $p \leq 0.05$ were considered significant.

3. Results

3.1. Mortality and LD₅₀ of PAHs

In order to produce the individual data required for calculating predictions of mixture effects, extensive dose–response analyses of all the individual mixture components were carried out. The representation of the dose-response curves for each PAH tested are depicted in figure 1 and the parameters for the Logit models in table 1. Differences were observed essentially in the LD₅₀ values and in the slopes, as all PAHs were able to elicit the maximal mortality (100%) and therefore produce complete plots. Comparatively, benzo(b)fluoranthene (LD₅₀ 8.14 mgL⁻¹) showed highest potency, whilst benzo(a)pyrene (LD₅₀ 17.63 mgL⁻¹) was the least potent chemical tested. Fluorene (LD₅₀ 15.44 mgL⁻¹) shared similar potency with 2-nitrofluorene (LD₅₀ 14.03 mgL⁻¹).

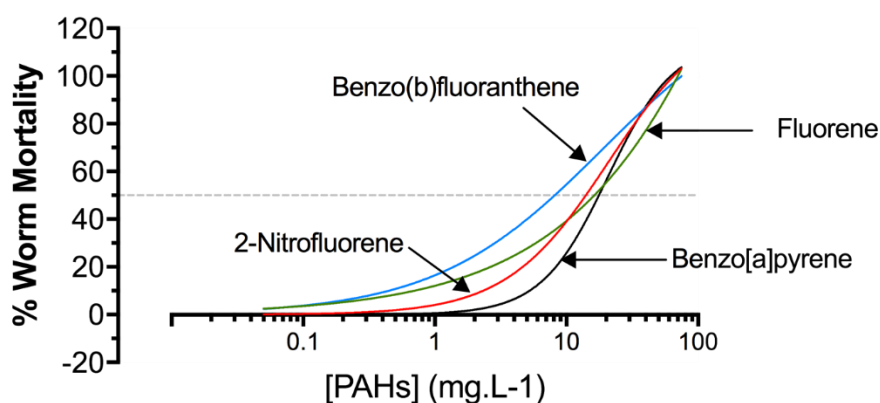


Figure 1. Lethality of the PAHs fluorene (green), benzo(b)fluoranthene (blue), benzo(a)pyrene (black) and 2-nitrofluorene (red) after 30 minute-exposures of *C. elegans*. The mean effects were fitted to the Logit function. Data were obtained from at least 3 independent experiments performed in duplicate.

Table 1. Parameters derived from nonlinear fits of single PAH dose–mortality data to the asymmetric Logit function. Mortality was assessed after 30 minute incubations in *C. elegans*. (figure.1). These parameters were used to compute the predicted mixture effect curves shown in figure 7.

	Estimated parameters for the regression model			LD ₅₀	LD ₀₁	Relative proportion in mixture		
	θ_1^a	θ_2^b	θ_{max}^c			Mix A	Mix B	Mix C
Fluorene	-4,03E+00	1,22E+00	6,92E+02	1,63E+01	8,80E-03	2,90E-01	5,45E-03	3,38E-02
Benzo(b)fluoranthene	-2,01E+00	1,57E+00	1,39E+02	8,14E+00	1,38E-02	1,45E-01	8,53E-03	2,23E-01
Benzo(a)pyrene	-5,20E+00	3,96E+00	1,15E+02	1,76E+01	1,31E+00	3,14E-01	8,12E-01	4,55E-03
2-Nitrofluorene	-3,41E+00	2,59E+00	1,27E+02	1,40E+01	2,82E-01	2,50E-01	1,74E-01	7,39E-01
Mix A	-4,51E+00	2,25E+00	1,90E+02	3,55E+01	4,72E-01	1,00E+00	-	-
Mix B	-3,44E+00	1,30E+00	4,71E+02	1,01E+01	8,21E-03	-	1,00E+00	-
Mix C	-1,65E+00	1,25E+00	1,39E+02	7,20E+00	2,44E-03	-	-	1,00E+00

3.2. Worms Development

The normal development of *C. elegans* was affected by PAHs exposure in a dose-dependent manner (figure 2). Compared to control, fluorene (figure 2A) and benzo(a)pyrene (figure 2D) presented a significant ($p < 0.001$; ANOVA/Bonferroni) reduction in body area for all tested concentrations. For

benzo(b)fluoranthene (figure 2B), a significant ($p<0.001$; ANOVA/Bonferroni) reduction of body area was observed at 2.5, 5, 10 and 15 mgL^{-1} . For 2-nitrofluorene (figure 2 C), a significant ($p<0.001$; ANOVA/Bonferroni) reduction in body area was noted only at 15, 20 and 25 mgL^{-1} .

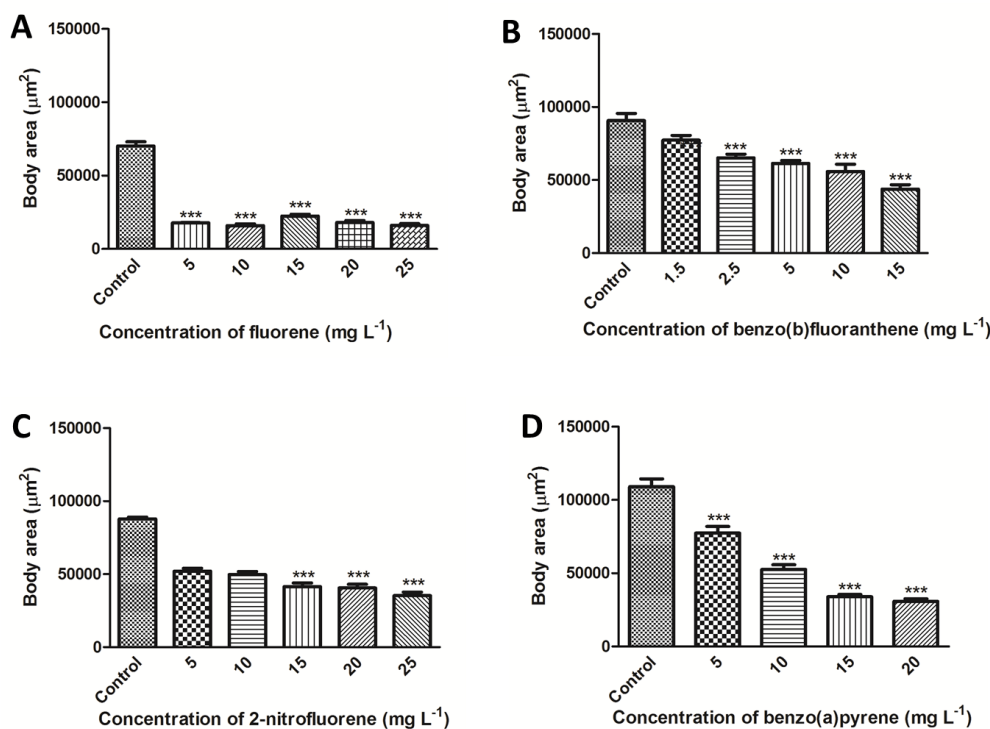


Figure 2. Body areas of *C. elegans* after acute treatment with PAHs in different concentrations. Values are expressed as means \pm SEM from three independent experiments ($n=3$). (A) Fluorene; (B) Benzo(b)fluoranthene; (C) 2-Nitrofluorene; (D) Benzo(a)pyrene. Statistical comparisons were made using one-way ANOVA/Bonferroni post-hoc test. (***) $p<0.001$ vs control).

3.3. The ROS levels in nematodes

Figure 3 showed ROS production, determined with the DCF-DA, which is oxidized into DCF fluorophore in the presence of free radicals. ROS production was significantly increased at 20 mgL^{-1} ($p<0.05$; ANOVA/Bonferroni) and 25 mgL^{-1} ($p<0.01$; ANOVA/Bonferroni) for fluorene (figure 3A). For benzo(b)fluoranthene (figure 3B), a significant increase in ROS was observed at 5, 10 and 15 mgL^{-1} ($p<0.001$; ANOVA/Bonferroni). For 2-nitrofluorene ($p<0.001$;

ANOVA/Bonferroni) and benzo(a)pyrene ($p < 0.05$; ANOVA/Bonferroni), the ROS levels were significantly higher only at 20 mgL⁻¹.

High levels of ROS can lead to an oxidative stress state. In a healthy organism, some enzymes play a detoxifying role. Analyzing the antioxidant enzymes, CAT and SOD (figure 4) levels were significantly increased in the L1 stage in a dose-dependent manner. After fluorene exposure, all tested doses presented a significant ($p < 0.001$; ANOVA/Bonferroni) increase in fluorescence for both CAT (figure 4A) and SOD (figure 4E). For benzo(b)fluoranthene all concentrations presented a significant ($p < 0.001$; ANOVA/Bonferroni) increase in fluorescence for CAT (figure 4B) and SOD (figure 4F). After 2-nitrofluorene exposure, there was a significant increase in CAT (figure 4C) fluorescence at 15, 20, and 25 mgL⁻¹ ($p < 0.001$; ANOVA/Bonferroni), while the fluorescence for SOD (figure 4G) increased significantly at 15, 20, and 25 mgL⁻¹ ($p < 0.001$; ANOVA/Bonferroni). For benzo(a)pyrene, CAT (figure 4D) fluorescence increased significantly at 5, 10, 15, 20, and 25 mgL⁻¹ ($p < 0.001$; ANOVA/Bonferroni), while SOD (figure 4H) presented a significant increase in all tested doses ($p < 0.001$; ANOVA/Bonferroni).

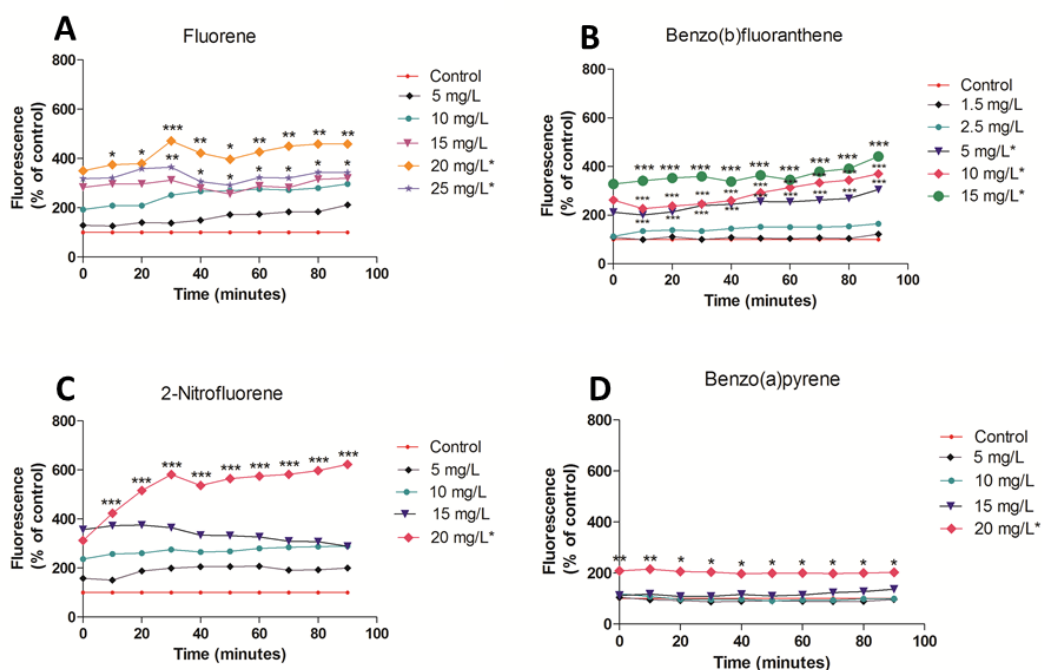


Figure 3. ROS levels measure by DCF-DA: (A) Fluorene; (B) Benzo(b)fluoranthene (C) 2-Nitrofluorene (D) Benzo(a)pyrene. Data are expressed as mean \pm SEM (n=3 independent experiments performed in duplicate). Statistical comparisons were made using repeated measures ANOVA/Bonferroni post-hoc test. (* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001 vs control).

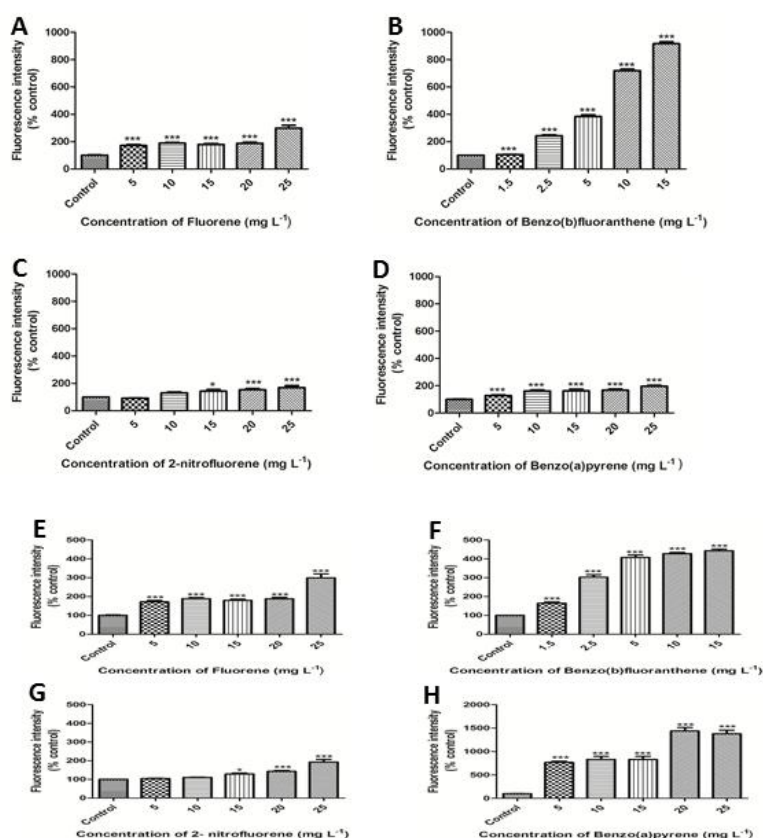


Figure 4. CAT and SOD levels of *C. elegans* after acute treatment with PAHs in different concentrations. Results are expressed as mean \pm SEM (n=3 independent experiments performed in duplicate). **CAT:** (A) Fluorene; (B) Benzo(b)fluoranthene; (C) 2-Nitrofluorene; (D) Benzo(a)pyrene. **SOD:** (E) Fluorene; (F) Benzo(b)fluoranthene; (G) 2-Nitrofluorene; (H) Benzo(a)pyrene. Statistical comparisons were made using one way ANOVA/Bonferroni post-hoc test. (* p <0.05; *** p <0.001 vs control).

3.5. Toxicity evaluation of the PAH mixtures

As described previously, in Mix A, all chemicals were combined at their DL_{50} , such that they were present at equieffective concentrations ensuring that each drug contributed equally to the overall mixture effect. This mixture was designed aiming to assess the validity of the two competing prediction models. Based on the dose–response relationships of the individual chemicals, the concepts of IA and DA were used to predict the additive joint effects of the four drugs. As seen in figure 6A, the slope for each prediction model was similar, both ranging the same order of magnitude from minimal to maximal mortality. The combined effects were then tested experimentally, revealing an antagonistic effect, with LD_{50} of 35.50 mgL^{-1} .

In Mix B, chemicals were mixed in a similar manner to Mix A, but this time, in proportion to their LD_{01} , to test possible joint effects when individual components are present at ineffective doses. As shown in figure 6D, when each component of the mixture was individually tested at the LD_{01} , they produced very low effects, which could not be statistically differentiated from negative controls. Nonetheless, when mixed at those ineffective concentrations, they were able to act together to produce significant synergistic responses, 1.61 mgL^{-1} of Mix B was responsible for around 20% of worms death. DA and IA predicted effects were surprisingly lower (3.70 and 3.99%, respectively).

Finally, Mix C was conceived with the aim of confirming the joint-effects in a more realistic exposure scenario associated with the PAHs levels presented in the asphalt specimens (Nascimento et al., 2015). Interestingly, a synergistic effect was observed in the lower dose range (up to doses producing about 40% effect), which turned to an additive behavior at higher concentrations (figure 6C).

Additive combination effects were predicted using the models of dose addition (DA) and independent action (IA), represented by the solid red and blue lines, respectively. Curves were fitted to the Logit model (table 1). The dashed lines are the upper and lower limits of the 95% confidence interval of the best estimate of mean responses. Data are presented as percentage of worm mortality relative to the negative controls and were obtained from at least 3 independent experiments performed in duplicate.

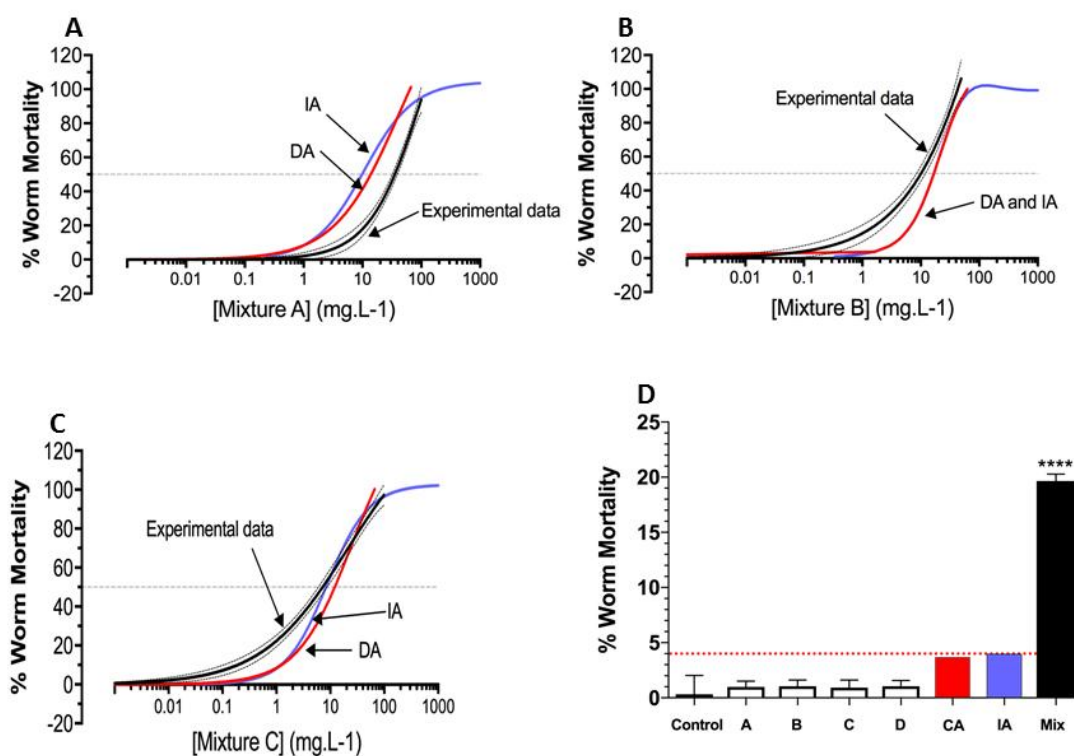


Figure 6. Predicted and observed data for the toxicity of three mixtures of fluorene, benzo(b)fluoranthene, benzo(a)pyrene and 2-nitrofluorene in *C. elegans* after 30 minute-exposition. (A) Mix A: mixture of PAHs combined in proportion to their LD₅₀ values. (B) Mix B: mixture of PHAs combined in proportion to their LD₀₁ values. (C) Mix C: mixture of PHAs presented in asphalt fumes (NASCIMENTO *et al.*, 2015). (D) Individual effects of fluorene (A), benzo(b)fluoranthene (B), benzo(a)pyrene (C) and 2-nitrofluorene (D) at the concentrations present in 1.6133 mgL⁻¹ of mixture B (which is the concentration of the mixture when all compounds are mixed at their LD₀₁). CA: Concentration addition prediction. Mix: observed effect of 1.6133 mgL⁻¹ of mixture B. Data are from at least three independent experiments run in duplicate. The dashed red line corresponds to the sum of the individual effects of all mixture components. Error bars represent SEM. **** show statistically significant differences between the mixture and all other treatments. (*****p*>0.0001).

3.6. PAHs mixtures and development of *C. elegans*

As observed for the individual treatments, the normal development of *C. elegans* was modified in a dose-dependent manner after PAHs exposure. The worms had a significant decrease in the body area when compared to the control group for all tested concentrations ($p < 0.001$; ANOVA/Bonferroni) for mixtures A and B, as shown in figure 5AB. Surprisingly, for the Mix C, only at 40, 50, and 75 mgL⁻¹ a significant reduction in worm body area was noted ($p < 0.001$; ANOVA/Bonferroni), figure 5C.

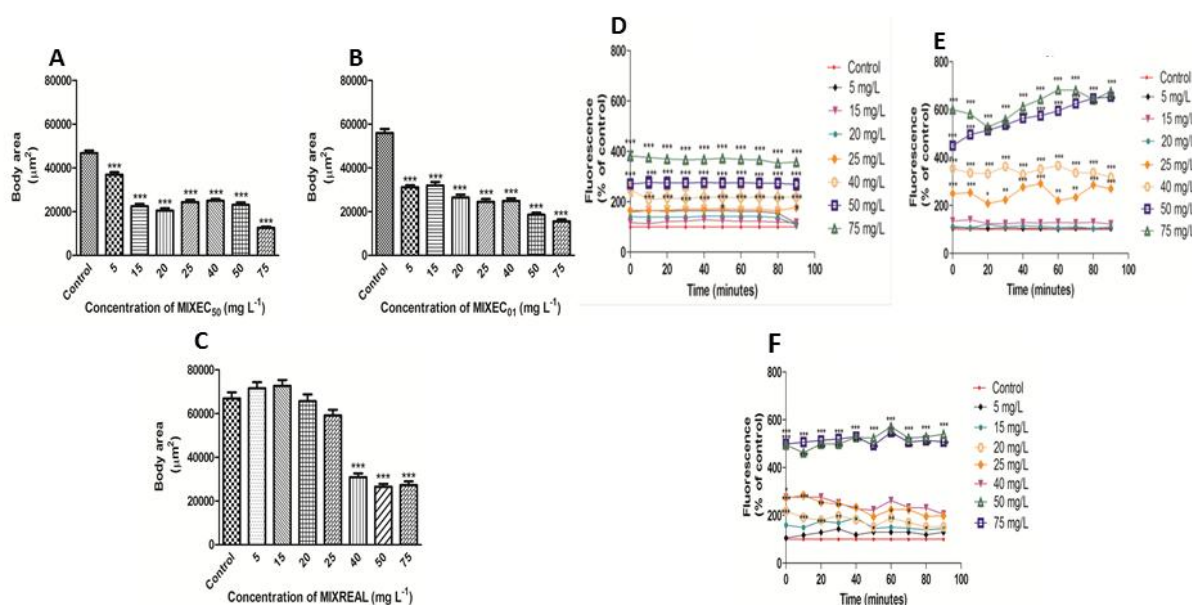


Figure 5. Body area of *C. elegans* after acute treatment with MixA, MixB and MixC at different concentrations and Results of ROS through the DCF-DA method. Results are expressed as mean SEM (n=3 independent experiments performed in duplicate). **Body area:** (A) MIXEC₅₀; (B) MIXEC₀₁; (C) MIXREAL and **ROS:** (D) MIXEC₅₀; (E) MIXEC₀₁; (F) MIXREAL. Statistical comparisons were made using ANOVA/Bonferroni. (** $p < 0.001$ vs. control) and measures ANOVA/Bonferroni. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs control group), respectively.

3.7. PAHs mixtures and reactive oxygen species

The ROS production for the mixtures is depicted in figure 5. For Mix A, there was a significant increase in ROS production at 40, 50, and 75 mgL⁻¹ ($p < 0.001$; ANOVA/Bonferroni; figure 5D). For Mix B, a significant increase in ROS production was noted at 25, 40, 50, and 75 mgL⁻¹ ($p < 0.05$; two way ANOVA/Bonferroni; figure 5E). For Mix C, a significant increase in ROS production was observed at 20, 50, and 75 mgL⁻¹ ($p < 0.05$; two way ANOVA/Bonferroni; figure 5F).

4. Discussion

In the present study, the toxic effects of four PAHs were examined individually and in combination. Based on previous chemical analysis of the asphalt fumes and derivatives samples (Nascimento et al., 2015), the compounds with the higher concentrations were chosen for the toxicological evaluation. The selected molecules were 2-nitrofluorene, benzo(b)fluoranthene, fluorene, and benzo(a)pyrene. The toxicity of the main constituents of asphalt is an important issue to be evaluated in environmental studies. In this scenario, the use of an *in vivo* alternative model is in agreement with the 3Rs policy (Russel, and Burch, 1959), providing complementary approaches in the toxicological field.

PAHs are absorbed through the lungs, gastrointestinal tract, and skin. They can be widely distributed throughout the body but are mainly localized in lipid-rich internal organs. PAHs metabolism is complex, in general, they are converted into epoxides, which are subsequently converted into phenols, diols, and triols, which are then conjugated with glucuronic acid, sulfate, or glutathione. These metabolites have been linked to carcinogenesis-induced by PAH, as they can bind to DNA (Xue e Warshawsky, 2005).

The use of DA and IA predicting models requires an exhaustive characterization of the dose–effect relationships of the individual mixture components, in terms of shape, position (along the dose axis) and maximal effect (Drescher and Boedeker, 1995). Because of this, the doses used in this work were about five-times higher than the doses used in *in vitro* studies (Topinka et al., 2008; Topinka et al., 2011). These high doses are needed because in organisms such as *C. elegans*, oral ingestion is the primary route of

uptake of particle-associated contaminants as PAHs (Forbes et al., 1998), rather than via its cuticle. The nematode's cuticle was reported to be impervious to most chemicals (Peters et al., 1952).

All PAHs presented dose-dependent effect, as observed by the viability assessment curves. Based on the LD₅₀, it was found that benzo(b)fluoranthene (8.14 mg L⁻¹) was the most potent chemical, followed by 2-nitrofluorene (14.03 mg L⁻¹), fluorene (15.44 mg L⁻¹) and benzo(a)pyrene (17.63 mg L⁻¹). The fluorene level of toxicity was similar to that reported by (Tae-Hoon Nam et al., 2015) in the earthworm *Eisenia fetida* after 24 h exposure. Previous studies on *Daphnia magna*, *Artemia salina*, *Chironomus tentans* indicated that higher doses of PAHs (sometimes beyond their respective solubility limits) produced lethality in 24 to 48 h toxicity tests (Suedel and Rodgers, 1996). A study found toxicity to benzo(a)pyrene after 72 h of exposure to *C. elegans* (Sese et al., 2009).

It is known that the rate of toxicity of a compound to an organism is a function of the exposure route, the biotransformation and detoxification capacities, and the receptor sensitivity. Several studies (Dean-Ross et al., 2001) suggested that the uptake of organic substances into soil dwelling organisms is governed by pore-water concentrations of the compounds in question. One possibility as to why the PAHs compounds did not exert high acute toxicity to *C. elegans*, as would be expected, relates to their relatively high volatility and low water solubility precluding their interaction with the organism (Dean-Ross et al., 2001).

In the current study, the worm development was also used to evaluate the toxic effects of PAHs. The growth of the worms was reduced at doses that did not present signs of mortality. This effect was also reported for other chemicals, such as metals, using *C. elegans* as test organism (Traunspurger et al., 1997; Anderson et al., 2001; Sochová et al., 2007). Since other chemicals may differ from PAH in bioavailability, exposure routes, mechanisms of action, etc., a straight forward comparison of organism sensitivity may be difficult.

Following environmental stress, such as that provoked by PAHs, some cellular redox modifications may happen through the production of free radicals. The complex antioxidant defense mechanisms displayed by the cell should be able to counteract the risk of pro-oxidative injury. Nevertheless, oxidative stress

occurs when the massive generation of ROS exceeds the capability of the cell machinery to scavenge the overload of reactive molecules. The imbalance between ROS and cellular antioxidants is involved in the toxicity mechanism of a large number of compounds (Sies, 1997) through the damage of vital cellular structures, such as nucleic acids, proteins, and lipids (Dias Da Silva et al., 2013). *C. elegans* is similar to higher eukaryotes in many molecular and cellular pathways that are linked to metabolism and stress responses (Kaletta and Hengartner, 2006; Kenyon, 2010). PAHs can increase the production of reactive species, as well as a significant reduction of antioxidant defenses, possibly through the production of reactive metabolites (Banni et al., 2009). In fact, according to their chemical structure, they seem little reactive and appear to induce little toxicity. Notwithstanding, through chemical or biochemical processes they can be transformed into more reactive and consequently more toxic products. The incorporation of oxygen in the ring of PAH has a polarizing effect, which leads to the production of reactive species (Oris and Giesy, 1987).

At higher drug levels, it was possible to observe an increase in ROS production followed by a compensatory increase in the antioxidant enzymes CAT and SOD in a dose-dependent manner. Here, for the first time, it was demonstrated an increase in the enzymatic antioxidant defenses through the presence of fluorescence in GFP marked nematodes after PAHs exposure. Therefore, the antioxidant enzymatic system plays a vital role in the PAHs toxicity, probably as a response to ROS detoxification. However, whether the exposure to PAHs is the direct cause of worms mortality, or whether this is secondary to the drug metabolic alterations in *C. elegans* is currently unclear (Yasuda et al., 2011).

The presence of PAHs in the environment has attracted much concern due to their mutagenic and carcinogenic properties (Sese et al., 2009). The majority of the *in vitro* genotoxic and tumorigenic studies have focused on the effect of a single PAH compound (Jones et al., 1996; Roh et al., 2007; Kim and Choung, 2009). In order to assess the health risk of environmental pollutants in the asphalt, a PAH mixture with the same relative proportion as real complex mixtures was evaluated in human cell lines (Binkova et al., 2003).

Willing to extend these studies to an animal organism, we evaluated the effects of mixtures of PAHs with known mechanisms of action in the nematode

C. elegans. Considering the comparisons between predicted and experimentally observed effects, DA and IA models proved to be invaluable tools for the assessment of joint effects of mixtures of PAHs in this *in vivo* system. The responses of the three mixtures failed mathematical expectations. Considering the two basic concepts, DA generally produce slightly more conservative predictions (predicting larger effects than IA) (Dias Da Silva, et al., 2017), and it is the most recommended model for risk assessment purposes, as it ensures higher level of protection. However, herein, both models presented very similar predictions, with little variations in LD₅₀ from one to another. The discrimination between predictions derived from DA and IA relies on the number of the mixture components (four in the current case), their concentration ratio in the mixture, the slopes of their dose-response functions and the regression model used to describe the relationships between doses and effects of single agents. Approaches to increase the separation between the two predictions would rely on the change of one of the previous conditions, such as the increase of the number of individual mixture components.

Comparing the toxicity prediction data obtained with the experimental data from the three mixtures testing, deviations from additivity were observed for both models. Usually, the models assume that the mixture components do not interact with, potentiate or antagonize each other. For this reason, potential pharmacokinetic interactions between chemicals, such as the induction or inhibition of metabolic pathways are not foreseen in the calculations (Dias Da Silva et al., 2013). PAHs have a close structural and functional relationship and use the same pharmacological and detoxification pathways (Xue e Warshawsky, 2005). Therefore, it is plausible that all four chemicals will compete and consequently interact with the metabolism and detoxification of each other in an unexpected manner. Ultimately, this could result in the deviations from additivity here reported.

On the other side, when each component of the mixture was individually tested at its LD₀₁ (Mix B), very low effects were produced, which could not be statistically differentiated from untreated controls. Nevertheless, when mixed at these same doses, the four substances were able to act together to produce very significant effects. These effects were even greater than the predicted by DA or IA models, characterizing a synergism. In order to assess whether the

prognostic value of DA and IA expectations fitted to more realistic scenarios, we studied Mix C. Notably, we observed a dual effect; at higher doses, the experimental effects confirmed the predictions (additivity). However, at doses up to 50% lethality, which are more relevant at environmental scenarios, the exact same synergistic outcomes were observed, raising great concerns regarding the risk of environmental harm. To explore the potential for synergistic effects between chemicals, it is necessary to understand sites and mechanisms of action, enzymes and rates for detoxification and activation, rates of uptake, and the sensitivity of enzymes to the chemical(s) (Denton et al., 2003). The characterization of the metabolic profile of the mixture constituents when tested both individually and in combination could also provide valuable information that add to the understanding of the underlying mechanisms of the reported mixture effects (Dias Da Silva et al., 2013). Many mixtures showed greater-than-additive effects because one of the chemicals induced a change in the toxicokinetics (such as alternative mechanism of action, absorption and metabolism rates) in the organism (Lydy et al., 2004). Basically, six process have been described as important for synergistic interactions of a chemical towards an organism: bioavailability, uptake, internal transportation, metabolization, binding at the target site and excretion (Cedergreen, 2007a). One of the major reasons for synergistic effects has been assumed to be alterations of enzymes responsible for the toxicant metabolism, such as cytochrome P450 (CYP450) and GST, since the activation or detoxification of one chemical in the mixture can be triggered by another chemical (Cedergreen, 2007a). In this case, we highly believe that at least one PAH might decrease the detoxification of the others, as interactions of these chemicals with CYP450 are described.

5. Conclusions

Our findings demonstrated that the four PAHs, which have been found at major concentrations in asphalt fumes, presented relevant toxicity in the alternative *in vivo* model *C. elegans*. Furthermore, we could observe *in vivo* that these PAHs modulate the levels of CAT and SOD in the nematodes. The use of a multicellular organism is considered a good alternative to evaluate the toxicity of PAHs and this is an important model once these PAHs are present in the environment. Besides, the different types of combined effects observed

between PAHs underline the importance of considering a mixture approach when evaluating their toxicity. The results obtained from the mere investigation of the single chemicals could lead to the inaccurate estimation of the detrimental effects elicited by these PAHs. In particular, the occurrence of synergistic toxicity highlighted herein strongly emphasizes the putative ecotoxicological risk, raising concerns regarding the regulatory thresholds for these contaminants, which have been established based on single exposures.

Acknowledgements

G. Göethel is the recipient of a CNPq PhD scholarship (Grant number: 141716/2014-2); and S.C. Garcia is recipient of CNPq Research Fellowship. The authors are grateful to Petrobras financial support.

Declaration of interest

All authors declare that there are no conflicts of interest.

References

1. Altenburger, R., et al., 2013. Simplifying complexity: mixture toxicity assessment in the last 20 years. *Environ. Toxicol. Chem*, v.32, p.1685–1687.
2. Anderson, G.L., et al., 2001. Assessment of sublethal endpoints for toxicity testing with the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Toxicol. Chem*, v.20, p.833–838.
3. Backhaus, T., et al., 2000. Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio fischeri*. *Environ. Toxicol. Chem*, v.19 (9), p.2348–2356.
5. Banni, M., et al., 2009. Mixture toxicity assessment of cadmium and benzo[a]pyrene in the sea worm *Hediste diversicolor*. *Chemosphere*, v.77(7), p.902-6.
4. Binkova, B., et al., 2003. Biological activities of organic compounds adsorbed onto ambient air particles: comparison between the cities of Teplice and Prague during the summer and winter seasons 2000–2001. *Mutat. Res*, v.525, p. 43–59.
5. Bliss, C.I., 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann Appl Biol*, v.26, p.585–615.
6. Cedergreen, N., et al., 2007a. Is mixture toxicity measured on a biomarker indicative of what happens on a population level? A study with *Lemna minor*. *Ecotoxicol Environ*, v.67 (3), p.323-32.
8. Collins, J.F., et al., 1998. Potency equivalency factors for some polycyclic aromatic hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbon derivatives. *Regul. Toxicol. Pharmacol*, v. 28, p. 45–54.
9. Dean-ross D., et al., 2001. Metabolism of anthracene by a *Rhodococcus* Species. *Microbiol Lett*, v.204(1), p.205-11.
10. Delgado-Saborit, J.M., et al., 2011. Carcinogenic potential, levels and sources of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures in indoor and outdoor environments and their implications for air quality standards. *Environ.Int*, v.37, p. 383–392.

11. Denton, D., et al., 2003. Joint acute toxicity of esfenvalerate and diazinon to fathead minnow (*Pimephales promelas*) larvae. *Environ Toxicol Chem*, v.22, p. 336–41.
12. Dias da Silva, D., et al., 2013. The risky cocktail: what combination effects can we expect between ecstasy and other amphetamines? *Arch.Toxicol*, v.87 (1), p.111–122.
13. Dias da Silva, D., et al., 2013. Cytotoxic effects of amphetamine mixtures in primary hepatocytes are severely aggravated under hyperthermic conditions. *Toxicol In Vitro*, v.27(6), p.1670-8.
14. Dias da Silva, D., et al., 2017. In vitro hepatotoxicity of 'Legal X': the combination of 1-benzylpiperazine (BZP) and 1-(m-trifluoromethylphenyl)piperazine (TFMPP) triggers oxidative stress, mitochondrial impairment and apoptosis. *Arch.Toxicol*, v.91(3), p.1413-1430.
15. Drescher K. and Boedeker W., 1995. Assessment of the combined effects of substances—The relationship between concentration addition and independent action. *Biometrics*, v.51, p.716–730.
16. Forbes, K.C., et al., 1998. Suppressors of *cdc25p* overexpression identify two pathways that influence the G2/M checkpoint in fission yeast. *Genetics*, v. 150(40), p.1361-75.
17. Hardin, J.A., et al., 1992. Mechanisms by which benzo[a]pyrene, an environmental carcinogen, suppresses B cell lymphopoiesis. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, v.117, p.155–164.
18. Jones, D., et al., 1996. Transgenic strains of the nematode *C. elegans* in biomonitoring and toxicology: effects of captan and related compounds on the stress response. *Toxicology*, v.109, p.119–127.
19. Kaletta and Hengartner, 2006. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov*, v.5, p.387-399.
20. Kenyon, C.J., 2010. The genetics of ageing. *Nature*, v.25, p.464-504.
21. Kim S.J. and Choung S.Y., 2009. Whole genomic expression analysis of octachlorostyrene-induced chronic toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Arch. Pharm. Res*, v.32, p.1585–1592.
22. Lydy, M., et al. 2004. Challenges in regulating pesticide mixtures. *Ecol Soc*, v.9, p.1.

23. Loewe, S. and Muchnik, H., 1926. Effect of combinations: mathematical basis of the problem. *Arch Exp Pathol Pharmacol*, v.114, p.313–326.
24. Ma, L., et al., 2012. The effects of aging time on the fraction distribution and bioavailability of PAH. *Chemosphere*, v.86, p.1072-1078.
25. Mastral, A. and Callen, M.S. 2000. A review on PAH emissions from energy generation. *Environ. Sci. Technol*, v. 34, p. 3051–3057.
26. Mazzeo, D.E.C., et al., 2011. Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. *Chemosphere*, v.85, p.13-18.
27. Mishra, N., et al., 2015. Atmospheric polycyclic aromatic hydrocarbons in the urban environment: occurrence, toxicity and source apportionment. *Environ. Pollut*, v. 208, p. 110-117.
28. Nascimento, P.C., et al., 2015. Determination of oxygen and nitrogen derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons in fractions of asphalt mixtures using liquid chromatography coupled to mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *J Sep Sci*, v.38, p. 4055-4062.
29. Oris J.T and Giesy J.P, 1987. The photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to larvae of the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Chemosphere*, v.16, p.1396-1404.
30. Paigen, B., et al., 1985. Effect of 3-methylcholanthrene on the development of aortic lesions in mice. *Cancer Res*, v. 45, p. 3850–3855, 1985.
31. Peters H., et al., 1952. Pax1 and Pax9 synergistically regulate vertebral column development. *Development*, v. 126, p. 5399–5408.
32. Roh J.Y., et al., 2007. Toxic effects of di(2-ethylhexyl)phthalate on mortality, growth, reproduction and stress-related gene expression in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Toxicology*, v.237, p.126–133.
33. Russel W. and Burch R., 1959. *The Principles of Human Experimental Technique*. London: Methuen & Co. Ltd. London.
34. Schwerdtle, T., et al., 2010. Genotoxicity of soluble and particulate cadmium compounds: impact on oxidative DNA damage and nucleotide excision repair. *Chem. Res. Toxicol*, v.23(2), p.432-442.

35. Sese B.T., et al., 2009. Toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Toxicol. Environ. Health*, v.72, p.1168–1180.
36. Sies H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*, v.82, p. 291–295.
37. Silva, E., et al., 2002. Something from “nothing” – eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. *Environ. Sci. Technol.*, v.36 (8), p.1751–1756.
38. Sochová, I., et al., 2007. Effects of seven organic pollutants on soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ. Int*, v.33, p.798–804.
39. Suedel, J. and Rodgers, J.H., 1996. Toxicity of fluoranthene to *Daphnia magna*, *Hyalella azteca*, *Chironomus tentans*, and *Stylaria lacustris* in water-only and whole sediment exposures. *Environ. Contam. Toxicol*, v.57, p.132-138.
40. Tae-Hoon Nam, et al., 2015. Determination of biomarkers for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) toxicity to earthworm (*Eisenia fetida*). *Environ. Geochem. Health*, v.37, p.943–951.
41. The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: A platform for investigating biology. *Science* 282: 2012–2018.
42. Thomas, K.V., et al., 2002. Characterization of potentially genotoxic compounds in sediments collected from United Kingdom estuaries. *Chemosphere*, v.49 (3), p.247-258.
43. Topinka, J., et al., 2008. DNA adducts formation and induction of apoptosis in rat liver epithelial ‘stem-like’ cells exposed to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res*, v.638, p.122-132.
44. Topinka, J., et al., 2011. DNA adducts and oxidative DNA damage induced by organic extracts from PM 2.5 in an acellular assay. *Toxicol. Lett*, v. 202, p.186–192.
45. Traunspurger, W., et al., 1997. Ecotoxicological assessment of aquatic sediments with *Caenorhabditis elegans* (nematoda) - A method for testing in liquid medium and whole sediment samples. *Environ. Toxicol. Chem*, v.16, p.245–250.

46. Varjani, S.J. and Upasani, V.N., 2017c. Crude oil degradation by *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514: influence of process parameters. *Indian J. Exp. Biol*, v.55, p.493-497.

47. Xue, W. and Warshawsky, D., 2005. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. *Toxicol. Appl. Pharmacol*, v. 206, p. 73–93.

48. Yasuda, K., et al., 2011. Tunneling nanotubes mediate rescue of prematurely senescent endothelial cells by endothelial progenitors: exchange of lysosomal pool. *Aging*, v.3, p. 597–60.

49. Zhang, W., et al., 2010. Bacterial communities in PAH contaminated soils at an electronic-waste processing center in China. *Ecotoxicol*, v.19, p. 96-104.

50. Zhang, Y., et al., 2014. Levels, sources, and potential ecological risks of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in a typical effluent-receiving river (Wangyang River), North China. *Arab. J. Geosci*, v.8(9), p.1-9.

CAPÍTULO 2

**Chronic toxicity of most prevalent polycyclic aromatic hydrocarbons in
bitumen fumes**

Manuscrito a ser submetido à revista *PLoS ONE*

Chronic toxicity of most prevalent polycyclic aromatic hydrocarbons in bitumen fumes

Gabriela Göethel^{a,b}, Jessica Nardi^{a,b}, Bruna Gauer^{a,b}, Sabrina Nascimento^{a,b}, Ingrid Garcia^a, Otávio Soldatelli^a, Denise Bohrer^c, Daiana S Ávila^d, Vera L Eifler-Lima^e, Marcelo D Arbo^{a,b}, Solange Cristina Garcia^{a,b}

^aLaboratório de Toxicologia (LATOX), Departamento de Análises, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

^bPrograma de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

^cDepartamento de Química, Universidade Federal de Santa Maria - UFSM, Santa Maria, RS, Brasil.

^dGrupo de Pesquisa em Bioquímica e Toxicologia em *Caenorhabditis elegans* (GBToxCE), Universidade Federal do Pampa - UNIPAMPA, Uruguaiana, RS, Brasil.

^eLaboratório de Síntese Orgânica Medicinal (LaSOM), Departamento de Produção de Matéria Prima, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil.

*Corresponding author: Prof Dr Solange C. Garcia. (S.C. Garcia).
Email: solange.garcia@ufrgs.br

Address: Avenida Ipiranga 2752/605B, Santa Cecília, Porto Alegre, RS, Brazil. CEP: 90610-000. Tel.: (+55) 51 3308-5297. Fax: (+55) 51 3308-5437.

ABSTRACT

Bitumen fumes are composed of a mixture of particles and vapours, compounds belonging to one or more aliphatic, cyclic, aromatic, saturated, and non-saturated classes. A major risk associated with exposure to asphalt is being exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and alkyl derivatives. PAHs are increasingly emitted in the environment as a consequence of human activities, and are considered priority environmental pollutants due to their carcinogenicity and mutagenicity. This study aimed to evaluate the chronic toxicity of four PAHs, benzo(b)fluoranthene, fluorene, 2-nitrofluorene, and benzo(a)pyrene, in *Caenorhabditis elegans*. These four PAHs were chosen because, previously, they showed the highest concentrations in the asphalt specimens. LD₅₀, worm development, reproduction and reactive oxygen species (ROS) were evaluated after chronic exposure to the PAHs. LD₅₀ for fluorene, benzo(b)fluoranthene, 2-nitrofluorene, and benzo(a)pyrene were 5.47, 2.92, 1.33, and 1.93 mgL⁻¹, respectively. The normal development and reproduction of *C. elegans* were affected by PAHs exposure. These effects were accompanied by increased ROS production. Our findings demonstrated that the four PAHs, presented relevant toxicity in the alternative *in vivo* model *C. elegans*. This model may provide accurate and rapid results, contributing to better exploration of the PAHs toxicity.

Keywords: bitumen fumes; chronic toxicity; *C. elegans*; reactive oxygen species; reproduction

1. Introduction

The International Agency for Research on Cancer (IARC) classified hard bitumen and its emissions during work, including road paving, as possibly carcinogenic to humans, placing it in group 2B in 2013 (IARC, 2013). Bitumen fumes are a mixture of particles and vapours, belonging to one or more aliphatic, cyclic, aromatic, saturated, and non-saturated classes. They are complex mixtures behaving as a low polarity matrix (Sutter et al., 2016). A major risk associated with exposure to asphalt is the exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and alkyl derivatives, which are by products of petroleum processing or combustion. These are highly carcinogenic at relatively low concentrations (Neghab et al., 2015).

Among xenobiotics, PAHs form a diverse family of compounds containing at least two aromatic rings. The increased emissions of PAHs in the environment are a consequence of human activities, and they are considered priority environmental pollutants due to their carcinogenicity and mutagenicity (Lewtas et al., 2007; Vignet et al., 2016). Additionally, PAHs are of great environmental and health concern as they are recalcitrant, bioaccumulative and toxic to living organisms and ecosystems (Kweon et al., 2011; Hajisamoh, 2013).

It is known that PAHs produce reactive metabolites by a series of xenobiotic-metabolizing enzymes and some PAHs have great potential to bind to cellular proteins and DNA, often generating toxic effects. The resulting biochemical disruption and cell damage can lead to mutations, developmental malformations, tumors, and cancer (Kim, 2013).

The effects of PAHs on human health depend mainly on the duration and rate of exposure, as well as the concentration and the innate toxicity of the individual PAH (Rengarajana et al., 2015). The US Department of Health and Human Services (DHHS) has determined that benzo(a)anthracene, benzo(b)fluoranthene, benzo(j)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, benzo(a)pyrene, dibenz(a,h)anthracene, and indeno(1,2,3-c,d)pyrene are known animal carcinogens. For the International Agency for Research on Cancer (IARC), benzo(a)anthracene, benzo(a)pyrene, benzo(b)fluoranthene, benzo(j)fluoranthene, benzo(k)fluoranthene, and indeno(1,2,3-c,d)pyrene are probable human carcinogens, and anthracene, benzo(g,h,i)perylene,

benzo(e)pyrene, chrysene, fluoranthene, fluorene, phenanthrene and pyrene are not classifiable regarding their carcinogenicity to humans (ATSDR 1995; Alegbeleye et al., 2017).

In this line, the purpose of this study was to evaluate the chronic toxicity of four PAHs, benzo(b)fluoranthene, fluorene, 2-nitrofluorene, and benzo(a)pyrene, in alternative model namely *Caenorhabditis elegans*. These four PAHs were chosen because showed the highest levels in the asphalt specimens in a previous work (Nascimento et al., 2015).

2. Materials and Methods

2.1. Chemicals

Fluorene, benzo(b)fluoranthene, 2-nitrofluorene, benzo(a)pyrene, and 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St.Louis, MO, USA). Bacto-agar and bacto-peptona were obtained from Becton Dickinson BD® (New Jersey, USA) and HiMedia Laboratories® (Mumbai, India), respectively. All other chemicals and solvents were from analytical grade.

2.2. *C. elegans* strain and synchronization

The *C. elegans* strains N2 (wild-type) were maintained on nematode growth medium (NGM) plates seeded with *Escherichia coli* OP50, as source of food, at 20°C. Gravid *C. elegans* were rinsed off the plates into centrifuge tubes and were lysed with a bleaching mixture (1% NaOCl; 0.25 M NaOH), followed by flotation on a 30% sucrose solution (m/v) to separate eggs. The eggs were washed with M9 buffer (0.02 M KH₂PO₄, 0.04 M Na₂HPO₄, 0.08 M NaCl, and 0.001 M MgSO₄) and allowed to hatch overnight in NGM agar plates without bacteria.

2.3. Worms treatment

Without using bacteria, 1.500 L1 worms previously synchronized were exposed for 12 hours at 20°C, by constant agitation in a rotator, at crescent doses ranging from 0.25 to 20.0 mg.L⁻¹ of fluorene, benzo(b)fluoranthene, 2-nitrofluorene and benzo(a)pyrene in a 0.5% NaCl liquid media. Stock solutions

of PAHs were made in DMSO. Additionally, worms treated with saline and 5% DMSO were used as controls. After exposure, worms were washed 3 times with 0.5% NaCl to remove the treatments and then, transferred to NGM recovery plates inoculated with *Escherichia coli* - OP50 for posterior assays.

2.4. Lethal dose 50% (LD₅₀) evaluation

The LD₅₀ of PAHs was determined in *C. elegans* after chronic exposure. Worms were washed three times with NaCl buffer and placed on OP50-seeded NGM plates. The number of surviving worms on each plate was verified 24 hours after exposure. The lethality data was normalized to controls and presented as percentage. All PAHs were tested in three independent experiments with each concentration tested in two replicates within each experiment.

2.5. Body area

For the evaluation of body area, 48 hours after exposure, adult worms (20 nematodes per treatment) were photographed and their body contour was measured. For this, the NGM plates were washed with distilled water and the resulting solution was transferred to a centrifuge tube, where the worm is allowed to settle, separating from the bacteria in suspension. The process is repeated until the solution became clear. After this procedure, 15 µL of the solution with the worms were deposited on a blade covered by agarose and added of 15 µL of 2.25% levamisole. Pictures were acquired from 20 worms per treatment, which were manually contoured and measured with AxioVision software LE version 4.8.2.0 for windows.

2.6. ROS measurement

Shortly after chronic exposure, worms were re-suspended in 100 µL of 0.5% NaCl and transferred to 96-well plates. Additionally, 100 µL of 0.05 mM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) was added and the fluorescence (excitation: 485 nm; emission: 535 nm) was measured using a microplate reader (Spectramax Me2; Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, USA) at 20°C. The fluorescence from each well was measured every 10 min for up to 90

min. The values were expressed as percentage of fluorescence intensity relative to control. All PAHs were tested in three independent experiments with each concentration tested in two replicates within each experiment.

2.7. Reproduction

The reproduction was evaluated by counting the brood size after the exposures. Worms from each treatment were individually transferred daily to NGM plates with *E. coli* OP50 and worms were allowed to lay eggs. The hatched larvae were counted until the end of the reproductive period of each worm.

2.8. Statistical analysis

All statistical analyzes were generated with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA). Normality of the data distribution was assessed by the Kolmogorov–Smirnov normality test. Statistical analysis of significance was performed by one-way ANOVA, or repeated measures ANOVA, for the ROS quantification, followed by Bonferroni post-test. When experimental data presented not normal distribution, the statistical analysis was performed by Kruskal-Wallis/Dunn's post-hoc. Significance was accepted at $p < 0.05$.

3. Results

3.1 LD₅₀ of PAHs after chronic exposure

Figure 1 shows the percentage of survived worms survival after 12 h treatment. Comparatively, 2-nitrofluorene (LD₅₀ 1.33 mgL⁻¹) showed higher toxicity, followed by benzo(a)pyrene (LD₅₀ 1.93 mgL⁻¹). Benzo(b)fluoranthene and fluorene present LD₅₀ values of 2.92 mgL⁻¹ and 5.47 mgL⁻¹, respectively.

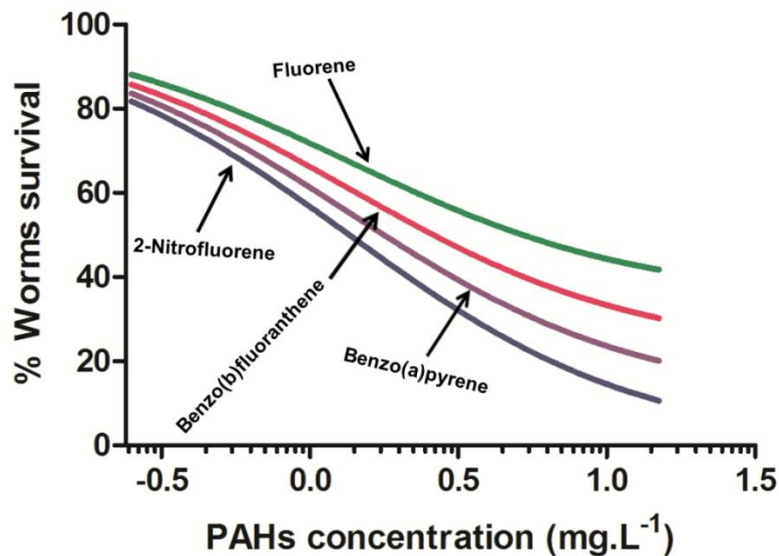


Figure 1. Survival of the PAHs after 12 hours of exposure of *C. elegans*. Data were obtained from at least 3 independent experiments performed in duplicate.

3.2 Body area of *C. elegans*

The normal development of *C. elegans* was affected by PAHs exposure (figure 2). Compared to control, fluorene (figure 2A) presented a significant ($p < 0.01$, Kruskal-Wallis/Dunn) reduction in body area at 0.25, 5, 10 and 15 mgL⁻¹. For benzo(b)fluoranthene (figure 2B), a significant ($p < 0.01$, Kruskal-Wallis/Dunn) reduction of body area was observed at 0.25, 2.5, 5, 10 and 15 mgL⁻¹. The worms treated with 2-nitrofluorene (figure 2C) showed a significant ($p < 0.01$, Kruskal-Wallis/Dunn) reduction in body area at 2.5, 5, 10 and 15 mgL⁻¹. For benzo(a)pyrene (figure 2D), a significant ($p < 0.01$, Kruskal-Wallis/Dunn) reduction of body area was observed at 1.25, 2.5, 5, 10 and 15 mgL⁻¹.

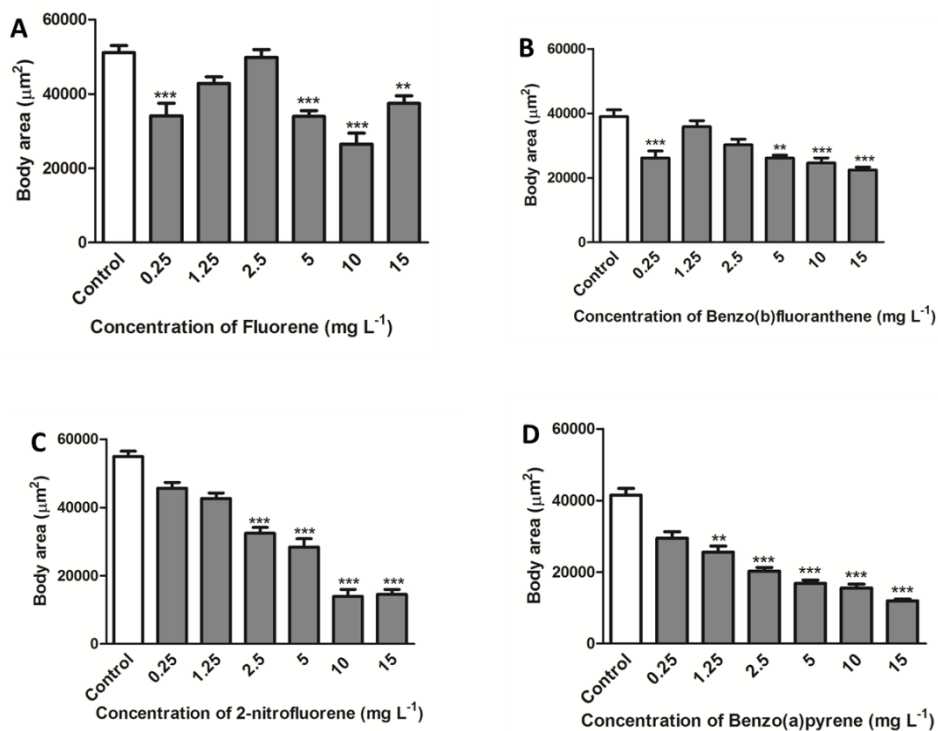


Figure 2. Body areas of *C. elegans* with PAHs in different concentrations. Values are expressed as means \pm SEM from three independent experiments ($n=3$). (A) Fluorene; (B) Benzo(b)fluoranthene; (C) 2-Nitrofluorene; (D) Benzo(a)pyrene. Statistical comparisons were made using Kruskal-Wallis/Dunn. (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs control).

3.3 ROS production

The ROS production is depicted in figure 3. For fluorene (figure 3A), 2-nitrofluorene (figure 3C), and benzo(a)pyrene (figure 3D) there was a significant increase ($p < 0.001$; ANOVA/Bonferroni) in ROS production in all tested concentrations. For benzo(b)fluoranthene, a significant increase in ROS production was noted at 1.25, 2.5, 5, 10, and 15 mg L^{-1} ($p < 0.001$; ANOVA/Bonferroni; figure 3B).

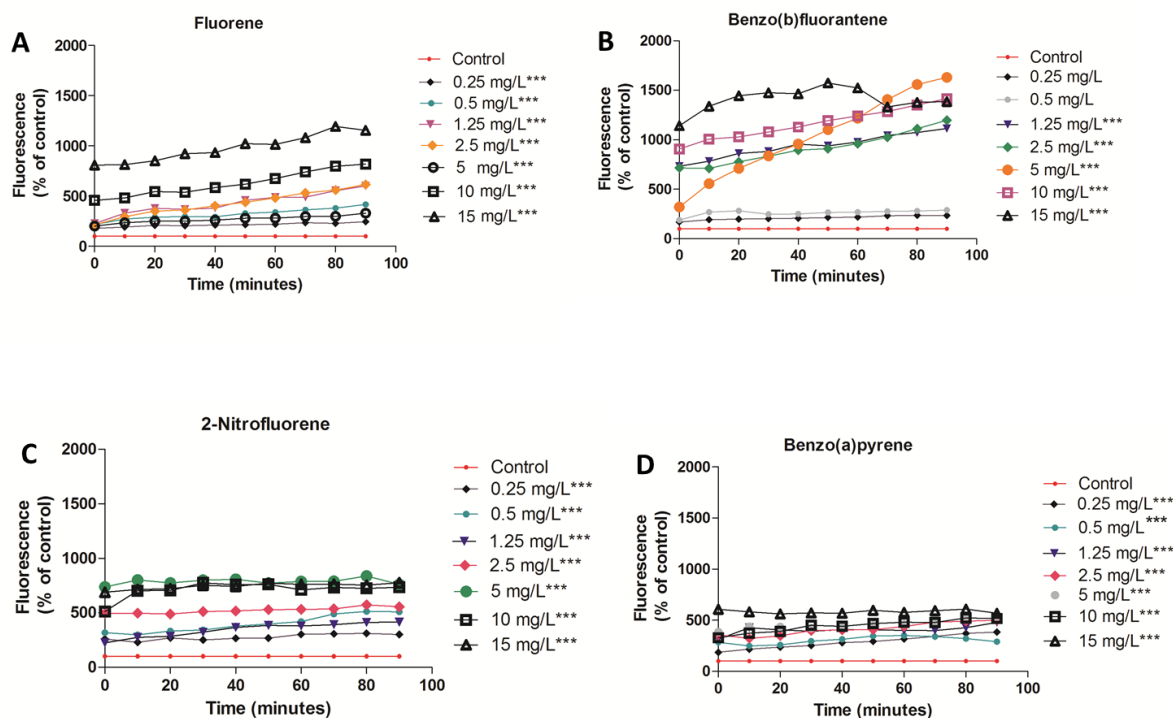


Figure 3. ROS levels measure by DCF-DA: (A) Fluorene; (B) Benzo(b)fluoranthene; (C) 2-Nitrofluorene; (D) Benzo(a)pyrene. Data are expressed as mean \pm SEM (n=3 independent experiments performed in duplicate). Statistical comparisons were made using repeated measures ANOVA/Bonferroni post-hoc test. (***) $p < 0.001$ vs control).

3.4 PAHs showed alterations in reproduction of *C.elegans*

Figure 4 shows number of eggs and larvae of the nematodes after treatment with PAHs. We can observe in Figure 4 how some treatments delay egg laying. In addition, always the highest concentrations have fewer eggs and larvae than the day's control.

For fluorene we can observe how some treatments delay egg laying (Fig.4A). After exposure to benzo(b)fluoranthene (Fig.4B), we found that on the 5th day there were no eggs in the controls because the worms had already placed all the eggs, while the treatments had not yet been placed. This is indicative of playback delay. For 2-nitrofluorene on the 3rd day we can see that it is the day when the worms put more eggs, as if there was a little delay in egg

laying (Fig.4C). With benzo(a)pyrene we can see the same delay in egg laying seen for benzo(b) fluoranthene (Fig.4D).

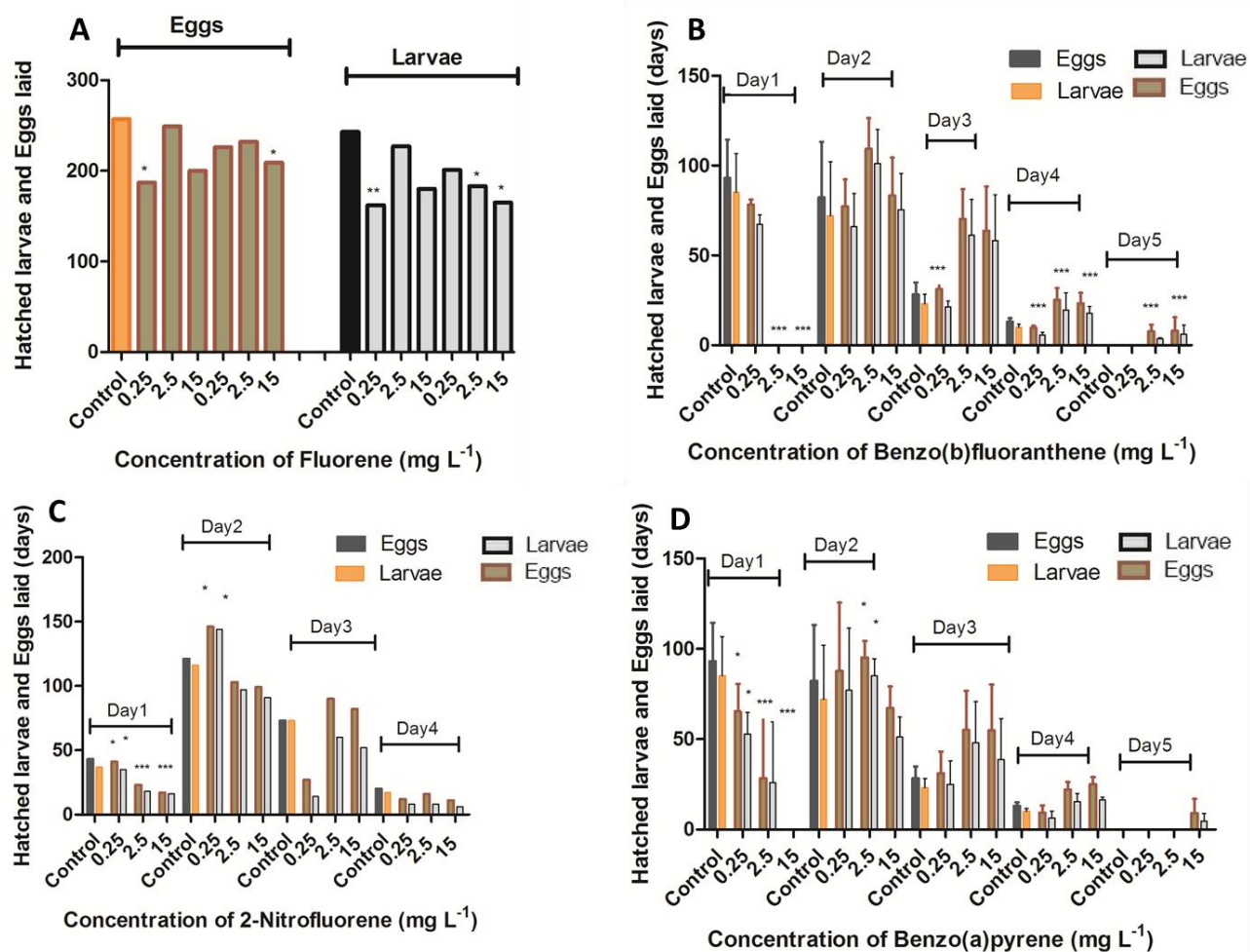


Figure 4. Number of eggs and larvae per day of reproduction. (A) Fluorene; (B) Benzo(b)fluoranthene; (C) 2-nitrofluorene; (D) Benzo(a)pyrene. Values are expressed as means \pm SEM of three independent experiments ($n = 3$), except for fluorene ($n = 1$). Statistical comparisons were made using one-way ANOVA/Bonferroni post-hoc test. (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ vs control).

4. Discussion

The present study focused in evaluating the chronic toxicity of four PAHs. PAHs are ubiquitous pollutants that are introduced into the environment majorly via anthropogenic sources (Alegbeleye et al., 2017).

The nematode *C. elegans* has long been widely used to assess the toxicity of environmental pollutants (Fischer et al., 2016). Toxicological

evaluation is crucial for understanding the effects of chemicals on living organisms in basic and applied biological science fields (Lee S.Y; Kang K., 2017). The rodent model is one of the most popular *in vivo* experimental systems for this toxicology study; alternatively, non-mammalian organisms such as *C. elegans* are also used (Lilienblum et al., 2008). Non-mammalian toxicological evaluation models are beneficial because of not only animal ethical issues but also their convenience and usefulness considering cost-effectiveness, maintainability, speed, and reproducibility (Blomme E.A; Will, Y., 2016). However, the ability of any animal model, from nematodes to mammals, to respond in a manner similar to humans is limited by how well the organism and the toxicological assays replicate human exposure conditions (stage of development, route of exposure, etc.) and cellular, biochemical, and molecular responses (Boyd et al., 2016).

Among the four PAHs studied, fluorene and benzo(b)fluoranthene showed the lowest toxicity (5.47 mgL^{-1} and 2.92 mgL^{-1} , respectively). In contrast, 2-nitrofluorene and benzo(a)pyrene were the PAHs with the highest toxicity (1.33 mgL^{-1} and 1.93 mgL^{-1} respectively). It is generally known that the rate of toxicity of a compound to an organism is related to the exposure route, the biotransformation and detoxification capacities, and the receptor sensitivity (Sese et al., 2009). Some studies suggest that fluorene induces skin and eye irritation and is a potential carcinogen (New Jersey Department of Health and Senior Services 1999). Animal exposure to PAHs such as benzo(a)anthracene, benzo(a)pyrene, benzo(b)fluoranthene have caused tumours, mortality, growth and reproductive impairment, teratogenesis, endocrine disruption, liver and kidney damage, neurobehavioral changes and altered thermoregulatory ability (Kim et al., 2013). According to the IARC classification 2-nitrofluorene belongs to group 2B, possible carcinogenic chemicals to humans.

There was a decrease in the size of worms exposed to PHAs. Development in simple organisms, such as *C. elegans* is an efficient way to identify PHAs with potential long-term effects (Killeen A.; Evsiskova C.M., 2016). Previous studies using *C. elegans* as test organism for other chemical substances also observed changes in development (Traunspurger et al., 1997; Anderson et al., 2001).

Results of the study showed that exposure to fluorene, benzo(b)fluoranthene, 2-nitrofluorene and benzo(a)pyrene resulted in oxidant–antioxidant imbalance in *C. elegans*. Oxidative stress, which occurs when ROS generation leads to an imbalance between ROS and antioxidants, is involved in the mechanism of toxicity of a large number of compounds (Sies, 1997).

Teratogens are agents that negatively impact reproduction and embryonic development and include radiation, maternal infections, pharmaceuticals, and chemicals (Wilson, 1973). Numerous chemicals act as teratogens that adversely affect human health, with the time period of exposure as a critical factor determining teratogen susceptibility. For instance, maternal and prenatal teratogen exposure is associated with birth defects, spontaneous abortion, and stillbirth, and sometimes cancer in the reproductive tract of progeny (Reed et al., 2013). Previous studies demonstrated that acute, high-dose teratogen exposure causes reproductive decline, but the long-term ramifications of low dose teratogen exposure during early development later in life remain unknown (Parodi et al., 2015).

In this study worms treated with PAHs showed significant reduction in the amount of hatched larvae and eggs. The alteration in reproduction in *C. elegans* has been linked to damage to cell division, especially the gametes (Ruan et al., 2012). Some studies have reported, for example, that chemical compounds that reduced the viability of worm eggs also reduced the development of mammals (Harlow et al., 2016). In a study by (Sese et al., 2009), a decrease in the reproduction of worms was also observed after 72 hours of exposure to PAHs.

In combination, our results show that toxicity to PAHs can cause serious damage by altering development, reproduction and oxidative stress in *C. elegans*.

5. Conclusions

Our results indicated that PAHs presented toxicity to *C. elegans*, leading to worms death, developmental disruption and inducing ROS production. The results shows that the use of nematodes in toxicological testing provide accurate and rapid results, contributing to better exploration of chemicals

toxicity. Therefore, additional studies should focus on transgenic knockout strains to evaluate toxicity mechanism of PAHs.

Acknowledgements

G. Göethel is the recipient of a CNPq PhD scholarship (Grant number: 141716/2014-2); and S.C. Garcia is recipient of CNPq Research Fellowship.

Declaration of interest

All authors declare that there are no conflicts of interest.

References

1. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), 1995. Toxic Substances Portal-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) Public Health Statement for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs). www.atsdr.cdc.gov
2. Alegbeleye O.O., et al., 2017. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A critical review of environmental occurrence and bioremediation. *Environ Manage*, v. 60(4), p.758-783.
3. Anderson, G.L., et al., 2001. Assessment of sublethal endpoints for toxicity testing with the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ Toxicol Chem*, v.20, p. 833–838.
4. Blomme, E. A; Will, Y., 2016. Toxicology strategies for drug discovery: present and future. *Chem Res Toxicol*, v.29 (4), p.473-504.
5. Boyd, W.A., et al., 2016. Developmental effects of the ToxCast™ phase I and phase II chemicals in *Caenorhabditis elegans* and corresponding responses in zebrafish, rats, and rabbits. *Environ Health Perspect*, v.124 (5), p. 586-93.
6. Fischer F., et al., 2016. Passive dosing in chronic toxicity tests with the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Environ Sci Technol*, v.50(17), p.9708-16
7. Hajisamoh A., 2013. Pollution levels of 16 priority PAHs in the major rivers of southern Thailand. *J Chem*, v.2 (1), p.7–11.
8. Harlow, P.H., et al., 2016. The nematode *Caenorhabditis elegans* as a tool to predict chemical activity on mammalian development and identify mechanisms influencing toxicological outcome. *Sci Rep*. 6, 22965.
9. IARC. 2013. Monograph 103. Bitumens and Bitumen Emissions, and Some N- and S-Heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France. ISBN 97892 832 1326 0.
10. IARC. 2013. International Agency for Research on Cancer. In: Straif, K., Cohen, A., Samet, J.(Eds.), *Air Pollution and Cancer*. IARC Scientific Publications vol. 161.
11. Killeen A; Evsiskova C.M., 2016. Effects of sub-lethal teratogen exposure during larval development on egg laying and egg quality in adult *Caenorhabditis elegans*. *F1000Res*, v.28, p.5:2925.

12. Kim K.H., 2013. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environ Int*, v.60, p. 71–80.
13. Kweon O., et al., 2011. Polycyclic aromatic hydrocarbon metabolic network in *Mycobacterium vanbaalenii* PYR-1. *J Bacteriol*, v.193, p.4326–4337.
14. Lee S.Y; Kang K., 2017. Measuring the effect of chemicals on the growth and reproduction of *Caenorhabditis elegans*. *J Vis Exp*, v. 128, p.564-573.
15. Lewtas J., et al., 2007. Air pollution combustion emissions: characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. *Mutat Res*, v.636, p.95-133.
16. Lilienblum, W., et al., 2008. Alternative methods to safety studies in experimental animals: role in the risk assessment of chemicals under the new European Chemicals Legislation (REACH). *Arch Toxicol*, v. 82 (4), p. 211-236.
17. Nascimento, P.C., et al., 2015. Determination of oxygen and nitrogen derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons in fractions of asphalt mixtures using liquid chromatography coupled to mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *J Sep Sci*, v.38, p. 4055-4062.
18. Neghab, M., et al., 2015. Respiratory symptoms and lung functional impairments associated with occupational exposure to asphalt fumes. *Int J Occup Environ Med*, v.6 (2), p.113-21.
19. New Jersey Department of Health and Senior Services (1999) Hazardous Substance Fact Sheet. CAS number 86-73-7.
20. Parodi, D.A., et al., 2015. Reproductive toxicity and meiotic dysfunction following exposure to the pesticides Maneb, Diazinon and Fenarimol. *Toxicol Res*, v.4 (3), p. 645–654.
21. Reed, C.E; Fenton, S.E., 2013. Exposure to Diethylstilbestrol during sensitive life stages: a legacy of heritable health effects. *Birth Defects Res C Embryo Today*, v. 99 (2), p. 134-146.
22. Rengarajana T., et al., 2015. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. *Asian Pac J Trop Biomed*, v.5 (3), p.182–189.
23. Ruan, Q.L., et al., 2012. Chlorpyrifos exposure reduces reproductive capacity owing to a damaging effect on gametogenesis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Appl Toxicol*. 32, 527–535.

24. Sese B.T., et al., 2009. Toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Toxicol Environ Health*, v. 72(19), p.1168-80.
25. Sies, H., 1997. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol*, v. 82, n. 2, p. 291-295.
26. Sutter, B., et al., 2016. Alternatives for benzene in the extraction of bitumen fume from exposure sample media. *Ann Occup Hyg.*, v.60, p.101–112.
27. Traunspurger, W., et al., 1997. Ecotoxicological assessment of aquatic sediments with *Caenorhabditis elegans* (nematoda)—A method for testing in liquid medium and whole sediment samples. *Environ Toxicol Chem*, v.16, p. 245–250.
28. Vignet, C., et al., 2016. Fish reproduction is disrupted upon lifelong exposure to environmental PAHs fractions revealing different modes of action. *Toxics*, v.4, p. 200-230.
29. Wilson, J.G, 1973. *Environment and Birth Defects*. Environ Sci Se. London: Academic Press.

PARTE III

Neste estudo, foi avaliada a toxicidade aguda e crônica de quatro HPAs, presentes em amostras de fumos de asfalto. Foram escolhidos os compostos com as concentrações mais elevadas para a realização dos ensaios de toxicidade. Os HPAs selecionados para o estudo foram: 2-nitrofluoreno (2146,8 mg/kg de HPAs e derivados), benzo(b)fluoranteno (647,2 mg/kg de HPAs e derivados), fluoreno (98,32 mg/kg de HPAs e derivados), e o benzo(a)pireno (13,21 mg/kg de HPAs e derivados) (NASCIMENTO *et al.*, 2015).

A porcentagem de sobrevivência, após o tratamento agudo e crônico com os HPAs, foi avaliada em nematoides de acordo com metodologia previamente utilizada por Charão *et al.* (2015), utilizando concentrações cinco vezes superiores às empregadas em estudos *in vitro* (TOPINKA *et al.*, 2008; TOPINKA *et al.*, 2011), mostrando uma mortalidade significativa sob as nossas condições experimentais. Estas concentrações elevadas são necessárias porque em organismos como *C. elegans*, a absorção se dá por via oral, e esta é a principal via de absorção de contaminantes associada a partículas como os HPAs (FORBES *et al.*, 1998). Além disso, a cutícula do nematoide foi relatada como impermeável para a maioria dos produtos químicos (PETERS *et al.*, 1952).

. Com base nos valores da DL₅₀ após exposições aguda e crônica, o benzo(b)fluoranteno foi o HPA que apresentou maior toxicidade na exposição aguda e o 2-nitrofluoreno foi o HPA que apresentou maior toxicidade na exposição crônica. A toxicidade encontrada para o fluoreno foi similar ao relatado por TAE-HOON NAM *et al.* (2015) em *Eisenia fetida* após 24 horas de exposição. Adicionalmente, estudos anteriores utilizando *Daphnia magna*, *Artemia salina*, *Chironomus tentans* indicaram que altas concentrações de HPAs (por vezes além dos respectivos limites de solubilidade) mostraram uma taxa de mortalidade nestas espécies em 24 e 48h (SUEDEL, B.C.; RODGERS, J.H, 1996).

A toxicidade de um determinado composto a um organismo é relacionada com a via de exposição, as capacidades de biotransformação e detoxificação do organismo em questão, e a sensibilidade dos receptores (RONDAY *et al.*, 1997). Uma possibilidade pela qual os HPAs testados não exerceram elevada toxicidade aguda para os *C. elegans* relaciona-se com a sua volatilidade relativamente elevada e baixa solubilidade em água impedindo

a sua interação com o organismo (REN *et al.*, 1994), outra suposição seria a de que a melhor via de absorção destes compostos seria a via inalatória.

Alterações de desenvolvimento podem ser um primeiro sinal de toxicidade, anterior à mortalidade. Uma via de regulação gênica determina o crescimento dos *C. elegans*, tornando este teste um bom parâmetro para avaliação de toxicidade (WU *et al.*, 2013). Os resultados indicam que o desenvolvimento é particularmente afetado pelos HPAs. Este efeito também foi relatado em outras substâncias químicas, tais como metais, em que foi utilizado *C. elegans* como organismo teste (ANDERSON *et al.*, 2001; SOCHOVÀ *et al.*, 2007).

Adicionalmente, observamos alterações na reprodução dos *C. elegans* tratados com HPAs. Essa alteração tem sido associada à divisão celular, especialmente aos gametas (Ruan *et al.*, 2012). Alguns estudos relataram, por exemplo, que compostos químicos que reduziram a viabilidade dos ovos de vermes também reduziram o desenvolvimento de mamíferos (Harlow *et al.*, 2016). Em um estudo de Sese *et al.*, (2009), observou-se uma diminuição na reprodução dos vermes também após 72 horas de exposição aos HPAs.

O estresse oxidativo, ocorre quando existe a geração de EROs e leva a um desequilíbrio entre as EROs e os antioxidantes, e está envolvido no mecanismo de toxicidade de um grande número de compostos (SIES, 1997). Foi possível observar um aumento da produção de EROs, indicando que os HPAs induziram um aumento do estresse oxidativo nos vermes. Este aumento, provavelmente contribuiu para a taxa de mortalidade e desregulação do desenvolvimento observados. A capacidade dos HPAs em causar estresse oxidativo tem sido bem documentada em cultura de células e em experimentos *in vivo*, utilizando ratos. No entanto, se as EROS por si só são a causa direta da mortalidade dos vermes, ou se esta é secundária a alterações no metabolismo dos *C. elegans*, isto ainda permanece incerto (YASUDA *et al.*, 2011). A biotransformação dos HPAs, catalisada por reações sequenciais de CYP1A1, epóxido-hidrolases, diidrodiol desidrogenases e tautomerização entre o cetol e o catecol leva a redução deste último, produzindo um radical aniôn o-semiquinona que sofre redução adicional para o-quinona (Xue & Warshawsky, 2005). A via de HPA-o-quinona, além de formar adutos de DNA, libera EROs

que podem estar relacionadas com o aumento de estresse oxidativo observado.

De acordo com o aumento do estresse oxidativo, foi observado um aumento dependente da concentração na atividade das enzimas CAT e SOD. Pela primeira vez, foi demonstrado um aumento nas defesas antioxidantes enzimáticas através da presença de fluorescência em nematódeos marcados com cepas GFP, expostos a HPAs. Portanto, concluiu-se que estas enzimas desempenham um papel essencial na resposta ao estresse oxidativo induzido pelos HPAs, provavelmente por detoxificar as ERs geradas, protegendo contra a toxicidade dos HPAs nos vermes.

A presença de HPAs no ambiente tem chamado a atenção devido as suas propriedades carcinogênicas (SESE *et al.*, 2009). A grande maioria dos estudos genotóxicos *in vitro* têm observado o efeito de um único HPA isolado (KIM e CHOUNG, 2009; JONES *et al.*, 1996; ROH *et al.*, 2007). No ambiente, os organismos não encontram um único produto químico isolado, normalmente ocorre uma exposição simultânea a múltiplos estressores. A avaliação da toxicidade de misturas tornou-se um modelo bem estabelecido e aceito ao longo das últimas décadas (ALTENBURGER *et al.*, 2013). A fim de avaliar o risco para a saúde humana, misturas de HPAs têm sido estudadas em linhagens celulares (JONES *et al.*, 1996; KIM and CHOUNG, 2009; ROH *et al.*, 2007). Neste intuito, a fim de aprofundar os estudos *in vitro*, este trabalho se propôs também a estudar os efeitos de misturas no nematoide *C. elegans*.

Os modelos AD e AI são dois conceitos tradicionais que têm sido amplamente utilizados na previsão de toxicidade de misturas (ALTENBURGER *et al.*, 2003; BACKHAUS *et al.*, 2003; JONKER *et al.*, 2004, 2005; LOUREIRO *et al.*, 2009). Estes dois conceitos proporcionam uma estrutura de referência para a qual a toxicidade da mistura experimental pode ser comparada (BACKHAUS *et al.*, 2004). No entanto, os modelos clássicos para a previsão da toxicidade de mistura baseiam-se em simples suposições sobre o mecanismo da ação tóxica (RODEA-PALOMARES *et al.*, 2012). Produtos químicos com conhecidos mecanismos de ação, uma vez liberados no ambiente, podem ter diversas relações dose-resposta. No presente estudo, foram determinados os tipos de interação para quatro HPAs componentes da mistura avaliada.

Considerando os dois conceitos básicos, AD geralmente produz efeitos maiores do que AI), (Dias Da Silva, et al., 2017) e é o modelo mais recomendado para fins de avaliação de risco, pois garante um nível mais alto de proteção. No entanto, neste estudo, ambos os modelos apresentaram previsões muito semelhantes, com poucas variações na DL_{50} . Isto ocorre porque a discriminação entre as previsões derivadas de AD e AI depende do número de componentes da mistura (quatro neste caso), da relação de concentração na mistura, das inclinações de suas funções dose-resposta e do modelo de regressão usado para descrever as relações entre doses e efeitos de agentes individuais. As abordagens para aumentar a separação entre as duas previsões dependeriam da mudança de uma das condições anteriores, como o aumento do número de componentes da mistura. Comparando os efeitos previstos matematicamente e observados experimentalmente, os dados mostraram alguns desvios em relação aos modelos AD e AI. Os HPAs têm uma relação estrutural e funcional estreita e usam os mesmos caminhos farmacológicos (Xue e Warshawsky, 2005). Por conseguinte, é plausível que todos os quatro produtos químicos venham a competir e, conseqüentemente, interagir com o metabolismo uns dos outros.

Por outro lado, quando cada componente da mistura foi testado individualmente na sua LD_{01} , foram observados efeitos muito baixos, que não puderam ser diferenciados estatisticamente dos controles não tratados. No entanto, quando misturados nessas mesmas doses, as quatro substâncias foram capazes de agir em conjunto para produzir efeitos significativos. Esses efeitos foram maiores do que o previsto por modelos AD ou AI, caracterizando um sinergismo. Para avaliar se o valor prognóstico das expectativas de AD e AI se ajustariam a cenários mais realistas, estudamos a Mix C, onde os HPAs estavam presentes em concentrações encontradas nos fumos de asfalto. Notavelmente, observamos um duplo efeito; em doses mais elevadas, os efeitos experimentais confirmaram as previsões (aditividade). No entanto, em doses que causaram até 50% de letalidade, que são mais relevantes em cenários ambientais, observaram-se os mesmos resultados sinérgicos, demonstrando grandes preocupações quanto ao risco de danos ambientais. Para explorar o potencial de efeitos sinérgicos entre produtos químicos, é necessário compreender sítios e mecanismos de ação, enzimas e taxas de

detoxificação e ativação, taxas de absorção e sensibilidade das enzimas ao (s) produto (s) químico (s) (Denton et al., 2003). A caracterização do perfil metabólico dos constituintes da mistura quando testados individualmente e em combinação também pode fornecer informações valiosas que contribuam para a compreensão dos mecanismos subjacentes aos efeitos da mistura relatada (Dias Da Silva et al., 2013). Muitas misturas apresentaram efeitos maiores do que os aditivos porque um dos produtos químicos induziu uma mudança na toxicocinética (como mecanismo alternativo de ação, absorção e taxas de metabolismo) no organismo (Lydy et al., 2004).

CONCLUSÕES

- ❖ Os HPAs (fluoreno, benzo(a)pireno, 2-nitrofluoreno e benzo(b)fluoranteno) avaliados neste trabalho demonstraram toxicidade aguda e crônica em *C. elegans*.
- ❖ Os HPAs alteraram o desenvolvimento dos nematoides, o que pode ser um sinal precoce de toxicidade, ocorrendo antes da mortalidade.
- ❖ O estresse oxidativo está envolvido no mecanismo de toxicidade dos HPAs estudados, através do aumento da produção de radicais livres e modulação das enzimas antioxidantes CAT e SOD em *C. elegans*.
- ❖ A avaliação de misturas de HPAs evidenciou a presença de sinergismo em *C. elegans*, demonstrando preocupações quanto aos limiares regulatórios para esses contaminantes, pois estes foram estabelecidos com base em exposições únicas.

- ❖ Avaliar a neurotoxicidade dos quatro HPAs (fluoreno, 2-nitrofluoreno, benzo(a)pireno e benzo(b)fluoranteno), utilizando cepas com genes repórteres como a BZ55 e BY200.
- ❖ Avaliar o comportamento dos vermes expostos aos HPAs através de ensaios que avaliam movimentos do verme: para trás, para frente e em forma da letra grega ômega.
- ❖ Avaliar o efeito dos HPAs sobre a atividade da acetilcolinesterase como um indicador de neurotoxicidade.
- ❖ Avaliar a neurotoxicidade de misturas de HPAs no modelo *C. elegans*.
- ❖ Investigar o envolvimento do estresse oxidativo através de outros biomarcadores como malonildialdeído (MDA) e tióis totais não proteicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALTENBURGER, R. et al. Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: mixtures composed of similarly acting chemicals. **Environ Toxicol Chem**, v.19 (9), p. 2341–2347, 2000.

ALTENBURGER, R. et al. Simplifying complexity: mixture toxicity assessment in the last 20 years. **Environ Toxicol Chem**, v.32, p.1685–1687, 2013.

ALTENBURGER, R. et al. Mixture toxicity and its modeling by quantitative structure-activity relationships. **Environ Toxicol Chem**, v. 22(8), p. 1900-15, 2003.

ANDERSON, G.L. et al. Assessment of sublethal endpoints for toxicity testing with the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environ Toxicol Chem**, v.20, p.833–838, 2001.

ARMSTRONG, D.G. et al. Interactions between nutrition and ovarian activity in cattle: Physiological, cellular and molecular mechanisms. **Rep Supp**, v. 61, p. 403–414, 2003.

ASHAUER, R. et al. Toxicokinetic and toxicodynamic modeling explains carry-over toxicity from exposure to diazinon by slow organism recovery. **Environ Sci Technol**, v. 44, p. 3963–3971, 2010.

BACKHAUS, T. et al. Predictability of the toxicity of a multiple mixture of dissimilarly acting chemicals to *Vibrio fischeri*. **Environ Toxicol Chem**, v. 19(9), p. 2348-2356, 2000a.

BACKHAUS, T. et al. Toxicity of a mixture of dissimilarly acting substances to natural algal communities: predictive power and limitations of independent action and concentration addition. **Environ Sci Technol**, v.38 (23), p.63-70, 2004b.

BACKHAUS, T. et al. Water quality objectives for mixtures of toxic chemicals: problems and perspectives. **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 54(2), p. 139-50, 2003;

BARREIROS A.L.B.S; DAVID, J.M. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quim Nova*, v.29(1), p.113-123, 2006.

BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Rev Nutr*, Campinas, v. 23(4), p.629-643, 2010.

BERENBAUM, M.C. Criteria for analyzing interactions between biologically active agents. *Adv Cancer Res*, v.35, p.269-335, 1981.

BERENBAUM, M.C. The expected effect of a combination of agents - the general solution. *J Theor Biol*, v.114 (3), p.413-431, 1985.

BERENBAUM, M.C. What is synergy? *Pharmacol Rev*, v.41 (2), p.93-141, 1989.

BERNARDO, D.L. Carcinogenicidade de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. *Quim Nova*, v. 39, p. 789-794, 2016.

BERNUCCI, L. B. Pavimentação Asfáltica: formação básica para engenheiros. **Petrobras: ABEDA**, 2008.

BLISS, C.I. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann Appl Biol*, v.26, p. 585-615, 1939.

BLOMME, E. A; WILL, Y. Toxicology strategies for drug discovery: present and future. *Chem Res Toxicol*, v.29 (4), p.473-504, 2016.

CAMPO, L. et al. Biological monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons by determination of unmetabolized compounds in urine. *Toxicol Lett*, v.162, p.132–138, 2006.

CAVALIERI, E. L.; ROGAN, E. G. Drug Discovery Today. *Dis Mech*, V.9, p.55, 2012.

CEDERGREEN, N. Is mixture toxicity measured on a biomarker indicative of what happens on a population level? A study with *Lemna minor*. **Ecotoxicol Environ**, v.67 (3), p.323-32, 2007a.

CHARÃO, M.F. et al. Simultaneous quantification of Lycopene, β -Carotene, Retinol and α -Tocopherol in plasma after a simple extraction procedure: stability study and application to human volunteers. **J Braz Chem Soc.**, v. 23, n. 8, p. 1441-1449, 2012.

CHARÃO, M.F. et al. *Caenorhabditis elegans* as an alternative in vivo model to determine oral uptake, nanotoxicity, and efficacy of melatonin-loaded lipid-core nanocapsules on paraquat damage. **Int J Nanomedicine**, v. 10, p. 5093-106, 2015.

COLBY, S.R. Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations. **Weeds**, v.15 (1), p.20, 1967.

DENTON, D. et al. Joint acute toxicity of esfenvalerate and diazinon to fathead minnow (*Pimephales promelas*) larvae. **Environ Toxicol Chem**, v.22, p. 336–41, 2003.

DIAS DA SILVA, D. et al. Cytotoxic effects of amphetamine mixtures in primary hepatocytes are severely aggravated under hyperthermic conditions. **Toxicol In Vitro**, v.27 (6), p.1670-8, 2013.

DIAS DA SILVA, D. et al. In vitro hepatotoxicity of 'Legal X': the combination of 1-benzylpiperazine (BZP) and 1-(m-trifluoromethylphenyl)piperazine (TFMPP) triggers oxidative stress, mitochondrial impairment and apoptosis. **Arch Toxicol**, v.91(3), p.1413-1430, 2017.

DRESCHER K, BOEDEKER W. Assessment of the combined effects of substances - the relationship between concentration addition and independent action. **Biometrics**, v.51 (2), p.716-730, 1995.

DUTRA, I. **Investigação de lesões em DNA induzidas pelo Hidrocarboneto policíclico aromático antraceno**. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo. Departamento de análises clínicas e toxicológicas. Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises toxicológicas, 2007.

FAUST, M. et al. Predicting the joint algal toxicity of multi-component striazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. **Aquat Toxicol**, v. 56(1), p.13-32, 2001.

FAUST, M, et al. Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. **Aquat Toxicol**, v. 63(1), p.43-63, 2003.

FERREIRA, F. Inhibition of the passive diffusion of cholic acid by *Ilex paraguariensis* St. Hil. saponins. **Phytol Res**, v. 11, p. 79-81, 1997.

FERREIRA, M. R. P. et al. Misturas com emulsão asfáltica e agregado alternativo. **XVII Reunião de Pavimentação Urbana, Porto Alegre – RS**, 2011.

FERNADES, P.R.N. et al. Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons in asphalt binder using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography. **J Chromatogr Sci**, v. 47, p. 600-793, 2009.

FORBES, K.C. et al. Suppressors of cdc25p overexpression identify two pathways that influence the G2/M checkpoint in fission yeast. **Genetics**, v. 150(40), p.1361-75, 1998.

FRASER, T.R. Lecture on the Antagonism between the Actions of Active Substances. **Brit Med J**, vol. 2, p. 7, 1872.

GALEY, H.F. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. **Br J Anaesth**, v. 107(1), p. 57-64, 2011.

GRECO, W.R. et al. The search for Synergy - a critical-review from a response-surface perspective. **Pharmacol Rev**, v. 47(2), p. 331-385, 1995.

GODSCHALK, R.W. et al. A critical evaluation of DNA adducts as biological markers for human exposure to polycyclic aromatic compounds. **J Biochem Mol Biol**, v. 36, p. 1- 11, 2003.

GUIMARÃES, F.J.R.P. **Apostila de Riscos Químicos**. Santos, SP, Senac, 2003.

HALLIWELL, B. Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols and other phenols. Direct or indirect effects? Antioxidant or not? **Am J Clin Nutr**, 2004.

HALLIWELL, B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? **J Neurochem**, v. 97, p. 16621- 26, 2006.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. **New York, (Capítulos 3, 4, 5)**, 2007.

HARLOW, P.H. et al. The nematode *Caenorhabditis elegans* as a tool to predict chemical activity on mammalian development and identify mechanisms influencing toxicological outcome. **Sci Rep**, v.6, p. 22965, 2016.

HUANG, W.Y. et al. Predicting mixture toxicity of seven phenolic compounds with similar and dissimilar action mechanisms to *Vibrio qinghaiensis* sp. **Ecotoxicol Environ**, v. 74(6), p.1600-6, 2011.

IARC. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum**, v.92 p.1–853, 2010.

JACOB, J.; SEIDEL, A. Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine. **J Chromatogr**, v. 778, p. 31-47, 2002.

JONES D. et al. Transgenic strains of the nematode *C. elegans* in biomonitoring and toxicology: effects of captan and related compounds on the stress response. **Toxicology**, v.109, p.119–127, 1996.

JONKER, D.M. et al. Towards a mechanism-based analysis of pharmacodynamic drug-drug interactions in vivo. **Pharmacol Ther**, v. 106(1), p.1-18, 2004.

KALETTA, T.; HENGARTNER, M.O. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. **Nat Rev Drug Discov**, v. 5, n. 5, p. 387-98, 2006.

KIM S.J.; CHOUNG S.Y. Whole genomic expression analysis of octachlorostyrene-induced chronic toxicity in *Caenorhabditis elegans*. **Arch Pharm Res**, v.32, p.1585–1592, 2009.

KORTENKAMP, A. Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine disrupting chemicals. **Environ Health Perspect**, v. 115, p. 98-105, 2007.

KORTENKAMP, A.; ALTENBURGER, R. Synergisms with mixtures of xenoestrogens: a reevaluation using the method of isoboles. **Sci Total Environ**, v. 221(1), p. 59-73, 2000.

LILIENBLUM, W. et al. Alternative methods to safety studies in experimental animals: role in the risk assessment of chemicals under the new European Chemicals Legislation (REACH). **Arch Toxicol**, v. 82 (4), p. 211-236, 2008.

LIMA, D.M. et al. Extraction techniques and clean-up procedure to PAHs determination in sediment from Ceará coast. **Quim Nova**, v. 31, p.1371–1377, 2008.

LINTELMANN, J. A liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometric method for the determination of azaarenes in atmospheric particulate matter. **J Chromatograph**, v. 1217 p.1636–1646, 2010.

LOEWE, S.; MUCHNIK, H. Effect of combinations: mathematical basis of the problem. **Arch Exp Pathol Pharmacol**, v. 114, p. 313-326, 1926.

LOPES, J.L. Riscos para a saúde de trabalhadores de pavimentação com asfalto. **Revista de Gestão Integrada em Saúde do Trabalho e Meio Ambiente**, v.3, n.3, 2008.

LOUREIRO, C.F.B. Educação ambiental transformadora. In: LAYRARGUES, P. P. **Identities da educação ambiental brasileira**. Brasília: MMA, p. 65-84, 2009.

LYDY, M. et al. Challenges in regulating pesticide mixtures. **Ecol Soc**, v.9, p.1, 2004.

MARQUES, C.R. et al. Ecotoxicological effects of Mikado(R) and Viper(R) on algae and daphnids. **Environ Toxicol**, v. 27(12), p. 685-99, 2012.

MOTA, M.M.; DIOGO, A. *Caenorhabditis elegans*: modelo biológico para o século XXI. **Laboratório de Nematologia/ICAM**. Departamento de Biologia- Universidade de Évora, 2001.

MOTTA, R.S. Estudo de misturas asfálticas mornas em revestimentos de pavimentos para redução de emissão de poluentes de consumo energético. **Tese de Doutorado**, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MUSCHIOL, D. et al. Life cycle and population growth rate of *Caenorhabditis elegans* studied by a new method. **BMC Ecology**, v. 9, p.14, 2009.

MUTTI, A.; BERGAMASCHI, E. In Idrocarburi policiclici aromatici negli ambienti de vita e di lavoro: esposizione ed effetti. **ATTI, Gargnano**, p.213, 1996.

NASCIMENTO, P.C. et al. Determination of oxygen and nitrogen derivatives of polycyclic aromatic hydrocarbons in fractions of asphalt mixtures using liquid chromatography coupled to mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. **J Sep Sci**, v.38, p. 4055-4062, 2015.

NAYAK, S et al. "Fog-2 and the Evolution of Self-Fertile Hermaphroditism in *Caenorhabditis*". **PLoS Biol**, v. 3 (1), p. 6, 2004.

NETTO, A.D.P. et al. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Quim. Nova**, v. 23(6), p. 765-773, 2000.

NIOSH, 2000. NIOSH manual of analytical methods (NMAM). Disponível em <<http://www.cdc.gov/NIOSH/NMAM/>>. Acesso em: janeiro de 2018.

OHLSSON, A. Mixture effects of dietary flavonoids on steroid hormone synthesis in the human adrenocortical H295R cell line. **Food Chem Toxicol: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 48(11), p. 3194-200, 2010.

PATRI, M. Polycyclic aromatic hydrocarbons in air and their neurotoxic potency in association with oxidative stress: A brief perspective. **Annals of Neurosciences**, v.16 (1), 2009.

PAYNE, J. et al. Prediction and assessment of the effects of mixtures of four xenoestrogens. **Environ Health Perspect**, v.108(10), p. 983-7, 2000.

PETERS H. et al. Pax1 and Pax9 synergistically regulate vertebral column development. **Development**, v. 126, p. 5399–5408, 1998.

PETERSEN, K.; TOLLEFSEN, K.E. Combined effects of oestrogen receptor antagonists on in vitro vitellogenesis. **Aquat Toxicol**, v. 112, p. 46-53, 2012.

PLACKETT, R.L.; HEWLETT, P.S. Statistical aspects of the independent joint action of poisons, particularly insecticides; the toxicity of a mixture of poisons. **Ann App Biol**, v. 35(3), p. 347-58, 1948.

PLACKETT, R.L.; HEWLETT, P.S. Quantal response to mixtures of poisons. **JR Stat Soc B**, v. 14, p. 141–163, 1952.

RAMESH, A. et al. Bioavailability and risk assessment of orally ingested polycyclic aromatic hydrocarbons. **Int J Toxicol**, v. 23, p. 301-333, 2004.

RODEA-PALOMARES, I. et al. An insight into the mechanisms of nanoceria toxicity in aquatic photosynthetic organisms. **Aquat Toxicol**, v. 122, p. 133-143, 2012.

ROH, J.Y. et al. Toxic effects of di(2-ethylhexyl) phthalate on mortality, growth, reproduction and stress-related gene expression in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. **Toxicology**, v.237, p.126–133, 2007.

ROVER, J.R. et al. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutationa associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim Nova**, v. 24, p. 112-119, 2001.

RUAN, Q.L. et al. Chlorpyrifos exposure reduces reproductive capacity owing to a damaging effect on gametogenesis in the nematode *Caenorhabditis elegans*. **J Appl Toxicol**, v.32, p. 527–535, 2012.

RUSSEL, W.; BURCH, R. The principles of humane experimental technique. **Methuen & Co. Ltd. London**, 1959.

SESE, B.T. et al. Toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to the nematode *Caenorhabditis elegans*. **J Toxicol Environ Health**, v.72, p.1168–1180, 2009.

SHAMI, N.; MOREIRA, E. Licopeno como agente antioxidante. **Rev Nutr.**, v. 17, n. 2, p. 227-236, 2004.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp Physiol**, v.82, p. 291–295, 1997.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **Am J Clin Nutr**, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.

SISINNO, C.L.S. et al. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em resíduos sólidos industriais: uma avaliação preliminar do risco potencial de contaminação ambiental e humana em áreas de disposição de resíduos sólidos. **Cad Saúde Pública**, v. 19 (2), p. 671-676, 2003.

SOCHOVÁ, I. et al., 2007. Effects of seven organic pollutants on soil nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environ Int**, v.33, p.798–804, 2007.

SUEDEL, J.; RODGERS, J.H. Toxicity of Fluoranthene to *Daphnia magna*, *Hyalella azteca*, *Chironomus tentans*, and *Stylaria lacustris* in Water-only and Whole Sediment Exposures. **Environ Contam Toxicol**, v.57, p.132-138, 1996.

TAE-HOON NAM. et al. Determination of biomarkers for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) toxicity to earthworm (*Eisenia fetida*). **Environ Geochem Health**, v.37, p.943–951, 2015.

TAKAKURA, N. et al. In vitro combined cytotoxic effects of pesticide cocktails simultaneously found in the French diet. **Food Chem Toxicol: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v.52C, p. 153-162, 2012.

TOPINKA, J. et al. DNA adducts formation and induction of apoptosis in rat liver epithelial 'stem-like' cells exposed to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons. **Mutat Res**, v.638, p.122-132, 2008.

TOPINKA, J. et al. DNA adducts and oxidative DNA damage induced by organic extracts from PM 2.5 in an acellular assay. **Toxicol Lett**, v. 202, p.186–192, 2011.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)**. Washington, DC: Office of Solid Waste, 2008.

VAN GESTEL C.A.M, HENSBERGEN P.J. Interaction of Cd and Zn toxicity for *Folsomia candida* Willem (Collembola: Isotomidae) in relation to bioavailability in soil. **Environ Toxicol Chem**, v. 16, p. 1177–1186, 1997.

WEN, H. et al. The ameliorative and toxic effects of selenite on *Caenorhabditis elegans*. **Food Chem Toxicol**, v. 49, p. 812–819, 2011.

WU, Q. et al. Comparison of toxicities from three metal oxide nanoparticles at environmental relevant concentrations in nematode *Caenorhabditis elegans*. **Chemosphere**, v.90, p.1123–1131, 2013.

XUE, W. & WARSHAWSKY, D. Metabolic activation of polycyclic and heterocyclic aromatic hydrocarbons and DNA damage: A review. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 206, p. 73–93, 2005.

YASUDA et al. Tunneling nanotubes mediate rescue of prematurely senescent endothelial cells by endothelial progenitors: exchange of lysosomal pool. **Aging**, v.3, p. 597–60, 2011.