JÔSE MÁRA DE BRITO

**Avaliação da exposição aguda às partículas urbanas
concentradas e da exaustão de motores diesel e
biodiesel sobre o perfil inflamatório pulmonar e
sistêmico de camundongos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Brito, Jôse Mára de

Avaliação da exposição aguda às partículas urbanas concentradas e da exaustão de motores diesel e biodiesel sobre o perfil inflamatório pulmonar e sistêmico de camundongos / Jôse Mára de Brito. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Patologia.

Orientador: Paulo Hilário Nascimento Saldiva.

Descritores: 1.Poluentes do ar 2.Emissões de veículos 3.Material particulado
4.Exposição por inalação 5.Camundongos 6.Sistema cardiovascular 7.Inflamação

USP/FM/DBD-236/14

*Lá na cidade a cor da moda agora é cinza,
coração cinza, terno cinza, amor cinza..
Até a fumaça consumir sua cabeça,
tem uma ideia sugerindo um novo visual.*

*Falta de verde vai fazer chover pra cima,
nuvens de aço soltam pingos de metal,
no amor de um operário esquecido,
sob as bases de um parque industrial.*

*Lá na cidade já tem rio pedindo água,
pulando cedo do seu leito pra fugir,
na esperança de não entrar pelo cano,
chegar no mar antes de se poluir.*

*Em edifícios que correm batendo palmas,
ofuscados pelas luzes de neon,
mas avenidas que se vão em paralelas,
nunca se encontram pra poderem conversar.*

*São só palavras de um ser dito normal,
que passa o tempo passando o tempo com a vida*

*(SOL DE SONRISAL, de Daniel Lucena/Paulo C. V. Velho, do álbum
Expresso Rural, gravado em outubro de 1983)*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, pela orientação e por tornar simples coisas que outrora pareciam difíceis.

Ao Dr. Paulo Afonso de André, por seu empenho no planejamento e desenvolvimento dos sistemas de exposição toxicológica para roedores.

A Prof^a. Dr^a. Thaís Mauad, pela colaboração dedicada durante o desenvolvimento do trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Dolores Helena Rodriguez Ferreira Rivero, minha gratidão pela ajuda no desenvolvimento, planejamento e concretização deste estudo.

A Prof^a. Dr^a. Mariângela Macchione, minha imensa gratidão por sua infinita paciência, amizade e por ter me auxiliado na concretização desta tese.

A Bióloga Dr^a. Ana Júlia de Faria Coimbra Lichtenselfs, minha gratidão pela ajuda na realização da parte experimental desse estudo.

A Bióloga Dr^a. Eliane Tigre, minha gratidão pela ajuda na realização da parte experimental desse estudo.

A Prof^a. Dr^a. Leila Antonangelo, pelo auxílio na análise da medula óssea.

A Prof^a. Dr^a. Pérola Vasconcelos, pela colaboração dedicada a amostragem e análise dos HPA.

A Prof^a. Dr^a. Maria de Fátima Andrade, pelo auxílio na análise estatística dos componentes principais históricos.

A Dra. Alessandra Choqueta, Dra. Kelly Yoshizaki e a Dra. Beatriz Manguiera Saraiva pela amizade incondicional em todos esses anos.

Ao Guilherme Cavalheiro pela presença efetiva no desenvolvimento e execução de toda a parte experimental desse estudo.

Ao Ivandir e ao Afonso pelo auxílio nos cuidados dos animais no biotério.

A Rosana, pela colaboração na pesagem e análise da composição elementar.

Ao grupo de colaboradores da técnica do Laboratório de Anatomia Patológica, pela confecção dos cortes e lâminas histológicas.

Ao Thiago, Fátima, Rosana e Dalva pela amizade e ajuda com os processos burocráticos.

Ao Diógenes e a Raquel, pelo auxílio na análise das lâminas imunomarcadas.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta obra se concretizasse.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de símbolos

Lista de quadros

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Poluição do ar.....	5
1.1.1	Material Particulado (MP).....	9
1.1.2	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA)	12
1.1.3	Monóxido de carbono (CO).....	14
1.1.4	Óxidos de enxofre (SOx).....	14
1.1.5	Óxidos de Nitrogênio (NOx)	15
1.1.6	Ozônio.....	16
1.2	Diesel versus Biodiesel.....	17
1.3	Partículas versus condições atmosféricas.....	25
1.4	Efeitos da poluição do ar sobre a toxicidade cardiopulmonar.....	28
2	OBJETIVOS.....	34
3	ESTUDO I	35
	Efeito cardiopulmonar agudo induzido pela inalação da exaustão do diesel e biodiesel.....	35
3.1	Materiais e métodos	35
3.1.1	Combustíveis.....	35
3.1.2	Gerador de gases e partículas finas dos combustíveis diesel e biodiesel.....	36
3.1.3	Delineamento experimental	37
3.1.4	Registro da frequência cardíaca (FC), variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e pressão arterial (PA)	38
3.1.5	Coleta e análise laboratorial dos parâmetros hematológicos..	39

3.1.6	Coleta e análise do lavado broncoalveolar (LBA)	39
3.1.7	Coleta e análise da medula óssea	40
3.1.8	Análise da densidade numérica de neutrófilos e macrófagos no pulmão	40
3.1.9	Análise imunohistoquímica e morfométrica pulmonar.....	41
3.1.10	Análise estatística.....	42
3.2	Resultados.....	42
3.2.1	Propriedades físico-química dos combustíveis diesel e biodiesel.....	42
3.2.2	Parâmetros monitorados em tempo real	44
3.2.3	Análise da frequência cardíaca (FC), variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e pressão arterial (PA)	47
3.2.4	Análise dos parâmetros hematológicos	50
3.2.5	Análise dos parâmetros da medula óssea	53
3.2.6	Análise dos parâmetros inflamatórios pulmonares por lavado broncoalveolar (LBA) e histologia pulmonar	56
3.2.7	Análise imunohistoquímica	59
3.2.8	Sumário dos efeitos	63
3.3	Discussão	65
4	ESTUDO II	74
	Efeito cardiopulmonar agudo induzido pela inalação das partículas ambientais concentradas (PACs) durante a variação sazonal na cidade de São Paulo	74
4.1	Materiais e métodos	74
4.1.1	Amostragem e caracterização do MP _{2,5}	74
4.1.2	Delineamento experimental	77
4.1.3	Protocolo de exposição às PACs.....	78
4.1.4	Registro da frequência cardíaca (FC), variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e pressão arterial (PA)	80
4.1.5	Avaliação da responsividade pulmonar por pletismografia	81
4.1.6	Coleta e análise laboratorial dos parâmetros hematológicos..	82
4.1.7	Análise da densidade numérica de neutrófilos e macrófagos no pulmão	82
4.1.8	Análise imunohistoquímica e morfométrica pulmonar.....	82
4.1.9	Análise estatística	83

4.2	Resultados.....	83
4.2.1	Registro da frequência cardíaca (FC), variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e pressão arterial (PA)	83
4.2.2	Avaliação da responsividade pulmonar por pletismografia	86
4.2.3	Análise dos parâmetros hematológicos	87
4.2.4	Análise histológica pulmonar e imunohistoquímica.....	90
4.2.5	Sumário dos efeitos	92
4.3	Discussão	93
5	CONCLUSÃO GERAL	99
7	REFERÊNCIAS	101

Apêndice

Lista de Abreviaturas e Siglas

AF	Alta frequência
Al	Alumínio
ANP	Agência Nacional do Petróleo
AUC	Área sobre a curva
BF	Baixa frequência
BF/AF	Proporção baixa frequência pela alta frequência
B2	2% de biodiesel acrescido de 98% de diesel
B5	5% de biodiesel acrescido de 95% de diesel
B20	20% de biodiesel acrescido de 80% de diesel
B100	100% de biodiesel
BC	Black carbon
Br	Bromo
Ca	Cálcio
CAPs	Concentrated ambient particles
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CHCM	Concentração de hemoglobina corpuscular média
CO	Monóxido de carbono
COHb	Carboxihemoglobina
COVs	Compostos orgânicos voláteis
CO ₂	Dióxido de carbono
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CONSEMA	Conselho Estadual do Meio Ambiente
Cr	Cromo
DHHS	Department of Health and Human Services
EPA	Environmental Protection Agency
ET-1	Endotelina-1

ET-Ar	Receptor da Endotelina-A
ET-Br	Receptor da Endotelina-B
Fe	Ferro
FC	Frequência cardíaca
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HC	Hidrocarbonetos
HCL	Ácido clorídrico
HCM	Hemoglobina corpuscular média
HE	Hematoxilina-eosina
HEPA	High Efficiency Particulate Air
HPA	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
H ₂ SO ₃	Ácido sulfuroso
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IAG	Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciência Atmosférica
IARC	International Agency for Research on Cancer
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICAM	Molécula de adesão intercelular tipo 1
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
ILAR	Institute for Laboratory Animal Research
INOs	Óxido nítrico sintaxe
ISO	Isoprostano
K	Potássio
LBA	Lavado broncoalveolar
LP AE	Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental
Mch	Metacolina
MMA	Ministério do Meio Ambiente
Mn	Manganês
MP	Material particulado

MP _{0,1}	Material particulado com diâmetro inferior a 0,1 µm
MP _{2,5}	Material particulado com diâmetro inferior a 2,5 µm
MP ₁₀	Material particulado com diâmetro inferior a 10 µm
N	Nitrogênio
NaOH	Hidróxido de sódio
NIH	National Institutes of Health
Ni	Níquel
NO	Óxido nítrico
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
NO _x	Óxidos de nitrogênio
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento
O ₂	Oxigênio
O ₃	Ozônio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PACs	Partículas ambientais concentradas
Pb	Chumbo
PBS	Tampão fosfato-salina
PQAr	Padrões de qualidade do ar
PROCONVE	Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos
PTS	Partículas totais em suspensão
PROMOT	Programa de Controle da Poluição do Ar por Motociclos e
RDW-CV	Amplitude de distribuição dos eritrócitos medido como coeficiente de variação
RDW-SD	Amplitude de distribuição dos eritrócitos medido como desvio padrão
REN21	Registro Global de Energias Renováveis
RMSSD	Raiz quadrada da soma das diferenças sucessivas entre
RMSP	Região Metropolitana de São Paulo
ROFA	Residual Oil Fly Ash

SDNN	Desvio padrão dos intervalos RR normais
S	Enxofre
Si	Silício
SO ₂	Dióxido de enxofre
SO ₃	Trióxido de enxofre
SO _x	Óxidos de enxofre
Ti	Titânio
V	Vanádio
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1
VCM	Volume corpuscular média
VFC	Variabilidade da frequência cardíaca
Zn	Zinco
WHO	World Health Organization

Lista de Símbolos

<	menor
>	maior
=	igual
%	percentual
°C	graus celsius
μL	microlitros
μm	micrômetro
μg/m ³	micrômetro por metro cúbico
mg/m ³	miligrama por metro cúbico
mg/kg	miligrama por kilograma
L/min	litro por minuto
mL	mililitro
ppm	partes por milhão
km ²	quilômetro quadrado
Km	quilômetro
min	minuto
n°	número
mm	milímetros

Lista de Quadros

- Quadro 1.** Padrões de Qualidade do Ar (PQAr) para o Estado de São Paulo. FONTE: CONSEMA, 2012. 7
- Quadro 2.** Classificação dos HPA quanto ao seu potencial carcinogênico. Fonte: IARC, 2010. 13
- Quadro 3.** Fatores de emissão de motores para veículos pesados do ciclo Diesel. Fonte: CONAMA, 2002 19

Lista de Figuras

Figura 1.	Evolução do número populacional e da frota veicular na cidade de São Paulo. FONTE: IBGE, 2014.	2
Figura 2.	Mapa da Exclusão/Inclusão Social, segundo a Qualidade de Vida no Município de São Paulo em 2002. FONTE: Prefeitura São Paulo, acessado: 2014.	3
Figura 3.	Concentração anual de MP_{10} em 2009 (a); Artigos publicados sobre poluição do ar entre 1983 e 2013 (b). FONTE: Fajersztajn et al. (2013).	4
Figura 4.	Evolução da mortalidade por causa. FONTE: OCDE, 2012.	5
Figura 5.	Emissões de poluentes por fontes na RMSP. FONTE: CETESB, 2013.	8
Figura 6.	Alvo anatômico do MP. ADAPTADO: Nemmar et al. (2013).	10
Figura 7.	Níveis de MP_{10} em escala global nos países desenvolvidos (EUA, Canadá) e em desenvolvimento (Índia, China e Brasil). FONTE: World Bank, 2014. Acessado em Março/2014.	11
Figura 8.	Distribuição percentual da qualidade do ar na RMSP. FONTE: CETESB, 2013.	17
Figura 9.	Consumo de energia nos transportes. FONTE: BEN (2013).	18
Figura 10.	Consumo anual de diesel e biodiesel ($10^3 m^3$). FONTE: 1º Inventário Nacional de Emissões Atmosféricas por Veículos Automotores Rodoviários, 2011.	20
Figura 11.	Países produtores de biodiesel (a). Oleaginosas produzidas em nível geográfico (b). FONTE: REN21, 2013	21
Figura 12.	Reação de transesterificação para obtenção do biodiesel. Adaptado: Geris et al. (2007).	22

Figura 13. Porcentagem de alteração nas emissões das diferentes concentrações de biodiesel. FONTE: EPA, 2002.	23
Figura 14. Artigos publicados sobre biodiesel (cor: amarelo) e sobre o seu efeito no sistema biológico (cor: verde) entre 2000 e 2014. FONTE: PubMed, acessado 01/04/2014.	24
Figura 15. Sistema de exposição ao ar filtrado (AF) e à exaustão dos combustíveis diesel e biodiesel. MP_{2,5} : material particulado com diâmetro $\leq 2,5 \mu\text{m}$; NO : óxido nítrico; NO₂ : dióxido de nitrogênio; lpm : litros por minuto; PI : pressão interna.	37
Figura 16. Média ($\pm$ EP) da VFC, FC e PA de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). A. SDNN, B. RMSSD, C. BFreq, D. AFreq, E. BFreq/AFreq, F. PA	49
Figura 17. Média ($\pm$ EP) dos parâmetros hematológicos de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). A. Eritrócitos, B. Hemoglobina, C. Hematócrito, D. CHCM, E. RDW-SD, F. Leucócitos, G. Linfócitos, H. Reticulócitos	52
Figura 18. Média ($\pm$ EP) dos parâmetros do mielograma de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). A. Mielócito, B. Metamielo, C. Bastonete, D. Segmentado, E. Eosinófilo, F. Linfócito, G. Plasmócito, H. Série vermelha	55
Figura 19. Mediana (IQR:25-75%) do LBA de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). A. Células totais, B. Macrófagos, C. Neutrófilos	56
Figura 20. Mediana (IQR:25-75%) da densidade numérica de células inflamatórias no parênquima pulmonar de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). A. PNN, B. MMN	57

Figura 21. Média ($\pm$ EP) da expressão das citocinas nos vasos peribronquiolares de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). A. ET-Ar, B. ET-Br, C. INOs, D. IL-8, E. VCAM	60
Figura 22. Média ($\pm$ EP) da expressão das citocinas no epitélio brônquico de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). A. ET-Ar, B. ET-Br, C. INOs, D. IL-8, E. ISO	62
Figura 23. Desfecho dos principais achados no sistema cardiopulmonar de camundongos Balb/C. Exposição aguda ao BD600 (a); exposição aguda ao D600 (b)	66
Figura 24. Diagrama dos mediadores inflamatórios avaliados no LBA de camundongos expostos à exaustão de diesel e biodiesel (24h, 7 e 28 dias). FONTE: Yanamala et al., 2013	69
Figura 25. Média ($\pm$ EP) da análise dos componentes principais durante os períodos frio/seco e quente/úmido. Frio/seco $\neq$ Quente/úmido ($p=0,001$)	77
Figura 26. Mediana (IQR:25-75%) da VFC, FC e PA para os grupos expostos ao AF e às PACs durante os períodos frio/seco e quente/úmido. A. SDNN, B. RMSSD, C. BFreq, D. AFreq, E. FC, F. PA	84
Figura 27. Erro padrão da média do Penh obtido pela curva dose-resposta à metacolina para os grupos expostos ao AF e as PACs durante os períodos frio/seco e quente/úmido. A. Frio/seco, B. Quente/úmido, C. Todos. Frio/seco: PACs $\neq$ AF (* $p=0,012$; # $p=0,038$)	86
Figura 28. Média ($\pm$ EP) do Penh _{máx} e área sob a curva (AUC) para os grupos expostos ao AF e às PACs durante os períodos frio/seco e quente/úmido. A. Penh _{máx} , B. AUC.	86

- Figura 29.** Média ($\pm$ EP) dos parâmetros hematológicos para os grupos expostos ao AF e às PACs durante os períodos frio/seco e quente/úmido. **A.** Eritrócitos, **B.** Hematócrito, **C.** Hemoglobina, **D.** VCM, **E.** RDW-CV, **F.** CHCM 88
- Figura 30.** Média ($\pm$ EP) da densidade numérica de células inflamatórias no parênquima pulmonar para os grupos expostos ao AF e às PACs durante os períodos frio/seco e quente/úmido. **A.** PMN, **B.** MNN. 90
- Figura 31.** Mediana (IQR:25-75%) da expressão das citocinas nos vasos peribronquiolares para os grupos expostos ao AF e às PACs durante os períodos frio/seco e quente/úmido. **A.** Endotelina-Ar, **B.** Endotelina-Br, **C.** VCAM-1 92

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Propriedades físicas do óleo diesel	43
Tabela 2.	Propriedades físicas do óleo vegetal éster etílico de esgoto (biodiesel)	44
Tabela 3.	Valores descritivos dos parâmetros mensurados em tempo real (MP _{2,5} , NO ₂ , NO, NO _x , temperatura e umidade) de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). Os valores estão apresentados como valores médios, mínimos e máximos	46
Tabela 4.	Valores descritivos da VFC, FC e PA de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). Os valores estão apresentados como média e desvio-padrão	48
Tabela 5.	Valores descritivos dos parâmetros hematológicos de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). Os valores estão apresentados como média e desvio-padrão	51
Tabela 6.	Valores descritivos dos parâmetros do mielograma de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). Os valores estão apresentados como média e desvio padrão	54
Tabela 7.	Valores descritivos dos parâmetros inflamatórios do LBA de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). Os valores estão apresentados como mediana e intervalo interquartil	58
Tabela 8.	Valores descritivos dos parâmetros inflamatórios no parênquima pulmonar de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). Os valores estão apresentados como mediana e intervalo interquartil	58
Tabela 9.	Valores descritivos da expressão das citocinas nos vasos peribronquiolares de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). Os valores estão apresentados como média e desvio-padrão	59

Tabela 10. Valores descritivos da expressão das citocinas no epitélio brônquico de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). Os valores estão apresentados como média e desvio-padrão	61
Tabela 11. Efeitos no sistema biológico	63
Tabela 12. Caracterização elementar e identificação dos componentes principais das amostras de MP _{2,5} coletadas entre Junho/2007 a Agosto/2008 em São Paulo, Brasil	76
Tabela 13. Delineamento experimental	79
Tabela 14. Valores médios (temperatura e umidade relativa) e soma (índice de precipitação) dos parâmetros meteorológicos obtidos entre 2007 e 2012 em São Paulo, Brasil. Fonte: Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciência Atmosférica (IAG), USP	80
Tabela 15. Valores descritivos da VFC, FC e PA para os grupos expostos ao AF e às PACs durante os períodos frio/seco e quente/úmido. Os valores estão apresentados como mediana e intervalo interquartil.	85
Tabela 16. Valores descritivos dos parâmetros hematológicos para os grupos expostos ao AF e às PACs durante os períodos frio/seco e quente/úmido. Os valores estão apresentados como média e desvio-padrão.	89
Tabela 17. Valores descritivos da densidade numérica de células inflamatórias no parênquima pulmonar para os grupos expostos ao AF e às PACs durante os períodos frio/seco e quente/úmido. Os valores estão apresentados como média e desvio-padrão.	91
Tabela 18. Valores descritivos dos parâmetros imunohistoquímicos para os grupos expostos ao AF e às PACs durante os períodos frio/seco e quente/úmido. Os valores estão apresentados como mediana e intervalo interquartil.	91
Tabela 19. Efeitos no sistema biológico	93

Resumo

Brito JM. [tese]. *Avaliação da exposição aguda às partículas urbanas concentradas e da exaustão de motores diesel e biodiesel sobre o perfil inflamatório pulmonar e sistêmico de camundongos*. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014. 115p.

Introdução: Em ambientes urbanos, a exaustão dos carros a diesel é uma importante fonte de partículas e gases que afetam diretamente a saúde das pessoas. Como a adição do biodiesel ao diesel é recente, torna-se necessário avaliar o perfil toxicológico dessas emissões e os possíveis efeitos adversos a saúde. Além do mais, a concentração dos poluentes atmosféricos e sua composição físico-química sofrem influências diretas das condições meteorológicas. Esse estudo tem como foco avaliar o perfil toxicológico dos poluentes primários (emitidos diretamente da fonte) e secundários (gerados a partir das condições atmosféricas) por meio de dois estudos. **Objetivos:** **(Estudo I)** Avaliar a exposição aguda da exaustão do diesel e biodiesel no perfil inflamatório pulmonar e sistêmico; **(Estudo II)** Avaliar se a exposição aguda a baixos níveis de partículas ambientais concentradas (PACs) promovem efeitos cardiopulmonares e sistêmicos; e se a magnitude dessas alterações observadas é influenciada pelos períodos (frio/seco e quente/úmido). **Métodos:** **(Estudo I)** Camundongos Balb/C foram expostos ao ar filtrado (AF) e a duas concentrações de $MP_{2,5}$ (600 e 1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) tanto da exaustão do combustível diesel (D) quanto do biodiesel (BD). As emissões dos poluentes ($MP_{2,5}$, NO e NO_2), temperatura e umidade foram monitorados em tempo real. Os registros da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), frequência cardíaca (FC) e da pressão arterial (PA) foram obtidas 30 minutos após a exposição. Após 24 horas os animais foram eutanasiados e foram coletados o lavado broncoalveolar (LBA), o pulmão, o sangue e a medula óssea para avaliar a inflamação pulmonar e sistêmica. A expressão das citocinas (ET-Ar, ET-Br, INOs, ISO, VCAM, IL-8) foram analisadas nos vasos peribronquiolares e no epitélio brônquico. **(Estudo II)** Camundongos Balb/C foram expostos ao ar filtrado e as PACs na concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ geradas no período frio/seco e quente/úmido. A hiperresponsividade pulmonar, VFC, FC, PA foram mensurados 30 minutos após a exposição. Após 24 horas, os animais foram eutanasiados e foram coletados o pulmão e o sangue para avaliar a inflamação pulmonar e sistêmica. **Resultados:** **(Estudo I)** As emissões do NO e NO_2 foram maiores na exaustão do biodiesel comparado ao diesel. Houve aumento da VFC no BD600, D600 e D1200 comparado ao AF, já a PA reduziu no D1200 comparado ao AF. Houve aumento dos eritrócitos, hematócrito, RDW-SD e reticulócitos no BD1200 e D1200 comparado ao AF;

aumento dos eritrócitos, RDW-SD e linfócitos no D600 comparado ao AF; e redução do MCHC no BD1200 e D1200 comparado ao AF. No LBA e na histologia pulmonar foram evidenciados aumento dos neutrófilos no BD600 comparado ao AF. Nos vasos peribronquiolares, houve aumento da expressão da ET-Ar e ET-Br no BD600 comparado ao AF. No epitélio brônquico, houve aumento da expressão da ET-Br no BD600, BD1200, D600 e D1200 comparado ao AF, aumento do VCAM no BD1200 e D600 comparado ao AF. **(Estudo II)** As PACs geradas nos períodos frio/seco e quente/úmido, induziram alterações nos parâmetros sanguíneos e inflamação pulmonar. PACs geradas no período frio/seco reduziram o volume corpuscular médio (VCM) e elevaram os eritrócitos, hemoglobina, MCHC e o RDW-CV comparado ao AF, no parênquima pulmonar houve um influxo de neutrófilos. Similarmente, as PACs geradas no período quente/úmido reduziram o VCM e elevaram os eritrócitos, hemoglobina, hematócrito e RDW-CV comparado ao AF. **Conclusão:** A exposição ao biodiesel causou inflamação pulmonar, broncoconstrição dos vasos peribronquiolares e do epitélio brônquico; já a exposição ao diesel desencadeou uma inflamação sistêmica, aumento do estímulo parassimpático e broncoconstrição do epitélio brônquico. Curtas exposições a baixos níveis de PACs induziram modesta, porém, significativa inflamação pulmonar e alterações nos parâmetros sanguíneos. Em adição, nossos dados suportam o conceito de que alterações nas condições climáticas modificam levemente a toxicidade das partículas, já que a dose administrada de PACs geradas durante o período frio/seco produziram uma resposta mais exacerbada.

Descritores: 1.Poluentes do ar 2.Emissões de veículos 3.Material particulado 4.Exposição por inalação 5.Camundongos 6.Sistema cardiovascular 7.Inflamação

Summary

Brito JM. *Assessment of acute exposure to concentrated urban particles and diesel and biodiesel exhaust about the inflammatory pulmonary profile and systemic of mice* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014. 115p.

Background: In urban environments, the exhaust of diesel cars is an important source of particles and gases that directly affect people's health. As the addition of biodiesel to diesel is recent, it is necessary to evaluate the toxicological profile of these emissions and the possible adverse health effects. Moreover, the concentration of air pollutants and their physico-chemical composition suffer direct influences of weather conditions. This study aims to evaluate the toxicological profile of primary pollutants (emitted directly from the source) and secondary (generated from the weather conditions) through two studies.

Objectives: (**Study I**) Evaluate the acute exposure of diesel and biodiesel exhaust in pulmonary and systemic inflammatory profile. (**Study II**) Evaluated whether acute exposure to low levels of concentrated ambient particles (CAPs) promotes cardiopulmonary and systemic effects; and whether the magnitude of these observed changes is influenced by periods (cold/dry and warm/humid).

Methods: (**Study I**) Balb/C mice were exposed for two hours to filtered air (FA) and two doses (600 and 1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) of both diesel (D) and biodiesel (BD) fuels. The $\text{PM}_{2.5}$, NO, and NO_2 concentrations, air temperature and humidity were monitored in real time. HRV (time and frequency domain), HR and BP parameters were collected after 30 minutes of exposure. After 24 hours were available the bronchoalveolar lavage (BALf), lung histology, blood and bone marrow for pulmonar and systemic inflammation analysis. The cytokines expression (ET-Ar, ET-Br, INOs, ISO, VCAM, IL-8) were available on peribronchiolar vessels and bronchial epithelium. (**Study II**) Balb/C mice were exposed to 200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ to concentrated ambient particles (CAPs) and filtered air (FA) in cold/dry and warm/humid periods. Lung hyper-responsiveness, heart rate, heart rate variability and blood pressure were evaluated 30 minutes after the exposures. After 24 hours, blood and tissue sampling were performed.

Results: (**Study I**) Emissions of NO and NO_2 were higher in the biodiesel compared to diesel oil exhaust. There was an increase in HRV for the BD600, D600 and D1200 compared to FA, already BP reduced the D1200 compared to FA. There was an increase on the erythrocytes, hematocrit, RDW-SD and reticulocytes in BD1200 and D1200 compared to FA; increase in erythrocytes, lymphocytes and RDW-SD on D600 compared to FA; and reduction of MCHC in BD1200 and D1200 compared to FA. BAL and lung histology was evidenced an increase on the neutrophils BD600 compared to FA. In peribronchiolar vessels

there was increased of the expression on ET-Ar and ET-Br on the BD600 compared to FA. In the bronchial epithelium there was increased expression of ET-Br in BD600, BD1200, D600 and D1200 compared to FA, increased VCAM on the BD1200 and D600 compared to FA. (**Study II**) CAPs generated during both periods (warm/humid and cold/dry) induced alterations in red blood cells and lung inflammation. CAPs during the cold/dry period reduced the mean corpuscular volume (MCV) levels and increased erythrocytes, hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC) and red cell distribution width coefficient variation (RDW-CV) levels compared to the FA group. Similarly, CAPs during the warm/humid period decreased MCV levels and increased erythrocytes, hemoglobin, haematocrit and RDW-CV levels compared to the FA group. CAPs during the cold/dry period increased the influx of neutrophils in the alveolar parenchyma. No differences were obtained on vasoconstrictors of pulmonary vessels. **Conclusion:** The exposure to biodiesel caused lung inflammation, bronchoconstriction of the peribronchiolar vessels and bronchial epithelium; already the exposure of the diesel caused systemic inflammation, increased of the parasympathetic stimulation and bronchoconstriction of the bronchial epithelium. Short-term exposures to low concentrations of CAPs elicited modest but significant pulmonary inflammation and, into a lesser extent, changes in blood parameters. In addition, our data support the concept that changes in climate conditions modify slightly particle toxicity, since equivalent doses of CAPS of the cold/dry period produced a more exacerbated response.

Descriptors: 1. Air pollutants 2.Vehicle emissions 3.Particulate matter 4.Inhalation exposure 5.Mice 6.Cardiovascular system 7.Inflammation

1 INTRODUÇÃO

A partir da revolução industrial, o Tema *Poluição do Ar* vem tomando grande destaque, devido aos seus efeitos adversos tanto no meio ambiente quanto na saúde. As Grandes Metrôpoles são as regiões que mais sofrem com esse problema. As indústrias e a frota veicular (leves e pesados) são os principais responsáveis por lançar na atmosfera uma variedade de compostos físico-químicos que deterioram a qualidade do ar, podendo afetar as condições atmosféricas nas diferentes esferas (local, regional e global).

A megacidade de São Paulo, localizada no Hemisfério Sul, em uma área de 1.523 km² a 824 metros de altitude, possui aproximadamente 11.821.873 habitantes e uma frota veicular de 7.010.508. Conforme mostra a Figura 1, o aumento da frota veicular é maior que o crescimento populacional na cidade de São Paulo (IBGE, 2014). As fontes móveis são os principais emissores de poluentes no ar (Andrade et al. 2012; Miranda et al. 2012). Significantes efeitos deletérios da poluição do ar têm sido registrados em níveis ambientais na cidade de São Paulo, predominantemente associados às partículas (Mauad et al. 2008; Matsumoto et al. 2010; Davel et al. 2012).

De acordo com dados da CETESB (2013), a frota automotiva responde por 97% das emissões de monóxido de carbono (CO), 77% de hidrocarbonetos (HC), 82% de óxidos de nitrogênio (NO_x), 40% de material particulado (MP) e 36% de óxidos de enxofre (SO_x) na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP). Os veículos leves, movidos a gasolina, etanol e flex, são os maiores

emissores de CO e HC. Já a frota de veículos pesados (caminhões e ônibus), movidos a diesel são os maiores emissores de NOx e MP. Nota-se que, nos últimos anos, as emissões dos NOx, um poluente precursor do ozônio (O₃), vêm apresentando os piores índices de qualidade do ar na RMSP.

Figura 1. Evolução do número populacional e da frota veicular na cidade de São Paulo. FONTE: IBGE, 2014

Na conformação da megacidade de São Paulo, o mapa da exclusão/inclusão social dessa cidade, entre 1991 e 2000, aponta a precariedade do acesso a água, esgoto e coleta de lixo nas regiões periféricas (a), período em que a população da região central migrou para a periferia (b), pois a região central tornou-se predominantemente comercial (c). Aliado à falta de transporte público, houve um maior uso do transporte individual, gerando a

necessidade de maiores deslocamentos e, conseqüentemente, as emissões por fontes móveis aumentaram nessas áreas (d) (Figura 2).

Figura 2. Mapa da Exclusão/Inclusão Social, segundo a Qualidade de Vida no Município de São Paulo em 2002. FONTE: Prefeitura São Paulo, acessado: 2014

De acordo com Fajersztajn et al. (2013), os países desenvolvidos, tais como Estados Unidos (EUA) e o Canadá, são responsáveis por lançar na atmosfera entre 5 e 20 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de MP_{10} . Já os países em desenvolvimento, tais

como América do Sul, África (Norte), Índia e China, emitem entre 71 e 1.420 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de MP_{10} . Os mesmos autores discorrem que os países com os piores índices de qualidade do ar são aqueles com menor produção científica sobre o assunto, ou seja, os países em desenvolvimento (Figura 3).

Figura 3. Concentração anual de MP_{10} em 2009 (a); Artigos publicados sobre poluição do ar entre 1983 e 2013 (b). FONTE: Fajersztajn et al. (2013)

Segundo estimativa da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE, 2012), em 2050 a dependência de combustíveis fósseis será de 85%, elevando em 50% as emissões globais dos gases de efeito estufa. Assim, a poluição do ar será a principal causa de mortes prematuras, cerca de 3,6 milhões de mortes/ano, com maior incidência na China e Índia, superando a mortalidade por malária e pela falta de saneamento básico (Figura 4).

Figura 4. Evolução da mortalidade por causa. FONTE: OCDE, 2012

1.1 Poluição do ar

A poluição do ar consiste de uma mistura de partículas e gases suspensos no ar. Ela varia em forma, composição e origem, de acordo com a magnitude das emissões, a topografia e as condições meteorológicas da região, que podem ser favoráveis ou não à dispersão dos poluentes, e que dependendo dessa dispersão, tornam o ar impróprio, nocivo à saúde e danoso aos materiais, à fauna e à flora (MMA, 2014).

Os poluentes emitidos na atmosfera pelas diferentes fontes (fixas e/ou móveis) sofrem uma variedade de processos químicos e físicos no ar, podendo permanecer no ar de dias a semanas, além de atingir quilômetros de distância (Solomon et al. 2008).

Os poluentes do ar são divididos em dois grupos: **(1) Primários** - emitidos diretamente pelas fontes de emissão e **(2) Secundários** - formados

através de reações químicas entre os componentes primários da poluição e os componentes naturais da atmosfera.

Os poluentes também são classificados da seguinte forma: **(1) Compostos de Enxofre** (SO_2 , SO_3 , H_2S , mercaptanas, dissulfeto de carbono), **(2) Compostos de Nitrogênio** (NO , NO_2 , NH_3 , HNO_3 , nitratos), **(3) Compostos de Orgânicos** (hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos orgânicos), **(4) Monóxido de Carbono** (CO), **(5) Compostos Halogenados** (HCl , HF , cloretos, fluoretos), **(6) Metais Pesados** (Pb , Cd , As , Ni), **(7) Material Particulado** (misturas de compostos no estado sólido e/ou líquido), e **(8) Oxidantes fotoquímicos** (O_3 , formaldeído, acroleína, PAN) (CETESB, 2013).

Os padrões de qualidade do ar (PQAr) no Brasil foram estabelecidos pela Resolução CONAMA nº 03/1990 em dois padrões: **(1) Primários** (níveis de poluentes que, se ultrapassados, poderão afetar a saúde), e **(2) Secundários** (níveis de poluentes dos quais se prevê o mínimo efeito na saúde, na fauna, na flora e nos materiais). Baseando-se nas diretrizes estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), novos PQAr foram instituídos no Estado de São Paulo pelo Decreto Estadual nº 59113/2013, através de um conjunto de metas gradativas e progressivas, até que as concentrações dos poluentes sejam reduzidas a níveis desejáveis ao longo do tempo (Quadro 1). O Conselho Estadual do Meio Ambiente (CONSEMA, 2012) instituiu novos PQAr através das seguintes metas:

1. **Metas Intermediárias (MI):** objetiva-se reduzir gradativamente as emissões de poluentes por fontes fixas e móveis, por meio de três etapas: **(1) MI1** (em vigor desde 24/04/2013), **(2) MI2** (entra em vigor após revisão da etapa MI1 por estudos técnicos convalidados pelo

CONSEMA), e **(3) MI3** (entra em vigor após revisão da etapa MI2 com vigência determinada pelo CONSEMA).

2. **Padrões Finais (PF):** níveis determinados para preservação da saúde da população em relação aos danos causados pela poluição do ar.

Quadro 1. Padrões de Qualidade do Ar (PQAr) para o Estado de São Paulo.

FONTE: CONSEMA, 2012

Poluente	Período de Tempo	MI1 ($\mu\text{m}/\text{m}^3$)	MI2 ($\mu\text{m}/\text{m}^3$)	MI3 ($\mu\text{m}/\text{m}^3$)	PF ($\mu\text{m}/\text{m}^3$)
MP₁₀	24 horas	120	100	75	50
	Média aritmética anual	40	35	30	20
MP_{2,5}	24 horas	60	50	37	25
	Média aritmética anual	20	17	15	10
SO₂	24 horas	60	40	30	20
	Média aritmética anual	40	30	20	-
NO₂	1 hora	260	240	220	200
	Média aritmética anual	60	50	45	40
O₃	8 horas	140	130	120	100
CO	8 horas	-	-	-	9 ppm
Fumaça	24 horas	120	100	75	50
	Média aritmética anual	40	35	30	20
PTS	24 horas	-	-	-	240
	Média geométrica anual	-	-	-	80
Chumbo (Pb)	Média aritmética anual	-	-	-	0,5

Os padrões vigentes estão assinalados em cinza.

O Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores (PROCONVE) e o Programa de Controle da Poluição do Ar por Motociclos e Veículos Similares (PROMOT) têm levado os fabricantes a adotarem novas tecnologias. Concomitantemente, a qualidade dos combustíveis vem melhorando para atender os novos limites de emissões. Contudo, a redução significativa de poluentes na atmosfera tem sido contrabalanceada pelo aumento da frota veicular e o uso do transporte individual (CETESB, 2013). A Figura 5 descreve as emissões relativas de poluentes atmosféricos por tipo de fonte.

Figura 5. Emissões de poluentes por fontes na RMSP. FONTE: CETESB, 2013

As medidas realizadas neste estudo focalizaram os poluentes primários provenientes da exaustão dos combustíveis diesel e biodiesel, e os poluentes secundários gerados nos diferentes períodos do ano (frio/seco e

quente/úmido). Assim, serão feitas algumas considerações sobre suas características físico-químicas e sua toxicidade, porém com ênfase no Material Particulado (MP).

1.1.1 Material Particulado (MP)

O MP é um poluente constituído por partículas sólidas e líquidas suspensas no ar, de origem natural ou antropogênica. Seu tamanho aerodinâmico e sua composição físico-química é dependente de sua origem e das condições atmosféricas. As partículas podem ser classificadas em: **(1) Primárias** (produzidas diretamente por fontes emissoras), e **(2) Secundárias** (geradas na atmosfera por conversão de gás a partículas pelos compostos orgânicos voláteis, dióxidos de enxofre e dióxidos de nitrogênio).

Os principais componentes do MP são: sulfato, nitrato, amônia, sal marinho, poeira, compostos orgânicos e carbono elementar. A classificação mais comumente utilizada para descrever o MP quanto ao seu tamanho é seu diâmetro aerodinâmico: **(1) Partículas ultrafinas** (diâmetro aerodinâmico $< 0,1 \mu\text{m}$ – $\text{MP}_{0,1}$), **(2) Partículas finas** (diâmetro aerodinâmico entre $0,1$ e $2,5 \mu\text{m}$ – $\text{MP}_{2,5}$), e **(3) Partículas grossas** (diâmetro aerodinâmico $> 2,5 \mu\text{m}$ – MP_{10}).

O $\text{MP}_{0,1}$ tem origem da queima incompleta de combustíveis fósseis com tempo de permanência relativamente curto na atmosfera por se agregar progressivamente, formando partículas maiores. Já o $\text{MP}_{2,5}$ origina-se de usinas, indústrias e da queima incompleta de combustíveis da frota de veículos leves e pesados. A fração grossa (MP_{10}) é proveniente de construções,

matérias da crosta e fricção dos pneus com o solo. O principal alvo anatómico, de acordo com o tamanho aerodinâmico, está sumarizado na Figura 6.

Figura 6. Alvo anatómico do MP. ADAPTADO: Nemmar et al. (2013)

O MP é amplamente estudado, por seus efeitos adversos à saúde, principalmente no sistema cardiopulmonar, e atinge os grupos populacionais mais susceptíveis, tais como crianças e adultos (WHO, 2005). Porém, o mecanismo de tais efeitos não é totalmente esclarecido. Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa têm descrito o MP como fator causal de broncoconstrição pulmonar (Mazzoli-Rocha et al., 2014), inflamação pulmonar (Riva et al. 2011, Matsumoto et al. 2010), estresse oxidativo (Pereira et al.

2007), disfunção endotelial da artéria pulmonar (Davel et al. 2012) e redução da variabilidade da frequência cardíaca (Rivero et al. 2005, Maatz et al. 2009), além de aumentar a predisposição ao desenvolvimento de nódulos pulmonares (Pereira et al. 2011).

Em virtude dos programas de controle de emissões ao longo dos anos, a concentração do MP_{10} se mantém constante desde 2005, não ultrapassando os padrões de qualidade do ar na RMSP (CETESB, 2013). Como descrito na Figura 7, as emissões de MP_{10} , em nível mundial, estão acima do recomendável pela Organização Mundial da Saúde (OMS), uma concentração média anual de $20\mu\text{g}/\text{m}^3$. Além disso, as emissões de MP_{10} são similares entre o Brasil e os EUA; já, a Índia e a China são os maiores emissores desse poluente.

Figura 7. Níveis de MP_{10} em escala global nos países desenvolvidos (EUA, Canadá) e em desenvolvimento (Índia, China e Brasil). FONTE: World Bank, 2014. Acessado em Março/2014

1.1.2 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA)

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) são um grupo de mais de 100 substâncias químicas diferentes formadas pela queima incompleta do carvão, petróleo e gás, lixo ou pirólise de materiais que contêm carbono e hidrogênio (Vasconcelos et al. 1998). Esse poluente pode ser detectado na atmosfera tanto na fase gás (compostos com baixo peso molecular) quanto na fase particulada (IARC, 2010). De acordo com a *Environmental Protection Agency* (EPA, 1995), 17 HPA são reconhecidos por causar efeitos à saúde, e são classificados em 4 categorias, como descrito no Quadro 2.

Em geral, os HPA com 2 a 3 anéis estão presentes no ar na fase gás (naftaleno, acenafteno, acenaftileno, antraceno, fluoreno, fenantreno) e são altamente tóxicos. Já, os HPA com 4 anéis estão presentes no ar tanto na fase gás quanto na fase particulada (fluoranteno, pireno, criseno, benzo[a]antraceno), e os HPA com 5 ou mais anéis, reconhecidos como mutagênicos e carcinogênicos, são detectados predominantemente na fase particulada (benzo[e]pireno, benzo[g,h,i]perileno) (EPA, 1995).

Somos expostos diariamente aos diversos compostos dos HPAs. Estudos epidemiológicos indicam que a complexa mistura contida nos HPAs produz imunossupressão em condições ambientais (Biro et al., 2002; Karakaya et al., 2004; Oh et al., 2005). Segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 2010), a resposta carcinogênica dos HPA varia consideravelmente em relação à dose e ao tipo de exposição.

Quadro 2. Classificação dos HPA quanto ao seu potencial carcinogênico.

Fonte: IARC, 2010

HPA	Classificação	
	IARC	EPA
Acenafteno	3	-
Acenaftileno	-	3
Antraceno	3	3
Benzo[a]antraceno	2B	2A
Benzo[a]pireno	1	2A
Benzo[e]pireno	3	-
Benzo[b]fluoranteno	2B	2A
Benzo[g,h,i]perileno	3	3
Benzo[j]fluoranteno	2B	-
Benzo[k]fluoranteno	2B	2A
Criseno	2B	2A
Dibenzo[a,h]antraceno	2A	2A
Fluoranteno	3	3
Fluoreno	3	3
Indeno[1,2,3-c,d]pireno	2B	2A
Fenantreno	3	3
Pireno	3	3

IARC –International Agency for Research on Cancer;**EPA** – Environmental Protection Agency;**DHHS** – Department of Health and Human Services;**1** – Carcinogênico em humanos; **2A** – Provável carcinogênico em humanos; **2B** – Possível carcinogênico em humanos; **3** – Não classificado como carcinogênico em humanos

1.1.3 Monóxido de carbono (CO)

O monóxido de carbono (CO) é um gás incolor e inodoro, constituinte traço da atmosfera, produzido por processos naturais e atividades humanas. Na área urbana, a principal fonte emissora desse poluente é a frota veicular, através da queima incompleta de combustíveis que contêm carbono (CETESB, 2013).

Em concentrações elevadas, o CO causa danos à saúde, pois é rapidamente absorvido pela corrente sanguínea e liga-se ao oxigênio pela hemoglobina, formando a carboxihemoglobina (COHb); como consequência, reduz a capacidade de transportar oxigênio do sangue. A exposição em níveis elevados desse poluente pode levar até à morte (WHO, 1999). Com a renovação da frota veicular nos últimos anos, os níveis de CO têm se reduzido gradualmente na RMSP (CETESB, 2013).

1.1.4 Óxidos de enxofre (SO_x)

Os compostos de enxofre e as moléculas de oxigênio constituem os óxidos de enxofre (SO_x). Suas principais fontes emissoras são a queima de combustíveis fósseis e as atividades industriais. Dentre os óxidos de enxofre, destaca-se o dióxido de enxofre (SO₂), gás incolor com forte odor.

Por ter uma boa solubilidade em água, o SO₂ forma o ácido sulfuroso (H₂SO₃). Na presença da umidade do ar, o SO₂ forma o trióxido de enxofre (SO₃), que se converte rapidamente em ácido sulfúrico (H₂SO₄). O SO₂

favorece a formação da chuva ácida, além de ser precursor dos sulfatos, um dos principais componentes do MP.

O SO_2 é classificado como não carcinogênico para humanos (Grupo 3) pela IARC (1992). Não obstante, é altamente tóxico à saúde, contribuindo para a predisposição ou agravamento de doenças respiratórias (ex.: enfisema, bronquite) e cardiovasculares, além de poder levar até à morte.

As fontes móveis e fixas emitem aproximadamente 9 mil t/ano de SO_x , sendo 37% dessas emissões advindas da frota veicular (CETESB, 2013). Na RMSP, o SO_2 tem sido reduzido consideravelmente na última década, devido à redução do teor de enxofre no combustível diesel. Em janeiro de 2010 o diesel passou a ser fornecido com 50 ppm enxofre (S50), e em janeiro de 2013 foi disponibilizado o diesel com 10 ppm enxofre (S10).

1.1.5 Óxidos de Nitrogênio (NO_x)

Os óxidos de nitrogênio (NO_x) são um grupo de gases compostos de nitrogênio (N) e oxigênio (O_2), emitidos principalmente sob a forma de óxido nítrico (NO) e dióxido de nitrogênio (NO_2) que, dependendo de sua concentração, causam prejuízos à saúde. O NO é um poluente primário e o NO_2 é tanto um poluente primário quanto secundário com papel fundamental na formação do “smog fotoquímico”. Altas temperaturas ocorridas durante a combustão geram reação entre o N e o O_2 , formando o NO que, oxidado no ar, forma o NO_2 . O NO também reage com o ozônio (O_3), formando o NO_2 .

As fontes móveis e fixas emitem na atmosfera aproximadamente 7,7 mil t/ano de NO_x , sendo a frota veicular responsável por 80% dessas

emissões, e 60,3% desse total originários dos veículos pesados (CETESB, 2013). De acordo com a CETESB (2013), o NO_2 apresenta uma tendência não definida e não tem ultrapassado os padrões de qualidade do ar na última década na RMSP.

1.1.6 Ozônio

Os poluentes secundários (NO_x e COVs), sob a ação da luz solar, formam o ozônio (O_3), importante indicador da presença de oxidantes fotoquímicos na atmosfera. O O_3 formado na estratosfera é um filtro dos raios ultravioletas, com função protetora da superfície terrestre. Todavia, o O_3 , formado na troposfera constitui um poluente secundário, extremamente nocivo à saúde.

Processos industriais, bem como veículos leves e pesados, são os maiores emissores de NO_2 . A fotólise do NO_2 libera o oxigênio atômico, que se combina com o oxigênio molecular formando o O_3 . Na ausência de outros oxidantes, o NO é oxidado pelo O_3 a NO_2 (Martins et al. 2002).

Na RMSP, o O_3 é o poluente que mais ultrapassa os padrões de qualidade do ar, uma vez que há grande emissão de seus precursores, principalmente de procedência veicular (Figura 8). De acordo com a CETESB (2013), os níveis do O_3 estão intimamente relacionados às condições meteorológicas, com maiores concentrações entre setembro e março (primavera e verão), meses mais quentes e com maior incidência de luz solar, que favorece a sua formação.

Figura 8. Distribuição percentual da qualidade do ar na RMSP. FONTE: CETESB, 2013

1.2 Diesel versus Biodiesel

O setor de transportes tem como característica a elevada demanda de combustíveis fósseis, em especial os derivados do petróleo. Nas megacidades, esses combustíveis são os principais emissores de gases e partículas na atmosfera, causando danos ao ambiente e a saúde (Andrade et al. 2012; Miranda et al. 2012). Um dos grandes desafios atuais é o desenvolvimento de novos combustíveis que possam substituir esses derivados. Assim, nos últimos anos, a produção e o uso de biocombustíveis têm aumentado por serem uma das opções de substituição dos combustíveis fósseis.

Dados preliminares do Balanço Energético Nacional (BEN 2013) indicam que a demanda de óleo diesel para o segmento de transportes foi de 48% em 2012. Já a utilização de energias renováveis ficou na margem dos 13% (Figura 9).

Figura 9. Consumo de energia nos transportes. FONTE: BEN (2013)

O diesel é composto por uma mistura de: gases (CO_2 , O_2 , N , CO , vapor d'água, compostos de nitrogênio, formaldeído, benzeno, acroleína, 1,3-butadiona, HPA e nitro-HPA) e partículas (carbono elementar, carbono orgânico, sulfato, nitrato e metais) (EPA, 2002). No MP do diesel estão adsorvidos compostos extremamente tóxicos, tais como Black Carbon (BC), COVs e HPA (Jalava et al 2012.). As partículas provenientes da exaustão do diesel são classificadas em nanopartículas ($< 100 \text{ nm}$), aglomerações finas e ultrafinas ($< 2500 \text{ nm}$), compostas por um núcleo de carbono elementar (Alander et al. 2004; Boylen et al. 2011).

Com o objetivo de reduzir as emissões de poluentes pelos veículos movidos a diesel, a Resolução da Agência Nacional do Petróleo - ANP nº 43/2008 determinou a obrigatoriedade da disponibilização do óleo diesel de baixo teor de

enxofre, o diesel S-50, a partir de 1º de janeiro de 2010. A medida faz parte da implantação das fases P-5 e P-6 do Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores (PROCONVE), previstas desde 2008, que abrangem veículos pesados e utilitários movidos a diesel. Em continuidade com o programa, em Janeiro de 2013, foi disponibilizado o diesel S-10 e implementada a fase P-7. Essa fase tem como objetivo reduzir as emissões do NOx em 60% e do MP em 80%, igualando-se ao padrão Euro-5, da União Europeia (Quadro 3).

Quadro 3. Fatores de emissão de motores para veículos pesados do ciclo Diesel. Fonte: CONAMA, 2002

LIMITES DO PROCONVE PARA VEÍCULOS DIESEL (g/kW.h)				
Fases Proconve	CO	HC	NOx	MP
Proconve P-5	2,1	0,66	5	0,10
Proconve P-6	1,5	0,46	3,5	0,02
Proconve P-7	1,5	0,46	2	0,02

Note-se que, apesar de agir como um lubrificante do motor, o enxofre do combustível diesel aumenta o risco de corrosão devido à formação do ácido sulfúrico, e, durante e após a combustão, emite altas concentrações de MP e NO_x na atmosfera (Capareda et al. 2008; Wang et al. 2011), os quais são grande causadores de efeitos adversos à saúde (Capareda et al. 2008; Zhao et al. 2010), além de ser classificado como cancerígeno para os seres humanos (Grupo 1) (IARC, 2012). Assim, o combustível biodiesel, além reduzir a dependência dos países ao óleo diesel, é uma melhor opção por não ter enxofre em sua composição, o que reduz as emissões de CO, CO₂, BC, MP,

alguns metais de transição, compostos orgânicos e HC (Brito et al. 2010; Jalava et al. 2010; Karavalaski et al. 2010; Cheung et al. 2009; Song et al. 2011); no entanto, o biodiesel eleva as emissões de NO_x (Wang et al. 2011).

A Resolução ANP nº 07/2008 define o biodiesel (B100) como um combustível composto de alquil-ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais (ANP, 2008), ou seja, é um combustível derivado da biomassa renovável, que substitui total ou parcialmente o óleo diesel em motores de ignição por compressão. Em Janeiro de 2008, a Lei nº 11.097/05 estabeleceu a obrigatoriedade em território nacional da adição de 2% de biodiesel ao diesel (B2). Em continuidade com o programa, em Janeiro de 2013, esse percentual passou para 5% de acréscimo de biodiesel ao diesel (B5). A Figura 10 descreve a projeção da evolução anual de consumo de diesel e biodiesel pela frota de veículos pesados do Brasil.

Figura 10. Consumo anual de diesel e biodiesel (10³m³). FONTE: 1º Inventário Nacional de Emissões Atmosféricas por Veículos Automotores Rodoviários, 2011

O Brasil é um contribuinte potencial em nível mundial da redução do uso de combustíveis fósseis, a notar pelo seu domínio na produção do álcool combustível, desde a década de 70. Em 2004, com o início do Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel, reafirmou o uso dos biocombustíveis como ferramenta de redução do uso dos derivados de petróleo. Dados mostrados pelo Registro Global de Energias Renováveis (REN21, 2013) discorrem sobre os maiores produtores de biodiesel em nível global. Nessa classificação, os EUA emergem como o principal produtor e o Brasil encontra-se como a 4ª potência produtora. A Figura 11 descreve os principais produtores de biodiesel em nível mundial e a potencialidade das oleaginosas no Brasil.

Figura 11. Países produtores de biodiesel (a). Oleaginosas produzidas em nível geográfico (b). FONTE: REN21, 2013

A principal rota de obtenção do biodiesel é através do processo de transesterificação de triacilglicerídeos (óleos e gorduras de origem animal ou vegetal, óleos de fritura, resíduos industriais ou urbanos) com álcoois de cadeia curta (etanol ou metanol) em presença de um catalisador [ácido (ácido clorídrico – HCL) ou básico (hidróxido de sódio – NaOH)], dando origem a ésteres de ácidos graxos e ao subproduto glicerina (Figura 12).

Figura 12. Reação de transesterificação para obtenção do biodiesel. Adaptado: Geris et al. (2007)

Uma das vantagens do biodiesel é a sua adaptabilidade aos motores já existentes de ciclo diesel. Contudo, devido a sua elevada viscosidade, se comparado ao diesel, torna-se desfavorável a adição de altas concentrações do biodiesel ao diesel. O B20 (20% de biodiesel ao diesel) reduz as emissões de MP, carbono elementar, HPA e BaP (Lin et al. 2006; McCormick, 2007; Tsai et al. 2010). Contraditoriamente, estudos descrevem que o B50 (50% de biodiesel ao diesel) eleva as emissões de MP devido ao aumento do índice de cetano e da viscosidade do combustível (Lin et al. 2006; Tsai et al. 2014). Já o B100 (100% biodiesel) contribui com a formação do O₃ por emitir altas

concentrações de formaldeído, acetaldeído e acroleína (Karavalakis et al. 2011; Chai et al. 2013).

Betha et al. (2013) analisaram os elementos vinculados ao MP da exaustão dos combustíveis diesel com baixo teor de enxofre e do biodiesel, explanando maiores concentrações dos elementos Zn, Cr e Ni para o combustível biodiesel; já os elementos As, Co, Al e Mn foram maiores no combustível diesel.

O combustível B20 reduz as emissões de CO (-12,6%), HC (-11%), MP (-18%), CO₂ (-15,7%) e eleva as emissões de NO_x (+1,2%). Já o B100 reduz as emissões de CO (-43,2%), HC (-56,3%), MP (-55,4%), CO₂ (-78,3%) e eleva as emissões de NO_x (+5,8%) (NERL, 1998). Em concordância, a EPA (2002) também descreve que, quanto maior a adição do combustível biodiesel ao diesel, menores são as emissões de MP, CO e HC, mas em compensação eleva as emissões de NO_x (Figura 13).

Figura 13. Porcentagem de alteração nas emissões das diferentes concentrações de biodiesel. FONTE: EPA, 2002

Como a adição de biodiesel ao diesel é recente, pouco se sabe sobre seus possíveis efeitos adversos à saúde, fato que pode ser notado na Figura 14, a qual demonstra um número pequeno de estudos sobre o combustível biodiesel, e, quando o relaciona ao seu possível efeito no sistema biológico, torna-se ainda maior a escassez de estudos.

Figura 14. Artigos publicados sobre biodiesel (cor: amarelo) e sobre o seu efeito no sistema biológico (cor: verde) entre 2000 e 2014. FONTE: PubMed, acessado 01/04/2014

Dada a complexidade do tema, este estudo foi uma oportunidade para investigar a influência da exaustão dos combustíveis diesel e biodiesel na toxicidade cardiopulmonar, visto que uma variedade de biocombustíveis estão sendo introduzidos em motores a diesel e a maioria dos estudos foca apenas em estudos de análise da eficiência do motor.

1.3 Partículas *versus* condições atmosféricas

Hipócrates (400 a.C.), sabidamente citou na obra “Ar, Água e Lugares”: *“Quem quer estudar corretamente a medicina deverá proceder da seguinte maneira: primeiro, deverá considerar os efeitos que cada estação do ano pode produzir, pois as estações não são todas iguais”*. Além dessa afirmação, deve-se levar em consideração as atividades antropogênicas que agem diretamente sobre as condições climáticas.

O clima tropical e extratropical define características singulares na cidade de São Paulo. O clima pode ser classificado em duas categorias: **1)** Período frio e seco (média: temperatura – 18 °C, umidade relativa – 80%, precipitação 70mm): ocorre entre abril e setembro, caracterizado por altas concentrações de poluentes primários devido a formações de alta pressão no Oceano Atlântico ao leste que se dirige para o norte, levando a ventos fracos, aumento de inversões térmicas e baixa umidade; e **2)** Período quente e úmido (média: temperatura – 21 °C, umidade relativa – 81%, precipitação 218mm): ocorre entre outubro e março, caracterizado por vento úmido do sul com ocorrência de sistemas frontais, levando a precipitações, temperaturas elevadas, alta umidade, aumento dos ventos, o que eleva a concentração dos poluentes secundários, principalmente o O₃.

Delimita-se a poluição do ar como uma mistura de compostos com composição variável, dependendo de sua localização. Para complicar nosso entendimento, as características regionais, a variabilidade climática e o tipo de combustível têm efeitos diretos sobre a composição das partículas.

As partículas são grosseiramente classificadas como primárias e secundárias. As primárias são emitidas diretamente por várias fontes, tais como indústria, incêndios florestais e motores automotivos. As secundárias são formadas na atmosfera como consequência de processos fotoquímicos. Note-se que a toxicidade relativa das partículas primárias e secundárias não é bem compreendida. Diversos estudos têm descrito que tanto as partículas primárias quanto as secundárias causam efeitos adversos sobre o sistema biológico (Saldiva et al. 2002; Goldleski et al. 2011; Diaz et al. 2012). Outros estudos têm sugerido as partículas secundárias como a principal fonte de pesquisa dos efeitos a saúde (Sexton et al. 2004; Papapostolou et al. 2011).

Como a poluição atmosférica é fortemente influenciada pelas condições meteorológicas que determinam as concentrações dos poluentes atmosféricos, a composição química e física, e a toxicidade no sistema biológico, o Concentrador de Partículas Ambientais (CPAs) é uma ferramenta que nos permite avaliar o perfil toxicológico das partículas geradas em diferentes períodos (frio/seco e quente/úmido).

O CPAs consiste de uma série de impactadores virtuais que concentram partículas ambientais sem alterar sua distribuição de tamanho e características físico-químicas (Savage et al. 2003). Resumidamente, nesse sistema, as partículas com diâmetro aerodinâmico inferior a 2,5 μm são aceleradas em um cilindro afunilado e concentradas por forças inerciais, enquanto são aspiradas por um fluxo de ar periférico. Possui estrutura montada para: **1)** captação externa do ar; **2)** concentração de MP do ar externo; **3)** ajuste fino da concentração das partículas, e **4)** manipulação dos animais e circulação de pesquisadores. Atualmente, o CPAs está localizado no pátio da Faculdade de

Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), na esquina da Avenida Doutor Arnaldo com a Rua Teodoro Sampaio, uma região com tráfego intenso de veículos automotores, além de ser um corredor de ônibus (Foto 1).

Foto 1: Vista superior do CPAs localizado no pátio da FMUSP

Modelos experimentais usando o CPAs fornecem informações relevantes sobre a toxicidade das partículas, por possibilitar a análise da variação sazonal. Recentemente, estudos conduzidos na Califórnia exibem associação entre o $MP_{2,5}$ gerando durante o inverno e efeitos sistêmicos e pró-coagulantes em camundongos (Tablin et al. 2012). Dada a sua complexidade climática, a cidade de São Paulo apresenta uma oportunidade para investigar a influência das condições climáticas sobre a toxicidade de partículas. Além do mais, poucos estudos têm mensurado os efeitos dessas partículas em regiões específicas (Maciejczyk et al. 2005; Tablin et al. 2012).

Diante do transcorrido até agora, este estudo teve a oportunidade de investigar as diferenças entre as partículas ambientais concentradas (PACs) geradas nos períodos frio/seco e quente/úmido na cidade de São Paulo sobre a toxicidade cardiopulmonar, dada a complexidade da ação das condições meteorológicas sobre as características físico-químicas das partículas.

1.4 Efeitos da poluição do ar sobre a toxicidade cardiopulmonar

Desde a década de 70, estudos desenvolvidos no Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LPAE) da FMUSP têm descrito os efeitos toxicológicos da poluição atmosférica, com ênfase no MP. Estudos experimentais têm demonstrado que o MP_{2,5} causa inflamação pulmonar (Saldiva et al. 2002), estresse oxidativo (Pereira et al. 2007; Riva et al. 2011), disfunção endotelial da artéria pulmonar (Davel et al. 2012), vasoconstrição das arteríolas pulmonares (Batalha et al. 2002; Matsumoto et al. 2010), alterações na mecânica pulmonar (Mazolli-Rocha et al. 2008) e redução da variabilidade da frequência cardíaca - VFC (Rivero et al. 2005; Maatz et al. 2009). Na mesma linha de pesquisa, tem-se observado que animais expostos à exaustão do diesel apresentaram inflamação pulmonar (Brito et al. 2010; Yoshizaki et al. 2010; Vieira et al. 2012), alterações na mecânica pulmonar (Zin et al. 2012) e aumento da VFC (Brito et al. 2010).

Os compostos adsorvidos no MP inalado possuem graus de volatilidade e solubilidade diferentes em meio líquido. Os compostos voláteis, hidrossolúveis, semi-polares e polares atingem os alvéolos e liberam substâncias

localmente, suscitando uma resposta inflamatória local, difundindo-se na corrente sanguínea e desencadeando uma resposta inflamatória sistêmica. Além do mais, quanto menor o tamanho aerodinâmico da partícula, maior a possibilidade de acesso dos seus compostos ao meio interno do organismo.

Os efeitos na saúde podem ser advindos da composição do MP, sendo que o diesel emite substancialmente mais HPA, e o biodiesel uma parcela significativa de c-HPA (Surawski et al. 2011; Jalava et al. 2012). Além disso, o biodiesel emite cerca de 70% a mais de partículas ultrafinas (< 100 nm) com componentes mais polares do que o diesel, potencialmente levando a maiores riscos à saúde (Fukagawa et al. 2013). Betha et al. (2013) referem-se à ausência de risco carcinogênico para os metais Al, Cr e Mn provenientes da exaustão do diesel; contudo, o risco carcinogênico foi notado tanto no diesel quanto no biodiesel para os metais As, Cd, Cr e Ni. Esses autores sugerem que o MP do biodiesel eleva o risco à saúde quando comparado ao MP do diesel.

As partículas da exaustão do éster etílico de soja (biodiesel) são tão tóxicas quanto as partículas da exaustão do diesel (Brito et al. 2010). Comparado ao diesel, o B20 causa inflamação pulmonar (Fukagawa et al. 2013), já o B50 e o B100 causam estresse oxidativo (Betha et al. 2013). Segundo, Tzamkioski et al. (2010), tanto o diesel quanto o biodiesel geram um infiltrado de polimorfonucleares. A adição do biodiesel ao diesel reduz as emissões de MP, mas não necessariamente os efeitos adversos à saúde, por promover alterações cardiovasculares, inflamação pulmonar e inflamação sistêmica (Brito et al. 2010; Jalava et al. 2012)

A despeito dos efeitos adversos no sistema biológico exibidos pelos diversos estudos, seu exato mecanismo não é totalmente estabelecido. Supõe-

se que tais efeitos sejam dependentes da composição química e do tamanho aerodinâmico das partículas. Dentre os possíveis mecanismos, destacam-se: estimulação do sistema nervoso autônomo, inflamação pulmonar, estresse oxidativo e inflamação sistêmica.

Sabe-se que o aumento de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ na concentração média diária do $\text{MP}_{2,5}$, eleva a mortalidade diária em 1,5% (Andrade et al. 2012). Nesse contexto, o biodiesel tem impacto direto na morbidade e mortalidade diárias, por reduzir as emissões do $\text{MP}_{2,5}$.

Mazzoli-Rocha et al. (2014) demonstraram que repetidas instilações intranasais de partículas urbanas em camundongos Balb/C causaram um aumento de colapso alveolar, broncoconstrição pulmonar e infiltrado de macrófagos no pulmão. Na mesma linha, Li-ren et al. (2010) exibiram inflamação pulmonar caracterizada pelo influxo de neutrófilos e macrófagos após 24 horas da instilação intratraqueal de $\text{MP}_{2,5}$ em ratos neonatos.

Fisiologicamente, a atividade elétrica do coração é controlada pelo sistema nervoso autonômico simpático e parassimpático, cujo desequilíbrio leva à instabilidade dos impulsos elétricos. Clinicamente, essa instabilidade é de extrema relevância, pois influencia a força de contração cardíaca, levando a estresse hemodinâmico, arritmias cardíacas e insuficiência cardíaca (Camm et al., 1996).

De acordo com a *Task Force of The European Society of Cardiology and The North American Society of Pacing and Electrophysiology* (1996) os registros da variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e da frequência cardíaca (FC) constituem-se num método eficaz e não invasivo de avaliação das flutuações do sistema nervoso simpático e parassimpático. A análise é realizada por duas medidas:

- Medidas do domínio de tempo: determinam a duração dos intervalos entre o complexo QRS, ou seja, despolarização sinusal, pelo intervalo da variação do intervalo RR, através dos parâmetros:
 - ✓ SDNN – desvio padrão dos intervalos RR normais;
 - ✓ RMSSD – raiz quadrada da soma das diferenças sucessivas entre intervalos RR normais adjacentes ao quadrado.

- Medidas do domínio de frequência: determinam o espectro dos intervalos RR, através da análise da frequência e amplitude da FC, através dos parâmetros:
 - ✓ AFreq – alta frequência, modulada pelo sistema nervoso autônomo parassimpático;
 - ✓ BFreq – baixa frequência, modulada pelo sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático;
 - ✓ BFreq/AFreq – proporção baixa frequência pela alta frequência, modulada pelo tônus simpático vagal.

Como o sistema nervoso é um importante regulador do sistema imunológico e da cascata de coagulação, alterações no mesmo podem ter implicações no sistema cardiovascular. Isso é interessante, porque estudos têm mostrado que a inflamação pulmonar associada à poluição do ar (Dubowsky et al., 2006) e à exaustão do diesel (Brito et al., 2010) causa um desequilíbrio no sistema nervoso autônomo, ativando o sistema nervoso simpático, o qual altera o padrão respiratório, a FC e a VFC. A redução da VFC tem sido descrita como fator de risco para morte súbita, arritmias, taquicardia ventricular, angina, infarto agudo do miocárdio e insuficiência cardíaca congestiva (Tsuji et al., 1996; Adar et al., 2007).

Além disso, as partículas inaladas podem afetar o sistema cardiovascular através de mediadores inflamatórios produzidos nos pulmões e liberados na circulação sanguínea. Assim, o hemograma tem como objetivo avaliar a série vermelha e a série branca sanguínea, pois alterações nas plaquetas, nos leucócitos e no hematócrito são de grande relevância clínica, por serem indicativos de aumento da viscosidade sanguínea, além de agravar doenças cardiovasculares pré-existentes.

Alguns estudos suportam a hipótese de que na inalação de partículas finas e ultrafinas estas se depositam diretamente nos pulmões (Li et al. 2003; Xia et al. 2004), estimulando as células do epitélio brônquico a liberarem citocinas inflamatórias (Ruckerl et al. 2007; Madrigano et al. 2010); elevam os níveis de ICAM-1 e VCAM na mucosa brônquica (Stenfors et al. 2004) e no tecido brônquico (Salvi et al. 1999), além de estimularem a medula óssea a amplificar a resposta monocitária (Goto et al. 2004). Nota que a difusão de células inflamatórias do sangue para o tecido ocorre de forma regulada pelas moléculas de adesão nas células endoteliais e seus respectivos ligantes sobre os leucócitos, juntamente com a liberação de agentes quimioatrativos através das células epiteliais e inflamatórias (Salvi et al. 1999).

O MP estimula os macrófagos alveolares a produzirem citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina-8 (IL-8), que é um importante mediador quimioatrativo para os neutrófilos (Standiford et al. 1993; Strieter 2002). Wu et al. (2012) têm descrito que os componentes solúveis do diesel elevam a expressão da IL-8 em células epiteliais brônquicas.

Os poluentes atmosféricos comprometem a função endotelial vascular (Kunuckles et al. 2008), alteram o tônus vasomotor e induzem a

inflamação sistêmica (Galis et al. 2002). Dentre os fatores vasculares avaliados no sistema pulmonar, inclui-se a endotelina-1 (ET-1), um peptídeo secretado constitutivamente pelas células endoteliais, que amplifica a resposta inflamatória aguda pela indução do influxo de neutrófilos nos pulmões e tem um papel-chave na lesão isquêmica por ser um potente vasoconstritor (Bhavsar et al. 2008). A ET-1 age via receptores da endotelina A (ET-Ar) e da endotelina-B (ET-Br) na vasculatura, processo em que a ET-Ar medeia a vasoconstrição e a ET-Br a vasodilatação. Esse peptídeo aumenta a atividade das metaloproteínases em patologias cardiovasculares, tais como a aterosclerose (Ergul et al. 2003; Spiers et al. 2005; Lund et al. 2009).

O óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador, é outra importante molécula de sinalização celular envolvida em muitos processos fisiológicos e patológicos, sendo que a sua redução pode levar à disfunção endotelial e aumentar a susceptibilidade do indivíduo em desenvolver hipertensão pulmonar, doença cardíaca congestiva e aterosclerose (Tamagawa et al. 2008).

Diante do que foi exposto acima, este estudo tem como foco avaliar o perfil toxicológico dos poluentes primários (emitidos diretamente da fonte) e secundários (gerados a partir das condições atmosféricas) por meio de dois estudos:

Estudo I: Efeito cardiopulmonar agudo induzido pela inalação da exaustão do diesel e biodiesel

Estudo II: Efeito cardiopulmonar agudo induzido pela inalação de partículas ambientais concentradas (PACs) durante a variação sazonal na cidade de São Paulo.

2 OBJETIVOS

➤ **Estudo I** – Analisar os efeitos agudos da exposição aos gases e partículas da exaustão dos combustíveis diesel e biodiesel, sobre:

- O registro da frequência cardíaca, variabilidade da frequência cardíaca e pressão arterial;
- A resposta sistêmica, através dos marcadores hematológicos (hemograma e reticulócitos) e medular;
- A inflamação pulmonar através da contagem de células inflamatórias no lavado broncoalveolar e no parênquima pulmonar;
- Os marcadores endoteliais nos vasos peribronquiolares e nos epitélios brônquicos: ET-Ar, ET-Br, INOs, ISO, VCAM-1 e IL-8.

➤ **Estudo II** – Analisar os efeitos da inalação aguda das partículas ambientais concentradas (PACs) geradas em dois períodos (frico/seco e quente/úmido) na cidade de São Paulo, sobre:

- O registro da frequência cardíaca, variabilidade da frequência cardíaca e pressão arterial;
- A responsividade pulmonar;
- A inflamação pulmonar através da contagem de células inflamatórias no parênquima pulmonar;
- A resposta sistêmica, através dos marcadores hematológicos (hemograma e reticulócitos);
- Os marcadores endoteliais nos vasos peribronquiolares: ET-Ar, ET-Br e VCAM-1.

Efeito cardiopulmonar agudo induzido pela inalação da exaustão do diesel e biodiesel

3.1 Materiais e métodos

Toda a parte experimental deste trabalho foi realizada no laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LPAE) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da FMUSP (**APÊNDICE 1**).

Todos os animais receberam cuidados de acordo como o “Guia de cuidados e uso de animais de laboratório” publicado pelo centro de pesquisa *National Institutes of Health* (NIH publication 85-23, revisado em 1985) e todos os experimentos foram realizados com anestesia geral.

3.1.1 Combustíveis

Os combustíveis utilizados foram: óleo diesel metropolitano (50 ppm de enxofre acrescido de 5% biodiesel); biodiesel (óleo vegetal de éster etílico de esgoto) na proporção de 100% (B100).

3.1.2 Gerador de gases e partículas finas dos combustíveis diesel e biodiesel

Os gases resultantes do processo de queima ocorrido no gerador portátil estacionário de energia a diesel (BD-2500 CFE, Branco, China) foram conduzidos por um breve período de tempo de 6 minutos até um saco (BAG), para armazenamento das partículas e gases. Em seguida, com o objetivo de diluir os gases, foi injetado no BAG ar limpo por 3 minutos. Com esse material já diluído, os gases e partículas foram direcionados para a câmara de inalação, onde os camundongos Balb/C estavam acomodados de maneira a procedermos à exposição aguda via inalação do material oriundo da queima do combustível em estudo. Durante todo o período de exposição (120 minutos) dos camundongos Balb/C na câmara de inalação, alguns parâmetros foram monitorados em tempo real: concentração de $MP_{2,5}$ (DataRam4™, Thermo Fisher Scientific Inc.), emissões de NO_x , NO_2 , NO (Thermo Scientific) e a pressão dentro da câmara (Figura 15).

Para expor os animais ao ar filtrado (AF), uma bomba a vácuo foi responsável por captar o ar externo e direcioná-lo ao sistema de filtração HEPA. Em seguida, o AF foi direcionado à câmara de exposição. Durante a exposição dos camundongos Balb/C ao AF, a válvula de abertura dos gases e partículas provenientes da queima do combustível em estudo foi fechada. Após atravessar a câmara, os gases foram conduzidos para fora do equipamento.

Figura 15. Sistema de exposição ao ar filtrado (AF) e à exaustão dos combustíveis diesel e biodiesel. $MP_{2,5}$: material particulado com diâmetro $\leq 2,5 \mu m$; NO: óxido nítrico; NO₂: dióxido de nitrogênio; lpm: litros por minuto; PI: pressão interna

3.1.3 Delineamento experimental

Foram expostos na câmara de inalação do gerador de partículas ao ar filtrado (AF) e a duas concentrações de $MP_{2,5}$ (600 e 1200 $\mu g/m^3$), tanto da exaustão do combustível diesel (D) quanto da do biodiesel (BD), um total de 60 camundongos Balb/C, machos, com idade entre 6 e 8 semanas, pesando entre 20 e 30 gramas, obtidos do Biotério Central da FMUSP.

Os animais foram mantidos no biotério de manutenção do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental – LIM 05 em temperatura e umidade relativa do ar controlada, com ciclos alternados em ambiente escuro (12 horas) e claro (12 horas) e alimentados com ração e água *ad libitum*.

Cinco grupos de 12 animais foram formados e divididos da seguinte maneira:

- ➔ **Grupo AF** ➔ controle, exposto ao ar filtrado;
- ➔ **Grupo BD600** ➔ exposto à exaustão do éster etílico de esgoto (biodiesel) na concentração de $600 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$;
- ➔ **Grupo BD1200** ➔ exposto à exaustão do éster etílico de esgoto (biodiesel) na concentração de $1.200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$;
- ➔ **Grupo D600** ➔ exposto à exaustão do diesel na concentração de $600 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$;
- ➔ **Grupo D1200** ➔ exposto à exaustão do diesel na concentração de $1.200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$.

3.1.4 Registro da frequência cardíaca (FC), variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e pressão arterial (PA)

Após 30 minutos de exposição, os animais foram anestesiados via inalatória com Isoflurano (2%) misturado ao O_2 (2L/min), e um *cuff* específico para camundongos foi ajustado na base da cauda do animal. Foi utilizado um sistema digital de aquisição de dados da marca Powerlab (*ADInstruments*) para o registro da frequência cardíaca (FC), variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e pressão arterial (PA). Os parâmetros registrados pela VFC foram: desvio-padrão da média de todos os intervalos RR normais (SDNN), desvio-padrão das diferenças entre intervalos RR normais adjacentes (RMSSD), baixa frequência (BFreq), alta frequência (AFreq), bem como relação entre baixa frequência e alta frequência (BFreq/AFreq).

3.1.5 Coleta e análise laboratorial dos parâmetros hematológicos

Após 24 horas, os camundongos Balb/C foram anestesiados via intraperitoneal com Rompum® (Xilasina, 15mg/kg de peso) e Ketamina-S(+)® (Cloridrato de Ketamina, 75mg/kg de peso). Em seguida, foi realizada a coleta de sangue via punção cardíaca. O sangue foi acondicionado em frascos contendo EDTA K2 para análise do hemograma e contagem de reticulócitos. O material coletado foi encaminhado ao Serviço de Hematologia do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para análise.

3.1.6 Coleta e análise do lavado broncoalveolar (LBA)

Após a coleta do sangue, procedemos à eutanásia dos camundongos via secção total da aorta abdominal. Para a realização do lavado broncoalveolar (LBA) foi realizada uma traqueostomia. Cerca de 0,5 mL de tampão fosfato-salina (PBS) foi infundido na traqueia, por meio de uma cânula traqueal, por 3 vezes consecutivas, totalizando um volume de 1,5 mL. O volume recuperado foi acondicionado em tubos tipo *ependorf* e centrifugado a 1210 rpm por 10 minutos a 5°C (Centrífuga GS-6R, Beckman).

Para a contagem total de células, o “*pellet*” foi ressuspendido em volume de 600 µL de PBS e homogenizado. A seguir, 10 µL foram acondicionados na câmara de Neubauer para a contagem total das células, e 200 µL foram adicionados em centrífuga cytopspin (Cytospin 3 – Shandon) e citocentrifugados a 450 rpm por 6 minutos para contagem diferencial das células inflamatórias: macrófagos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos. O material depositado na

lâmina do cytopspin foi corado com Diff Quick (Baxter Dade, Dudingen, Suíça) e a análise foi realizada em microscópio óptico com aumento de 1000 x.

3.1.7 Coleta e análise da medula óssea

A medula óssea foi coletada do fêmur dos animais por transecção das epífises do osso para permitir a exposição da medula. Em seguida, a medula óssea foi aspirada com auxílio de seringa e agulha. O material foi acondicionado em tubo tipo *ependorf* e centrifugado a 1210 rpm por 10 minutos a 5°C (Centrífuga GS-6R, Beckman).

O “*pellet*” foi ressuspensionado em volume de 1mL de PBS e homogenizado. Em seguida, 200 µL desse material foram adicionados em centrífuga cytopspin (Cytospin 3 – Shandon) e citocentrifugados a 450 rpm por 6 minutos. O material depositado na lâmina do cytopspin foi corado com Diff Quick (Baxter Dade, Dudingen, Suíça) para contagem diferencial em microscópio óptico com aumento de 1000x. Foram avaliadas 100 células por lâmina, sendo classificadas em: mielócito, metamielócito, plasmócito, monócito, bastonete, segmentado, eosinófilo, linfócito, macrófago e série vermelha.

3.1.8 Análise da densidade numérica de neutrófilos e macrófagos no pulmão

O pulmão de cada animal foi fixado com solução de formalina tamponada a 10%. Após 48 horas, cortes sagitais dos pulmões foram realizados e processados em blocos de parafina. Cortes finos de 5 µm de espessura foram preparados e corados com hematoxilina-eosina (HE).

A determinação da densidade numérica de neutrófilos e macrófagos no parênquima pulmonar foi realizada por morfometria convencional, utilizando-se um retículo de 100 pontos (área 67.500 μm^2) acoplado a uma ocular do microscópio. A contagem foi determinada a partir do número de células que incidiam sobre o campo de análise, corrigido pelo número de pontos que incidiam no parênquima pulmonar. Foram analisados 20 campos do parênquima pulmonar para cada animal com o aumento de 1000 x. O resultado foi expresso como $\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$ de tecido.

3.1.9 Análise imunohistoquímica e morfométrica pulmonar

As expressões do receptor de Endotelina-A (ET-Ar), receptor de Endotelina-B (ET-Br), óxido nítrico sintase (INOs), isoprostano (ISO), da molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1) e da interleucina-8 (IL-8) foram analisadas nos vasos peribronquiolares e no epitélio brônquico por marcação imunohistoquímica.

As expressões das proteínas imunomarcadas foram quantificadas utilizando o software Image-Pro Plus 4.1 para Windows (Media Cybernetic, Silver Spring, Md) adaptado a um computador e conectado a uma câmera digital (Olympus Q-color 5, Tokyo, Japan) e a um microscópio óptico (Leica, DMR, Germany). As áreas imunomarcadas foram determinadas em 5 vasos peribronquiolares e em 5 epitélios brônquicos, por animal, com um aumento de 200 x. Os resultados foram expressos em área imunomarcada pela área da parede ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) (Dolhnikoff et al. 2009; Carvalho et al. 2011).

3.1.10 Análise estatística

A avaliação da normalidade dos dados foi realizada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Foram realizadas análises descritivas para todas as variáveis avaliadas nesse estudo. Os valores foram expressos em média e desvio-padrão (dados paramétricos) ou mediana e intervalo interquartil (dados não paramétricos). A comparação dos efeitos para os dados com distribuição normal foi realizada pela análise de variância (ANOVA), e para os dados sem distribuição normal foi adotado o Teste de Amostras Independentes de Mann-Whitney U. Quando demonstrada diferença, o teste de Tukey foi adotado para identificar os grupos divergentes. O pacote estatístico utilizado foi o SPSS versão 21; SPSS Inc.®, Chicago, IL. O nível estatístico de significância adotado foi de 5%.

3.2 Resultados

3.2.1 Propriedades físico-química dos combustíveis diesel e biodiesel

As Tabelas 1 e 2 descrevem as propriedades físico-químicas dos combustíveis diesel e biodiesel de esgoto fornecidos pelo Laboratório de Combustíveis e Lubrificantes.

Tabela 1. Propriedades físicas do óleo diesel

Determinações	Resultados	Especificação ANP*	Métodos
Cor ATSM, Max	Vermelho	Max. 3,0(1)	ABNT NBR 14483
Cor ATSM, Max	Vermelho	(2)	Visual
Aspecto	TII	LII(3)	ABNT NBR 14954
Teor de enxofre (mg/kg)	43	S10 - 10 máx.	ASTM D1552
		S500 - 500 máx.	
		S1800 - 1800 máx.	
Destilação 10% vol. Recuperado (°C)	195	S10 - 180,0 - min	ABNT NBR 9619
		S500 - anotar.	
		S1800 - anotar.	
Destilação 50% vol. Recuperado (°C)	287,5	S10 - 245 a 295	ABNT NBR 9619
		S500 - 245 a 310	
		S1800 - 245 a 310	
Destilação 85% vol. Recuperado (°C)	347,5	S500 - 360 máx	ABNT NBR 9619
		S1800 - 370 máx	
Destilação 90% vol. Recuperado (°C)	362,5	S500 - anotar	ABNT NBR 9619
		S1800 - anotar	
Massa específica a 20°C (kg/m ³)	853,6	S10 - 820 a 850	ABNT NBR 14065
		S500 - 820 a 865	
		S1800 - 820 a 880	
Massa específica a 15°C (g/ml)	0,8572	-----	ABNT NBR 14065
Ponto de fulgor Pensky-Martens (°C)	42	38 min.	ABNT NBR 14598
Viscosidade cinemática a 40°C (mm ² /s)	3,313	S10 - 2 a 4,5	ABNT NBR 10441
		S500 - 2 a 5	
		S1800 - 2 a 5	
Ponto de entupimento de filtro a frio (°C)	-3	(4)	ASTM D 6371
Índice de cetano calculado	45,9	S10 - 48	ABNT NBR 14759
		S500 e S1800 - 42	
Resíduo de carbono Ramsbottom nos 10% finais da destilação (%m/m)	0,10	0,25 máx.	ABNT NBR 14318
Teor de cinzas (%m/m)	0,002	0,010 máx.	ABNT NBR 9852
Corrosividade ao cobre (3 horas 50°C)	1a	1 máx.	ABNT NBR 14359
Teor de água e sedimentos (%vol./vol.)	0,06	0,05 máx.	ASTM D 2709
Teor de água Karl-Fischer (mg/kg)	1,629	S10 - 200 máx.	ASTM D 6304
Contaminação total (mg/kg)	45,2	S10 - 24 máx.	EN 12662
Índice de neutralização (mg KOH/g)	0,13	S10 - anotar	ABNT NBR 14248
Lubricidade (micron)	207	520 Max	ASTM D 6079
Teor de biodiesel (%vol./vol.)	(5)	5±0,5	EN 14078

Resolução ANP nº 65, de 09/12/2011 – DOU 12/12/2011. Estabelece as especificações do óleo diesel de uso rodoviário, consoante às disposições contidas no Regulamento Técnico ANP nº 08/2011 e às obrigações quanto ao controle da qualidade a serem atendidas pelos diversos agentes econômicos que comercializam o produto em todo o território nacional. FONTE: ANP, 2011.

Tabela 2. Propriedades físicas do óleo vegetal éster etílico de esgoto (biodiesel)

Determinações	Resultados	Especificação ANP*	Métodos
Aspecto	LII	LII (1)	Visual
Massa específica a 20°C (kg/m ³)	880,4	850 a 900	ABNT NBR 14065
Viscosidade cinemática a 40°C (mm ² /s)	4,941	3 a 6	ABNT NBR 10441
Teor de água Karl-Fischer (mg/kg)	1.278	máx. 380	ASTM D 6304
Contaminação total (mg/kg)	59	máx. 24	EN ISO 12662
Ponto de fulgor Pensky-Martens (°C)	144,5	mín. 100	ABNT NBR 14598
Teor de éster (%m/m)	89,4	96,5 mín	EN 14103
Resíduo de carbono (micro método) (%m/m)	0,076	máx. 0,05	ASTM D 4530
Teor de cinzas sulfatadas (%m/m)	0,004	máx. 0,02	ABNT NBR 6294
Teor de enxofre total (mg/kg)	118,5	máx. 10	ASTM D 1552
Sódio + Potássio	2,86	máx. 5	ABNT NBR 1553
Cálcio + Magnésio (mg/kg)	<2	máx. 5	ABNT NBR 1553
Teor de fósforo (mg/kg)	<1	máx. 10	ABNT NBR 1553
Corrosividade ao cobre (3 horas a 50°C)	1A	1	ABNT NBR 14359
Ponto de entupimento de filtro a frio (°C)	2	(2)	ABNT NBR 14747
Índice de acidez (mgKOH/g)	1,28	máx. 0,5	EN 14104
Glicerina livre (%m/m)	0,00	máx. 0,02	ASTM D 6584
Glicerina total (%m/m)	0,06	máx. 0,25	ASTM D 6584
Teor de álcool (%m/m)	(3)	máx. 0,2	EN 14110
Monoglicerídeos (%m/m)	0,09	máx. 0,8	ASTM D 6584
Diglicerídeos (%m/m)	0,19	máx. 0,2	ASTM D 6584
Triglicerídeos (%m/m)	0	máx. 0,2	ASTM D 6584
Índice de iodo (g/100g)	74	anotar	EN 14111
Estabilidade a oxidação a 110°C (h)	0,18	mín. 6	EN 14112

Resolução ANP nº 14, de 11/05/2012 – DOU 18/05/2012. Estabelece a especificação do biodiesel contida no Regulamento Técnico ANP nº 4/2012 e as obrigações quanto ao controle da qualidade a serem atendidas pelos diversos agentes econômicos que comercializam o produto em todo o território nacional. Fonte: ANP, 2012. (1) ILL – límpido e isento de impurezas; (2) Para SP, MG e MS – Máx: 8°C. Para GO/DF, MT, ES e RJ – Máx 10°C; (3) Não realizado, pois o ponto de fulgor se apresentou maior que 130°C

3.2.2 Parâmetros monitorados em tempo real

A Tabela 3 descreve os valores da concentração dos poluentes ($MP_{2,5}$, NO_2 , NO , NO_x), monitorados em tempo real, durante as exposições dos animais à exaustão dos combustíveis diesel e biodiesel e ao AF. A concentração média de $MP_{2,5}$ foi de 600 e de 1200 $\mu g/m^3$ para os grupos expostos à exaustão de diesel e biodiesel, o equivalente a uma concentração média diária de 25 e 50 $\mu g/m^3$, respectivamente. Note-se que a exaustão do biodiesel emite maiores concentrações de NO_2 , NO e NO_x quando comparada à exaustão do diesel. Os padrões de temperatura, umidade e ruído estão de acordo com as normas de cuidados para roedores (ILAR, 2003).

Tabela 3. Valores descritivos dos parâmetros mensurados em tempo real (MP_{2,5}, NO₂, NO, NO_x, temperatura e umidade) de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). Os valores estão apresentados como valores médios, mínimos e máximos

Parâmetros	AF			BD600			D600			BD1200			D1200		
	Média	Min	Max	Média	Min	Max	Média	Min	Max	Média	Min	Max	Média	Min	Max
MP _{2,5} (µg/m ³)	ALD	ALD	ALD	579	0	692	594	0	662	1139	0	1286	1222	0	2074
NO ₂ (µg/m ³)	ALD	ALD	ALD	118	78	152	31	2	54	144	91	178	97	12	462
NO (µg/m ³)	4	3	5	89	36	151	20	11	94	92	61	136	91	18	220
NO _x (µg/m ³)	4	3	5	207	117	270	51	31	97	236	188	307	188	30	682
Temperatura (°C)	25	24	27	26	26	27	28	28	29	25	24	26	27	27	27
Umidade (%)	69	66	71	64	62	69	75	72	77	73	66	78	66	64	70

ALD: abaixo do limite detectável

AF: ar filtrado

BD600: biodiesel na concentração média de 600 µg/m³

D600: diesel na concentração média de 600 µg/m³

BD1200: biodiesel na concentração média de 1200 µg/m³

D1200: diesel na concentração média de 1200 µg/m³

3.2.3 Análise da frequência cardíaca (FC), variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e pressão arterial (PA)

Na Tabela 4 estão apresentados os resultados referentes à análise da FC, VFC e PA dos animais expostos ao AF e à inalação aguda da exaustão dos diferentes combustíveis (diesel e biodiesel).

Na VFC, verificou-se o aumento nos seguintes parâmetros: **(1)** SDNN no BD600 comparado ao AF e BD1200 ($p=0,022$, $p=0,015$, respectivamente); D1200 comparado ao AF e BD1200 ($p=0,032$, $p=0,022$, respectivamente); **(2)** RMSSD no BD600 ($p=0,046$) comparado ao AF e BD1200; D600 comparado ao AF ($p=0,013$); **(3)** BFreq no BD600 ($p=0,017$), D600 ($p=0,013$) e D1200 ($p=0,019$) comparado ao AF; BD600 ($p=0,029$) e D1200 ($p=0,032$) comparado ao BD1200; **(4)** AFreq no BD600 ($p=0,043$) e D600 ($p=0,035$) comparado ao AF. Em contrapartida, a PA reduziu-se no D1200 comparado ao AF e BD1200 ($p=0,049$, $p=0,045$, respectivamente) (Figura 16).

Tabela 4. Valores descritivos da VFC, FC e PA de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). Os valores estão apresentados como média e desvio-padrão

Parâmetros		AF (n=6)	BD600 (n=6)	D600 (n=6)	BD1200 (n=6)	D1200 (n=6)
		Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
1-	SDNN (ms ²)	17,31 ± 3,72	28,96 ± 8,47	30,18 ± 13,32	16,54 ± 6,97	28,59 ± 9,00
2-	RMSSD (ms ²)	14,65 ± 8,27	36,98 ± 14,44	36,77 ± 19,12	19,66 ± 10,46	26,21 ± 9,11
3-	BFreq (ms)	5,28 ± 3,16	30,50 ± 22,92	43,99 ± 26,45	7,40 ± 6,48	29,38 ± 22,12
4-	AFreq (ms)	2,62 ± 2,35	26,95 ± 20,55	29,46 ± 20,18	12,94 ± 17,76	12,41 ± 9,29
5-	BFreq/AFreq	3,80 ± 4,09	1,39 ± 0,57	1,69 ± 0,62	1,47 ± 0,41	2,54 ± 1,15
6-	FC (bpm)	381,43 ± 39,93	364,93 ± 64,69	367,63 ± 45,33	349,61 ± 23,93	392,90 ± 46,84
7-	PA (mmHg)	122,91 ± 16,57	108,67 ± 26,00	104,14 ± 16,80	123,21 ± 17,60	100,66 ± 8,27

AF ≠ BD600 [(1 (p=0,022), 2 (p=0,046), 3 (p=0,017), 4 (p=0,043)]

AF ≠ D600 [2 (p=0,048), 3 (p=0,013), 4 (p=0,035)]

AF ≠ D1200 [1 (p=0,032), 3 (p=0,019), 7 (p=0,049)]

BD1200 ≠ BD600 [(1 (p=0,015), 2 (p=0,046), 3 (p=0,029)]; **BD1200 ≠ D1200** [(1 (p=0,022), 3 (p=0,032), 7 (p=0,045)]

Figura 16. Média ($\pm$ EP) da VFC, FC e PA de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). **A.** SDNN, **B.** RMSSD, **C.** BFreq, **D.** AFreq, **E.** BFreq/AFreq, **F.** PA

3.2.4 Análise dos parâmetros hematológicos

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados referentes à análise do hemograma dos animais submetidos à inalação aguda ao AF e à queima dos diferentes combustíveis (diesel e biodiesel).

No hemograma, houve aumento nos seguintes parâmetros: **(1)** eritrócitos no BD600 ($p=0,044$), D600 ($p=0,008$), BD1200 ($p=0,001$) e D1200 ($p=0,013$) comparado ao AF; BD1200 comparado ao BD600 ($p=0,044$); **(2)** hemoglobina no BD1200 comparado ao AF ($p=0,025$); **(3)** hematócrito no BD1200 ($p=0,001$) e D1200 ($p=0,045$) comparado ao AF; BD1200 comparado ao BD600 ($p=0,023$); **(4)** RDW-SD no D600 ($p=0,043$), BD1200 ($p=0,010$) e D1200 ($p=0,045$) comparado ao AF; BD1200 comparado ao BD600 ($p=0,013$); **(5)** Leucócitos no BD600 comparado ao BD1200 ($p=0,002$); **(6)** Linfócitos no D600 comparado ao AF ($p=0,045$); **(7)** Reticulócitos no BD1200 ($p=0,011$) e D1200 ($p=0,005$) comparado ao AF; D600 ($p=0,0011$) e BD1200 ($p=0,001$) comparado ao BD600.

Contudo, houve redução dos seguintes parâmetros: **(1)** CHCM no BD1200 ($p=0,013$) e D1200 ($p=0,045$) comparado ao AF; BD1200 comparado ao BD600 ($p=0,034$); **(2)** Linfócitos no BD1200 comparado ao BD600 e D1200 ($p=0,002$, $p=0,005$, respectivamente) (Figura 17).

Tabela 5. Valores descritivos dos parâmetros hematológicos de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). Os valores estão apresentados como média e desvio-padrão

Parâmetros	AF (n=10)	BD600 (n=12)	D600 (n=11)	BD1200 (n=11)	D1200 (n=10)
	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP	Média ± DP
1- Eritrócitos (mil/mm ³)	9,60 ± 0,51	10,10 ± 0,52	10,26 ± 0,33	10,81 ± 0,91	10,14 ± 0,33
2- Hemoglobina (g/dL)	14,48 ± 0,87	14,81 ± 0,92	14,76 ± 0,77	15,60 ± 1,06	15,04 ± 0,80
3- Hematócrito (%)	45,03 ± 2,79	46,38 ± 3,84	46,44 ± 2,84	50,52 ± 3,74	48,10 ± 2,50
4- VCM (fL)	46,96 ± 2,85	45,90 ± 2,41	45,32 ± 3,08	46,88 ± 3,71	47,45 ± 2,37
5- HCM (pg)	15,08 ± 0,57	14,66 ± 0,55	14,41 ± 0,84	14,46 ± 0,77	14,83 ± 0,70
6- CHCM (d/dL)	32,16 ± 0,86	31,98 ± 0,79	31,83 ± 0,57	30,91 ± 1,21	31,27 ± 0,59
7- RDW-CV (%)	21,49 ± 1,36	22,53 ± 1,62	23,44 ± 2,22	23,55 ± 2,67	22,63 ± 1,73
8- RDW-SD (fL)	30,13 ± 2,09	30,68 ± 1,45	32,29 ± 2,16	32,95 ± 1,81	32,42 ± 2,20
9- Leucócitos (mil/mm ³)	5,16 ± 1,99	6,32 ± 2,39	6,72 ± 1,73	3,34 ± 0,95	5,90 ± 1,94
10- Neutrófilos (mil/mm ³)	0,93 ± 0,56	0,87 ± 0,46	1,09 ± 0,64	0,70 ± 0,40	1,02 ± 0,42
11- Linfócitos (mil/mm ³)	3,63 ± 1,69	5,27 ± 2,21	5,45 ± 1,60	2,53 ± 0,95	4,71 ± 1,66
12- Monócitos (mil/mm ³)	0,20 ± 0,12	0,18 ± 0,12	0,19 ± 0,10	0,12 ± 0,08	0,19 ± 0,11
13- Plaquetas (mil/mm ³)	677,50 ± 433,81	810,33 ± 268,16	654,45 ± 411,56	828,91 ± 209,61	658,70 ± 370,68
14- Reticulócitos (%)	3,66 ± 0,74	3,11 ± 0,81	4,22 ± 0,98	4,74 ± 0,58	4,86 ± 0,99

AF ≠ BD600 [(1 (p=0,044)]

AF ≠ D600 [1 (p=0,008), 8 (p=0,043), 11 (p=0,045)]

AF ≠ BD1200 [1, 3 (p=0,001), 2 (p=0,025), 6 (p=0,013), 8 (p=0,010), 14 (p=0,011)]

AF ≠ D1200 [1 (p=0,013), 3, 8 (p=0,045), 6 (p=0,018), 14 (p=0,005)]

BD600 ≠ D600 [(14 (p=0,011)]

BD1200 ≠ D1200 [(11 (p=0,005)]

BD1200 ≠ BD600 [(1 (p=0,044), 3 (p=0,023), 6 (p=0,034), 8 (p=0,013), 9, 11 (p=0,002), 14 (p=0,001)]

Figura 17. Média ($\pm$ EP) dos parâmetros hematológicos de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). **A.** Eritrôcitos, **B.** Hemoglobina, **C.** Hematócrito, **D.** CHCM, **E.** RDW-SD, **F.** Leucócitos, **G.** Linfócitos, **H.** Reticulócitos

3.2.5 Análise dos parâmetros da medula óssea

A Tabela 6 descreve os resultados do mielograma dos animais submetidos à inalação aguda ao AF e à queima dos diferentes combustíveis (diesel e biodiesel). Nota-se o aumento nos seguintes parâmetros: (1) mielócito no BD1200 comparado ao D1200 ($p=0,015$); (2) bastonete no D1200 ($p=0,001$) comparado ao AF, BD1200 e D600; (3) eosinófilo no BD600 comparado ao AF ($p=0,038$); (4) linfócito no D600 comparado ao D1200 ($p=0,006$). Contudo houve redução dos seguintes parâmetros: (1) metamielo no D600 comparado ao AF e BD600 ($p=0,012$, $p=0,004$ respectivamente); (2) plasmócito no D1200 comparado ao AF, BD1200 e D600 ($p=0,007$, $p=0,004$, $p=0,010$ respectivamente) (Figura 18).

Tabela 6. Valores descritivos dos parâmetros do mielograma de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). Os valores estão apresentados como média e desvio padrão

Parâmetros	AF (n=10)			BD600 (n=12)			D600 (n=9)			BD1200 (n=12)			D1200 (n=8)		
	Média	±	DP	Média	±	DP	Média	±	DP	Média	±	DP	Média	±	DP
1- Mielócito	1,6	±	0,5	1,7	±	0,5	1,4	±	0,5	2,1	±	0,5	1,4	±	0,5
2- Metamielo	3,9	±	1,0	4,0	±	0,9	2,7	±	0,7	3,3	±	1,1	3,6	±	0,9
3- Bastonete	10,6	±	2,3	10,2	±	1,6	10,4	±	2,2	10,1	±	2,2	16,5	±	3,3
4- Segmentado	32,5	±	6,8	31,4	±	8,5	30,3	±	3,3	33,0	±	5,9	34,1	±	4,5
5- Eosinófilo	2,0	±	0,9	4,0	±	1,5	2,4	±	1,3	2,6	±	2,3	3,7	±	1,6
6- Linfócito	30,2	±	5,8	32,3	±	8,1	34,4	±	6,5	28,9	±	4,6	23,5	±	7,7
7- Monócito	3,8	±	4,3	2,3	±	0,5	2,7	±	0,9	2,3	±	0,5	2,4	±	0,7
8- Plasmócito	3,6	±	1,1	3,3	±	1,0	3,8	±	0,8	3,7	±	0,5	2,1	±	1,2
9- Série vermelha	12,2	±	2,5	11,3	±	5,2	12,3	±	5,2	14,7	±	3,7	13,0	±	3,5

AF ≠ BD600 [9 (p=0,009)]

AF ≠ D600 [2 (p=0,012)]

AF ≠ D1200 [3 (p=0,001); 5 (p=0,046); 8 (p=0,007)]

BD600 ≠ D600 [2 (p=0,004)]

D600 ≠ D1200 [3 (p=0,001); 6 (p=0,006); 8 (p=0,010)]

BD1200 ≠ D1200 [1 (p=0,015); 3 (p=0,001); 8 (p=0,004)]

Figura 18. Média ($\pm$ EP) dos parâmetros do mielograma de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). **A.** Mielócito, **B.** Metamielo, **C.** Bastonete, **D.** Segmentado, **E.** Eosinófilo, **F.** Linfócito, **G.** Plasmócito, **H.** Série vermelha

3.2.6 Análise dos parâmetros inflamatórios pulmonares por lavado broncoalveolar (LBA) e histologia pulmonar

Na Tabela 7 estão apresentados os valores referentes aos resultados da análise inflamatória no LBA de animais submetidos à inalação aguda da exaustão do diesel e biodiesel. Nota-se aumento dos seguintes parâmetros: células totais ($p=0,001$) e macrófagos ($p=0,045$) no grupo D1200 quando comparados aos grupos AF e D600; e neutrófilos nos grupos BD600 ($p=0,043$) e BD1200 ($p=0,006$), comparados ao grupo AF (Figura 19).

Figura 19. Mediana (IQR:25-75%) do LBA de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). **A.** Células totais, **B.** Macrófagos, **C.** Neutrófilos

No parênquima pulmonar foram evidenciados aumento dos seguintes parâmetros: densidade numérica de polimorfonucleares (PMN) no grupo BD600 ($p=0,001$) quando comparado aos grupos AF, D600, BD1200 e D1200; densidade numérica de mononucleares (MNN) no grupo BD600 quando comparado aos grupos AF e BD1200 ($p=0,024$, $p=0,009$ respectivamente), e de MNN no grupo D600 ($p=0,001$) comparado ao grupo D1200 (Tabela 8, Figura 20).

Figura 20. Mediana (IQR:25-75%) da densidade numérica de células inflamatórias no parênquima pulmonar de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). **A.** PMN, **B.** MNN

Tabela 7. Valores descritivos dos parâmetros inflamatórios do LBA de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). Os valores estão apresentados como mediana e intervalo interquartil

Parâmetros (x 10 ⁴ celulas/mL)	AF (n=11)		BD600 (n=12)		D600 (n=10)		BD1200 (n=11)		D1200 (n=10)	
	Mediana	IQR (25 - 75%)	Mediana	IQR (25 - 75%)	Mediana	IQR (25 - 75%)	Mediana	IQR (25 - 75%)	Mediana	IQR (25 - 75%)
1-Total	2,00	1,65 - 2,75	2,88	1,86 - 4,41	3,05	2,19 - 4,76	4,25	2,55 - 4,80	4,06	3,19 - 5,91
2-Macrófagos	1,99	1,64 - 2,74	2,73	1,77 - 4,17	3,01	2,16 - 4,68	4,03	2,35 - 4,61	4,06	3,16 - 5,75
3-Neutrófilos	0,01	0,00 - 0,02	0,04	0,01 - 0,09	0,02	0,01 - 0,04	0,08	0,02 - 0,20	0,02	0,01 - 0,07
4-Linfócitos	0,00	0,00 - 0,01	0,02	0,00 - 0,05	0,02	0,01 - 0,07	0,01	0,00 - 0,03	0,02	0,00 - 0,04

AF ≠ BD600 [(3 (p=0,043)]

AF ≠ BD1200 [3 (p=0,006)]

AF ≠ D1200 [1, 2 (p=0,001)]

D600 ≠ D1200 [(1, 2 (p=0,045)]

Tabela 8. Valores descritivos dos parâmetros inflamatórios no parênquima pulmonar de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). Os valores estão apresentados como mediana e intervalo interquartil

Parâmetros (x 10 ⁵ celulas/mm ²)	AF (n=14)		BD600 (n=11)		D600 (n=11)		BD1200 (n=9)		D1200 (n=12)	
	Mediana	IQR (25 - 75%)	Mediana	IQR (25 - 75%)	Mediana	IQR (25 - 75%)	Mediana	IQR (25 - 75%)	Mediana	IQR (25 - 75%)
1 - PMN	12,47	10,63 - 14,93	58,25	49,54 - 60,69	14,30	11,94 - 20,39	17,77	11,54 - 24,18	13,72	10,36 - 15,02
2 - MNN	20,46	17,21 - 29,05	28,92	24,10 - 46,33	22,68	17,04 - 29,98	18,94	13,26 - 23,40	13,12	11,10 - 18,08

AF ≠ BD600 [(1 (p=0,001), 2 (p=0,024)]

BD600 ≠ D600 [1 (p=0,001)]

BD600 ≠ D1200 [1 (p=0,001)]

BD600 ≠ BD1200 [(1 (p=0,001), 2 (p=0,009)]

D600 ≠ D1200 [(2 (p=0,001)]

3.2.7 Análise imunohistoquímica

A Tabela 9 descreve os dados referentes aos resultados da expressão das citocinas (ET-Ar, ET-Br, INOs, IL-8 e VCAM) nos vasos peribronquiolares de animais submetidos à inalação aguda da exaustão de diesel e biodiesel. Houve aumento da expressão do ET-Ar ($p=0,001$) e do ET-Br ($p=0,035$, $p=0,022$ e $p=0,005$, respectivamente) no grupo BD600, quando comparado aos grupos AF, D600 e BD1200. A expressão da IL-8 aumentou no grupo D600 ($p=0,030$), quando comparado ao grupo D1200. A expressão do INOs reduziu no grupo BD1200, comparado aos grupos AF e BD600 ($p=0,029$ e $p=0,003$, respectivamente). A expressão do VCAM reduziu no grupo D1200, comparado aos grupos AF e D600 ($p=0,035$ e $p=0,004$, respectivamente) (Figura 21). Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão do ISO.

Tabela 9. Valores descritivos da expressão das citocinas nos vasos peribronquiolares de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). Os valores estão apresentados como média e desvio-padrão

Vasos Pulmonar ($\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$)	AF (n=14)	BD600 (n=12)	D600 (n=10)	BD1200 (n=10)	D1200 (n=12)
	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP
1- ET-Ar	6,25 $\pm$ 2,71	15,84 $\pm$ 3,17	7,90 $\pm$ 3,93	5,62 $\pm$ 3,55	7,08 $\pm$ 4,58
2- ET-Br	17,22 $\pm$ 6,90	26,97 $\pm$ 9,24	17,27 $\pm$ 5,24	14,52 $\pm$ 4,88	17,86 $\pm$ 6,16
3- INOs	4,22 $\pm$ 1,81	5,21 $\pm$ 2,06	3,52 $\pm$ 1,44	2,45 $\pm$ 1,28	3,49 $\pm$ 1,42
4- IL-8	3,57 $\pm$ 1,02	3,60 $\pm$ 1,86	4,10 $\pm$ 0,99	3,03 $\pm$ 1,94	2,99 $\pm$ 0,78
5- VCAM	2,39 $\pm$ 1,05	1,97 $\pm$ 1,28	2,79 $\pm$ 1,38	1,82 $\pm$ 0,84	1,24 $\pm$ 0,52

AF $\neq$ BD600 [(1 ($p=0,001$)), 2 ($p=0,035$)]

AF $\neq$ BD1200 [3 ($p=0,029$)]

AF $\neq$ D1200 [5 ($p=0,035$)]

BD600 $\neq$ D600 [(1 ($p=0,001$)), 2 ($p=0,022$)]

BD600 $\neq$ BD1200 [(1 ($p=0,001$)), 2 ($p=0,005$), 3 ($p=0,003$)]

D600 $\neq$ D1200 [(4 ($p=0,030$)), 5 ($p=0,004$)]

Figura 21. Média ($\pm$ EP) da expressão das citocinas nos vasos peribronquiolares de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). **A.** ET-Ar, **B.** ET-Br, **C.** INOs, **D.** IL-8, **E.** VCAM

A Tabela 10 estão descritos os dados referentes à expressão das citocinas (ET-Ar, ET-Br, INOs, VCAM, IL-8 e ISO) no epitélio brônquico de animais submetidos à inalação aguda da exaustão de diesel e biodiesel. Houve aumento da expressão do ET-Ar no grupo BD600, comparado aos grupos AF, D600 e BD1200 ($p=0,002$, $p=0,001$ e $p=0,024$, respectivamente). A expressão do ET-Br aumentou nos grupos BD600 ($p=0,001$), D600 ($p=0,042$), BD1200 ($p=0,001$) e D1200 ($p=0,027$), comparados ao grupo AF. A expressão do INOs elevou-se no grupo D600, comparado ao grupo AF ($p=0,001$), BD600 ($p=0,001$) e D1200 ($p=0,006$). Note-se uma redução da expressão do ISO no grupo D600 ($p=0,001$), comparado aos grupos AF, BD600 e BD1200. Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão do IL-8. (Figura 22).

Tabela 10. Valores descritivos da expressão das citocinas no epitélio brônquico de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). Os valores estão apresentados como média e desvio-padrão

Epitélio Brônquico ($\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$)	AF (n=12)		BD600 (n=12)		D600 (n=11)		BD1200 (n=9)		D1200 (n=11)	
	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP
1- ET-Ar	28,16	± 11,67	46,61	± 6,19	20,85	± 14,03	32,32	± 13,00	22,16	± 11,29
2- ET-Br	29,24	± 20,79	59,82	± 8,19	48,18	± 16,08	57,18	± 6,80	47,60	± 2,17
3- INOs	2,81	± 0,54	2,59	± 1,15	5,26	± 1,91	3,53	± 1,07	3,24	± 1,38
4- IL-8	2,97	± 1,14	3,21	± 2,09	4,13	± 1,76	3,63	± 2,39	4,08	± 1,42
5- ISO	7,97	± 1,73	8,00	± 1,40	4,28	± 1,55	8,75	± 1,44	7,19	± 3,75
6- VCAM	3,46	± 2,23	3,41	± 1,83	6,05	± 1,86	7,09	± 2,09	5,43	± 2,75

AF ≠ BD600 [(1 ($p=0,002$)), 2 ($p=0,001$)]

AF ≠ D600 [2 ($p=0,042$), 3, 5 ($p=0,001$), 6 ($p=0,023$)]

AF ≠ BD1200 [2, 6 ($p=0,001$)]

AF ≠ D1200 [2 ($p=0,027$)]

BD600 ≠ D600 [(1, 3, 5 ($p=0,001$), 6 ($p=0,011$)]

BD600 ≠ BD1200 [(1 ($p=0,024$), 6 ($p=0,001$)]

D600 ≠ D1200 [3 ($p=0,006$)]

Figura 22. Média ($\pm$ EP) da expressão das citocinas no epitélio brônquico de cada grupo exposto na câmara de inalação (AF, BD600, D600, BD1200 e D1200). **A.** ET-Ar, **B.** ET-Br, **C.** INOs, **D.** IL-8, **E.** ISO

3.2.8 Sumário dos efeitos

Tabela 11. Efeitos no sistema biológico

Sistema	Parâmetros	FA				BD600		D1200		BD1200	
		BD600	BD1200	D600	D1200	D600	D1200	BD600	D600	BD600	D1200
VFC	SDNN	↑	—	—	↑	—	—	—	—	↑	↑
	RMSSD	↑	—	↑	—	—	—	—	—	↑	—
	BF	↑	—	↑	↑	—	—	—	—	↑	↑
	AF	↑	—	↑	—	—	—	—	—	—	—
	PA	—	—	—	↓	—	—	—	—	—	↓
Hemograma	Eritrócitos	↑	↑	↑	↑	—	—	—	—	↓	—
	Hemoglobina	—	↑	—	—	—	—	—	—	—	—
	Hematócrito	—	↑	—	↑	—	—	—	—	↓	—
	MCHC	—	↓	—	↓	—	—	—	—	↑	—
	RDW-SD	—	↑	↑	↑	—	—	—	—	↓	—
	Leucócitos	—	—	—	—	—	—	—	—	↑	—
	Linfócitos	—	—	↑	—	—	—	—	—	↑	↑
	Reticulócitos	—	↑	—	↑	↑	—	—	—	↓	—
LBA	Células totais	—	—	—	↑	—	—	—	↓	—	—
	Macrófagos	—	—	—	↑	—	—	—	↓	—	—
	Neutrófilos	↑	↑	—	—	—	—	—	—	—	—
Histologia pulmonar	PMNN	↑	—	—	—	↓	↓	—	—	↑	—
	MNN	↑	—	—	—	—	—	—	↑	↑	—
Mielograma	Mielócitos	—	—	—	—	—	—	—	—	—	↓
	Metamielócitos	—	—	↓	—	↓	—	—	—	—	—
	Bastonete	—	—	—	↑	—	—	↓	↓	—	↑
	Eosinófilos	↑	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Linfócitos	—	—	—	—	—	—	—	↑	—	—
	Plasmócitos	—	—	—	↓	—	—	—	↑	—	↓

Continua...

Conclusão Tabela 11. Efeitos no sistema biológico

Sistema	Parâmetros	FA				BD600		D1200		BD1200	
		BD600	BD1200	D600	D1200	D600	D1200	BD600	D600	BD600	D1200
Vaso peribronquiolar	ET-Ar	↑	—	—	—	↓	—	—	—	↑	—
	ET-Br	↑	—	—	—	↓	—	—	—	↑	—
	INOs	—	↓	—	—	—	—	—	—	↑	—
	IL-8	—	—	—	—	—	—	—	↑	—	—
	ISO	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	VCAM	—	—	—	↓	—	—	—	↑	—	—
Epitélio brônquico	ET-Ar	↑	—	—	—	↓	—	—	—	↑	—
	ET-Br	↑	↑	↑	↑	—	—	—	—	—	—
	INOs	—	—	↑	—	↑	—	—	↑	—	—
	IL-8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	ISO	—	—	↓	—	↓	—	—	—	—	—
	VCAM	—	↑	↑	—	↑	—	—	—	↓	—

Significância: $p < 0,05$.

3.3 Discussão

O presente estudo evidenciou que camundongos Balb/C expostos à inalação aguda dos gases e partículas da exaustão dos combustíveis diesel e biodiesel, nas doses de 600 e 1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ $\text{MP}_{2,5}$, apresentaram efeitos distintos no sistema biológico. As doses administradas equivalem à concentração média diária de 25 e 50 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ $\text{MP}_{2,5}$. Note-se que a dose acumulada de 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ $\text{MP}_{2,5}$ está de acordo com o nível médio diário recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2005).

Os valores referentes às qualidades dos combustíveis diesel (S50) e biodiesel (éster etílico de esgoto) utilizados neste estudo estão de acordo com as especificações recomendadas pela Agência Nacional do Petróleo (ANP).

Contextualmente, os animais expostos à exaustão do diesel sofreram um efeito sistêmico. Contudo, a exaustão do biodiesel causou um efeito localizado, ou seja, no sistema pulmonar. Note-se que houve um aumento da VFC, inflamação pulmonar, broncoconstrição dos vasos peribronquiolares e nos epitélios brônquicos dos animais expostos à exaustão do biodiesel na dose de 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ $\text{MP}_{2,5}$. Já na exaustão do diesel, independentemente da dose administrada (600 e/ou 1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ $\text{MP}_{2,5}$), evidenciou-se aumento da VFC, inflamação sistêmica e broncoconstrição no epitélio brônquico (Figura 23).

Corroborando os nossos achados, Graboski et al. (2003), Zou et al. (2003), Yuan et al. (2007), Lapuerta et al. (2008a), e Di et al. (2009) descrevem que a exaustão do combustível biodiesel emite maiores concentrações de NO e NO_x comparada à do diesel. Quanto maior a adição de biodiesel ao diesel, menores são as emissões de MP, CO e HC e maiores são as emissões de NO_x .

(EPA, 2002). Sabidamente, a elevação das emissões dos NO_x devem ser bem analisadas, pois estes são compostos gasosos precursores do O_3 , poluente que causa irritação das vias aéreas, asma e danos pulmonares (EPA, 2006).

Figura 23. Desfecho dos principais achados no sistema cardiopulmonar de camundongos Balb/C. Exposição aguda ao BD600 (a); exposição aguda ao D600 (b)

A elevada densidade e o maior teor de oxigênio contido no combustível biodiesel eleva as emissões dos NO_x e reduz o tempo de injeção do motor (Lapuerta et al. 2008a; Graboski et al. 2003; Zou et al. 2003; Yuan et al. 2007; Di et al. 2009). Além disso, por oxidar os produtos da combustão mais facilmente, o biodiesel reduz as emissões de MP, HC, CO e a fuligem (Kegl 2008; Di et al. 2009). Os HPAs, tais como os seus derivados, os nitro-HPA, são potencialmente carcinogênicos e mutagênicos (Garshick et al. 2004). Porém, seus efeitos citotóxicos são precariamente avaliados. Ressalta-se que as emissões de gases e partículas são fatores dependentes do tipo de motor, do combustível e da condição de operação (Bunger et al. 2000a; Karavalakis et al. 2008; Cheung et al. 2009; Tzamkiozis et al. 2010).

O aumento da VFC observada neste estudo foi dependente da dose administrada de $600 \mu\text{g}/\text{m}^3$ $\text{MP}_{2,5}$ no grupo exposto à exaustão do biodiesel. Já a exaustão do diesel, independentemente da dose (600 e/ou $1200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ $\text{MP}_{2,5}$), elevou a VFC. Similarmente aos nossos achados, Brito et al. (2010) descreveram aumento da VFC após exposição aguda à queima do B50 e B100, sugerindo que tais efeitos podem ser devidos ao aumento da atividade do sistema parassimpático e/ou aumento do tônus vagal parassimpático.

As alterações na VFC podem ser justificadas por um desbalanço no sistema nervoso autonômico cardíaco, podendo comprometer indivíduos com doenças cardíacas prévias, como angina, coronariopatia e aterosclerose. A elevação da VFC causa bradiarritmia, tornando o indivíduo susceptível à arritmia e desfibrilação ventricular (Campen et al. 2005; Carll et al. 2012). De acordo com Hotta et al. (2009), o aumento do tônus vagal pode ser causado pelo óxido nítrico, o qual eleva a VFC. Em contrapartida, divergentes efeitos

são descritos na literatura sobre a VFC, segundo os quais a administração intratraqueal do $MP_{2,5}$ reduz a VFC após 60 minutos (Rivero et al. 2005; Maatz et al. 2009) e após 24 horas (Nemmar et al. 2007). Sugere-se que o aumento do tônus simpático reduz a VFC após a exposição ao $MP_{2,5}$ (Adar et al. 2007) e às partículas inaláveis da exaustão do diesel (Huang et al. 2010).

Os efeitos cardiovasculares advindos do MP da exaustão do biodiesel podem estar relacionados à inflamação pulmonar e ao aumento da vasoconstrição dos vasos peribronquiolares e do epitélio brônquico. Por outro lado, na exaustão do diesel os efeitos cardiovasculares podem ser relacionados à inflamação sistêmica. Hemmingsen et al. (2011) relacionaram os efeitos cardiovasculares ao estresse oxidativo e à inflamação pulmonar.

A inflamação pulmonar foi observada tanto no LBA quanto no parênquima pulmonar nos animais expostos à exaustão do biodiesel na dose de $600 \mu\text{g}/\text{m}^3$ $MP_{2,5}$. O infiltrado de neutrófilos nos grupos expostos à exaustão do biodiesel evidenciado em nosso estudo pode ser atribuído aos altos níveis dos NO_x , gases oxidantes com alto potencial inflamatório. Note-se que a inflamação pulmonar tem sido positivamente associada ao poluente NO_2 (Zang et al. 2011; Chanell et al. 2012; Karthikeyan et al. 2013).

Corroborando os nossos achados, outros demonstram que a exposição ao biodiesel induz a inflamação pulmonar (Finch et al. 2002; Brito et al. 2010), dano no tecido pulmonar e estresse oxidativo, bem como eleva a liberação de mediadores inflamatórios (Hemmingsen et al. 2011; Yanamala et al. 2013; Shvedova et al. 2013). Diferentemente de nossos achados, Karthikeyan et al. (2013) demonstraram a presença de inflamação pulmonar, estresse oxidativo e disfunção endotelial em ratos expostos à exaustão do diesel.

Yanamala et al. (2013) descreveram que a exaustão do biodiesel aumenta o recrutamento de células inflamatórias no LBA, eleva a liberação de mediadores inflamatórios e causa estresse oxidativo (Figura 24). Postula-se que a exaustão do biodiesel aumenta os compostos orgânicos (ex.: aldeídos insaturados), e que esses compostos interagem diretamente com as biomoléculas pulmonares gerando o aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio intracelular formado pela depleção dos antioxidantes (Shvedova et al. 2013).

Figura 24. Diagrama dos mediadores inflamatórios avaliados no LBA de camundongos expostos à exaustão de diesel e biodiesel (24h, 7 e 28 dias).
FONTE: Yanamala et al., 2013

As vias aéreas formam a primeira linha de defesa contra os gases e partículas irritantes. O longo tempo de retenção das partículas impactadas no local de exposição é um fator importante que leva a efeitos adversos à saúde. Em adição, por fornecer uma barreira mecânica, o epitélio pulmonar produz citocinas que recrutam e ativam as células fagocitárias (Yanamala et al. 2013).

Isso tem sido evidente em outros estudos, nos quais, o MP do diesel tem sido descrito como agente causador de inflamação pulmonar, além de ativar a liberação de citocinas e mediadores inflamatórios (Bonvallot et al. 2001; Holder et al. 2007; Nemmar et al. 2009; Totlandsdal et al. 2012) e sua exposição em longo prazo poder causar exacerbação de doença pulmonar pré-existente, infecções respiratórias e câncer (Sawyer et al. 2010; Silverman et al. 2012).

Estudos experimentais têm demonstrado que a exposição ao diesel (Kafoury et al. 2005; Lewis et al. 2007; Nemmar et al. 2009) e ao biodiesel (Shedova et al. 2013; Yanamala et al. 2013) aumentam a expressão de proteínas envolvidas na inflamação, no estresse oxidativo e na disfunção endotelial. Nossos dados demonstram um aumento das expressões proteicas nos vasos peribronquiolares para as endotelinas (ET-Ar e ET-Br) no grupo biodiesel (dose de 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ $\text{MP}_{2,5}$); contudo, houve redução da expressão proteica do INOs no grupo exposto ao biodiesel (dose: 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ $\text{MP}_{2,5}$) e do VCAM no grupo exposto ao diesel (dose: 1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ $\text{MP}_{2,5}$). No epitélio brônquico, nossos resultados descrevem aumento das expressões proteicas do ETA-r no grupo exposto ao biodiesel (dose: 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ $\text{MP}_{2,5}$), ET-Br para todos grupos expostos tanto ao diesel quanto ao biodiesel, independentemente da dose (600 e/ou 1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ $\text{MP}_{2,5}$), INOs no grupo diesel (dose: 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ $\text{MP}_{2,5}$) e do VCAM nos grupos biodiesel (dose: 1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ $\text{MP}_{2,5}$) e diesel (dose: 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ $\text{MP}_{2,5}$); já a expressão proteica do ISO reduziu no grupo diesel sob a dose administrada de 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ $\text{MP}_{2,5}$. Não foram evidenciadas diferenças na expressão proteica da IL-8 nos grupos expostos ao diesel e ao biodiesel nas diferentes doses (600 e 1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ $\text{MP}_{2,5}$).

Os macrófagos alveolares têm um papel-chave na resposta imune pulmonar, por produzirem, liberarem e regularem mediadores inflamatórios, tais como espécies reativas de oxigênio, NO, ET-1 e citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, TNF- α) (Zhang et al. 2000; Ishii et al. 2004; Alexis et al. 2006; Karthikeyan et al. 2013). Estudos experimentais têm descrito que partículas da exaustão do diesel suprimem a liberação da IL-8 (Mundandhara et al. 2005; Totlands et al. 2010, 2012), aumentam a expressão da ET-1 (Karthikeyan et al. 2013) e inibem a produção do NO (Saxena et al. 2003). O aumento do vasoconstritor ET-1 e a redução do vasodilatador NO são indicativos de alteração fisiológica do endotélio pulmonar (Karthikeyan et al. 2013).

Similarmente aos nossos achados, Hemmingsen et al. (2011) exibiram que a exaustão do diesel eleva a expressão da molécula de adesão VCAM no epitélio brônquico. Essa molécula de adesão é consistentemente reportada como uma das proteínas envolvidas no recrutamento de leucócitos circulantes (Chanell et al. 2012) e na progressão da doença vascular (Zhang et al. 2010). Especula-se que o aumento da expressão do VCAM nos animais expostos à exaustão do diesel possa ser devido ao estresse oxidativo, que é implicado no desenvolvimento da disfunção endotelial e inflamação (Hemmingsen et al. 2011).

A exaustão do diesel, independentemente da dose administrada (600 e/ou 1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ MP_{2,5}), causou alterações da série vermelha sanguínea, indicando um aumento da viscosidade sanguínea. Contudo, a inflamação sistêmica foi evidente nos animais expostos à exaustão do diesel na dose de 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ MP_{2,5}. Corroborando os nossos achados, Nemmar et al. (2009) demonstraram inflamação sistêmica caracterizada por leucocitose e redução da pressão arterial sistólica após 18 horas de exposição das partículas da

exaustão do diesel. Consistentemente, as partículas da exaustão do diesel são tipicamente finas e ultrafinas (< 2500 nm) e têm a capacidade de atingir as regiões mais distais do sistema pulmonar, difundindo-se para a corrente sanguínea, gerando alterações dos parâmetros hematológicos (Schwartz, 2001) e inflamação sistêmica (Van Eden et al. 2002; Krishnan et al. 2013), portanto predispondo à formação de coágulos e trombos (Gilmour et al. 1996).

Nossos resultados suportam a hipótese de que a exposição aguda ao diesel na dose $600 \mu\text{g}/\text{m}^3$ $\text{MP}_{2.5}$ inicia o processo de inflamação sistêmica pelo aumento dos linfócitos circulantes. Esse processo biológico é um passo importante na mediação dos eventos cardiovasculares adversos associados ao MP do diesel. Em adição, as partículas inaláveis da exaustão diesel têm sido consistentemente associadas ao aumento de arritmias cardíacas, disfunção endotelial e inflamação sistêmica (Hazari et al., 2011; Tornqvist et al., 2007; Nemmar et al., 2007, 2009, 2011; Carll et al., 2012).

Nossos achados demonstram aumento nos níveis do hematócrito nos grupos expostos à exaustão de diesel e biodiesel na dose de $1200 \mu\text{g}/\text{m}^3$ $\text{MP}_{2.5}$. Similarmente, Krishnan et al. (2013) exibiram aumento nos níveis do hematócrito após a exposição à exaustão do diesel. A elevação dos níveis do hematócrito contribui para o aumento da viscosidade sanguínea e, consequentemente, para o agravamento da isquemia em pacientes portadores de condições de risco para eventos isquêmicos (Lowe, 2006). Em contrapartida, diferentemente de nossos achados, Brito et al. (2010) evidenciaram que os animais expostos ao B50 e B100 tiveram um efeito sistêmico mais consistente do que aqueles expostos à queima do diesel.

Dentre as limitações deste estudo, destacam-se: **(1)** a exaustão do combustível diesel e biodiesel consiste em uma mistura complexa de gases e partículas tóxicas; **(2)** a toxicidade induzida pela dose pode ser maior do que a exposição ambiental; **(3)** a resposta fisiológica pela inalação da exaustão de diesel e biodiesel, por ser mais aguda, pode ser mais tóxica que a exposição ambiental; e **(4)** os dados da VFC, FC e PA foram registrados apenas 1 vez (após 30 minutos da exposição) e essas alterações podem ser o mecanismo potencial de aumento da mortalidade cardíaca. Contudo, o uso da inalação, ao invés de instilação intratraqueal, em animais, proporciona um ambiente mais controlado de exposição, que caracteriza a qualidade do experimento.

Em suma, a exposição ao biodiesel causou inflamação pulmonar, broncoconstrição dos vasos peribronquiolares e do epitélio brônquico; já a exposição ao diesel desencadeou inflamação sistêmica, aumento da atividade parassimpática evidenciada pela elevação da VFC e broncoconstrição do epitélio brônquico.

Efeito cardiopulmonar agudo induzido pela inalação das partículas ambientais concentradas (PACs) durante a variação sazonal na cidade de São Paulo

4.1 Materiais e métodos

Toda a parte experimental foi realizada no laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LPAE) do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da FMUSP (APÊNDICE 1).

Todos os animais receberam cuidados de acordo como o “Guia de cuidados e uso de animais de laboratório” publicado pela *National Institutes of Health* (NIH publication 85-23, revisado em 1985) e todos os experimentos foram realizados com anestesia geral.

4.1.1 Amostragem e caracterização do MP_{2,5}

A frota veicular tem sido caracterizada como a principal emissora de poluentes no ar na cidade de São Paulo (Mauad et al. 2008). Para caracterizar

o $MP_{2,5}$ nos períodos (frio/seco e quente/úmido), utilizamos dados prévios das amostras de $MP_{2,5}$ coletadas na FMUSP entre junho/2007 a agosto/2008, pois as condições climáticas foram similares ao período deste estudo (Andrade et al. 2012; Miranda et al. 2012). As amostras geradas durante o período frio/seco teve concentrações mais elevadas de $MP_{2,5}$, BC, Si, K, Ca, Ti, V, Fe, Ni, Zn, Br ($p=0.001$) e Pb ($p=0.031$) do que as amostras geradas durante o período quente/úmido (Tabela 12). parei

A identificação dos componentes principais foi baseada na análise de rotação que estima a contribuição de cada fator para explicar a variação da concentração da massa. A análise dos componentes principais identificou 4 fatores. **Fator 1** pode ser explicado pela combustão de combustível fóssil e poluentes secundários, a qual teve níveis elevados de P, S, V sulfato e amônia, o que descreve a contribuição de 12% dessa massa de $MP_{2,5}$ ($3.4 \mu g/m^3$). **Fator 2** foi associado com a queima de veículos pesados (diesel) e biomassa devido às altas concentrações de $MP_{2,5}$, BC, Br and K, explanando 48% da massa de $MP_{2,5}$ ($13.5 \mu g/m^3$). **Fator 3** associa-se às emissões de solo e de construções devido às altas concentrações de Si, Ca, Ti e Fe, explanando 11% da massa de $MP_{2,5}$ ($3.2 \mu g/m^3$). **Fator 4** foi associado com a emissão de veículos leves devido à presença de Zn, Pb e outros metais que explicam 5% da massa de $MP_{2,5}$ ($1.4 \mu g/m^3$). A análise de regressão para os 4 fatores exibem que 21% da massa de $MP_{2,5}$ em São Paulo não é explicada por nenhum desses fatores (Tabela 12). A contribuição de cada fator durante os períodos frio/seco e quente/úmido está descrita na Figura 25, na qual o período frio/seco é marcado pelo aumento das emissões do Fator 2 e 3 ($p=0,001$).

Tabela 12. Caracterização elemental e identificação dos componentes principais das amostras de MP_{2,5} coletadas entre Junho/2007 a Agosto/2008 em São Paulo, Brasil

Elementos ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Frio/seco				Quente/úmido				Componentes principais			
	N	Média	±	DP	N	Média	±	DP	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4
MP_{2,5}	86	34,96	±	14,97 ^a	92	22,21	±	10,16	0,241	0,800	0,218	0,282
BC	89	13,48	±	7,61 ^a	95	7,17	±	3,50	-0,307	0,660	0,245	0,450
Si	95	0,186	±	0,151 ^a	106	0,076	±	0,056	-0,032	0,385	0,809	0,143
P	94	0,024	±	0,017	104	0,035	±	0,140	0,882	-0,081	0,094	0,267
S	95	0,984	±	0,541	106	0,894	±	0,494	0,950	-0,001	0,030	0,075
K	95	0,344	±	0,220 ^a	106	0,146	±	0,150	-0,021	0,817	0,208	-0,031
Ca	95	0,122	±	0,114 ^a	106	0,051	±	0,028	0,086	-0,056	0,904	0,015
Ti	95	0,013	±	0,011 ^a	106	0,006	±	0,004	-0,043	0,231	0,878	0,155
V	92	0,002	±	0,001 ^a	103	0,001	±	0,001	0,613	0,214	-0,168	0,505
Mn	95	0,008	±	0,005	106	0,006	±	0,020	0,118	0,482	0,345	0,591
Fe	95	0,243	±	0,143 ^a	106	0,126	±	0,060	0,048	0,544	0,658	0,429
Ni	75	0,002	±	0,001 ^a	65	0,001	±	0,001	0,017	0,448	-0,091	0,448
Zn	95	0,110	±	0,095 ^a	106	0,052	±	0,041	-0,007	0,201	0,234	0,865
Br	92	0,008	±	0,009 ^a	96	0,003	±	0,003	0,080	0,825	0,105	0,250
Pb	64	0,020	±	0,017 ^b	98	0,015	±	0,012	0,181	0,143	0,136	0,762
Sulfate	95	2,914	±	1,90	103	2,605	±	1,615	0,940	-0,013	0,039	0,087
Ammonium	93	0,930	±	0,849	106	0,798	±	0,664	0,732	0,156	-0,027	-0,281

A cor cinza descreve os principais elementos de cada fator.

^a Frio/seco ≠ quente/úmido (p=0,001)

^b Frio/seco ≠ quente/úmido (p=0,031)

As concentrações dos HPA têm sido bem documentadas por Vasconcellos et al. (2010). A concentração total dos HPA foi de 10.6 ng m⁻³ no período quente/úmido e 25.9 ng m⁻³ no período frio/seco.

Figura 25. Média ($\pm$ EP) da análise dos componentes principais durante os períodos frio/seco e quente/úmido. Frio/seco $\neq$ Quente/úmido ($p=0,001$)

4.1.2 Delineamento experimental

Foram expostos ao ar filtrado (AF) e às PACs um total de 180 camundongos Balb/C, machos, com idade entre 6 e 8 semanas, pesando entre 20 e 30 gramas, obtidos do Biotério Central da FMUSP. Os animais foram mantidos no biotério de manutenção do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental – LIM 05 em temperatura e umidade relativa do ar controlada, com ciclos alternados em ambiente escuro (12 horas) e claro (12 horas) e alimentados com ração e água *ad libitum*.

Quatro grupos experimentais foram definidos da seguinte maneira: (1) frio/seco exposto às PACs ($n=46$) e um grupo controle correspondente exposto simultaneamente ao AF ($n=44$); (2) quente/úmido exposto às PACs

(n=46) e ao AF (n=44). Todas as exposições foram realizadas no mesmo horário do dia, das 11h às 12h (am). Durante os intervalos entre as exposições, os animais foram mantidos em estantes com ar filtrado (filtro HEPA – High Efficiency Particulate Air), em temperatura controlada entre 22 e 25 °C e em ciclo claro/escuro de 12 horas, com o ciclo claro iniciando às 7 horas.

4.1.3 Protocolo de exposição às PACs

Camundongos Balb/C, machos, foram expostos às PACs provenientes da cidade de São Paulo, usando o CPAs localizado no pátio da FMUSP. Nesse sistema, uma série de impactadores classificam as partículas de acordo com o seu tamanho aerodinâmico, entre 0,1 a 2,5. As características físico-químicas são mantidas, como descrito por Sioutas et al. (1995).

Os animais foram expostos à mesma concentração de partículas. A concentração das PACs foram monitoradas em tempo real, usando um monitor de partículas (DataRam4™, Thermo Fisher Scientific Inc.). Para receber a dose de 200 µg/m³ de MP_{2,5}, o tempo de exposição foi monitorado, a fim de manter a mesma concentração para todos os grupos (concentração *versus* tempo).

Grupos de 7 a 8 animais expostos ao MP_{2,5} e de 7 a 8 animais expostos ao AF foram frequentemente expostos por um tempo inferior a 60 minutos na câmara de inalação. Para cada estação climática (fria/seca ou quente/úmida) e para cada grupo, 6 exposições foram conduzidas em dias diferentes, a fim de alcançar o número final de 46 animais expostos ao MP_{2,5} e 44 animais expostos ao AF em cada estação climática (Tabela 13).

Tabela 13. Delineamento experimental

Data	Período	Animal por grupo		Concentração média das PACs ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Exposição (min)	PACs acumulada (concentração <i>versus</i> tempo)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Umidade relativa(%)
		AF	PACs					
07.07.10	1	7	8	200,19	60	202,19	24	54
19.07.10	1	7	8	504,16	24	201,66	24	66
11.08.10	1	8	7	488,36	25	203,48	20	66
10.05.11	1	7	8	197,37	60	197,37	29	52
25.05.11	1	7	8	506,84	25	211,18	27	45
07.06.11	1	8	7	452,9	27	203,81	27	45
20.10.11	2	7	8	427,17	28	199,34	26	45
26.10.11	2	7	8	296,95	40	197,96	25	63
03.11.11	2	8	7	408,04	30	204,02	28	38
15.02.12	2	7	8	214,46	58	207,31	25	64
01.03.12	2	7	8	387,28	32	206,55	31	43
08.03.12	2	8	7	347,28	35	202,58	29	47
Média	1	44	46	391,63	36	203,28	25,16	54,66
Média	2	44	46	346,86	37	202,96	27,33	50

Período: 1-frio/seco; 2-quente/úmido

O protocolo de exposição foi conduzido nos seguintes dias: (1) período frio/seco: 07/07/10, 19/07/10 e 11/08/10, 10/05/11, 25/05/11 e 07/06/11; e (2) período quente/úmido: 20/10/11, 26/10/11, 03/11/11, 15/02/12, 01/03/12 e 08/03/12. Os dados meteorológicos correspondentes ao período entre 2007 e 2012 e os dados referente às exposições estão descritos na Tabela 14.

Tabela 14. Valores médios (temperatura e umidade relativa) e soma (índice de precipitação) dos parâmetros meteorológicos obtidos entre 2007 e 2012 em São Paulo, Brasil. Fonte: Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciência Atmosférica (IAG), USP

Parâmetros	Ano	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dec
Temperatura (°C)	2007	22	23	23	21	17	17	15	17	19	20	20	22
	2008	21	22	21	20	17	16	16	18	17	20	20	20
	2009	22	23	22	20	18	15	16	17	19	19	23	22
	2010	23	24	22	20	18	16	17	16	19	18	20	22
	2011	23	23	21	21	17	15	16	17	17	19	19	21
	2012	21	23	22	20	17	17	16	18	19	21	20	24
Umidade relativa (%)	2007	83	80	77	82	81	76	79	75	74	79	80	80
	2008	82	82	80	82	78	82	74	78	79	82	82	80
	2009	82	82	82	83	81	81	87	77	84	86	80	84
	2010	84	77	81	82	82	79	80	75	77	83	80	84
	2011	83	81	87	82	83	81	79	77	77	80	79	79
	2012	82	79	79	84	82	86	78	74	75	77	81	81
Precipitação (mm)	2007	126	274	205	78	54	26	161	1	4	96	123	198
	2008	263	219	75	122	57	57	0	89	42	146	113	256
	2009	234	219	247	52	56	42	200	51	203	138	234	209
	2010	653	394	148	130	81	13	90	4	97	77	159	281
	2011	466	328	91	102	24	65	12	65	4	176	111	236
	2012	333	255	150	177	49	191	88	2	22	92	163	345

Nota: A cor cinza descreve os meses de exposição dos camundongos no CPAs.

4.1.4 Registro da frequência cardíaca (FC), variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e pressão arterial (PA)

Após 30 minutos do fim da exposição às PACs e/ou AF, realizamos o registro da frequência cardíaca (FC), variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e pressão arterial (PA), conforme descrito no item 3.1.4 dos materiais e métodos do Estudo I.

4.1.5 Avaliação da responsividade pulmonar por pletismografia

Após o registro da VFC, os camundongos foram acomodados em um pletismógrafo de corpo inteiro (Buxco Europe, Winchester, Reino Unido), respirando espontaneamente para a análise da responsividade pulmonar à metacolina (Mch).

O pletismógrafo apresenta dois orifícios que conectam o interior da câmara ao meio externo, a fim de equilibrar as pressões, e possui uma saída de ar, ligada a uma bomba de sucção (fluxo 1L/min) para realizar a troca do ar no interior da câmara e evitar a hipóxia/hipercapnia do animal. Um transdutor de pressão calibrado com a injeção de 1mL de ar na câmara também é ligado ao pletismógrafo para mensurar volumes e fluxos durante a respiração do animal.

Os valores do Penh (do inglês “enhance pause”) foram calculados a partir dos picos de pressão, usando a seguinte fórmula:

$$\text{Penh} = [(TE/0,3TR) - 1] \times (2PEF/3PIF)$$

sendo Penh= índice de broncoconstrição, TE= tempo expiratório, TR= tempo de relaxamento, PEF= pico de fluxo expiratório (mL/s), PIF= pico de fluxo inspiratório (mL/s).

As medidas basais foram adquiridas durante 4 minutos, após a ambientação dos camundongos. Em seguida, os animais foram expostos ao aerossol de solução salina e às concentrações crescente de metacolina (6,25; 12,5; 25 e 50 Mch). As medidas foram obtidas por 5 minutos, sendo 3 minutos de nebulização com intervalo de 2 minutos entre cada inalação.

Os valores de Penh foram calculados como a média de 25 ciclos respiratórios (Arantes-Costa et al. 2008).

4.1.6 Coleta e análise laboratorial dos parâmetros hematológicos

Após 24 horas da exposição as PACs e/ou AF, os animais foram anestesiados e a coleta do sangue procedeu-se conforme descrito no item 3.1.5 dos materiais e métodos do Estudo I.

4.1.7 Análise da densidade numérica de neutrófilos e macrófagos no pulmão

A coleta no pulmão e a análise da densidade numérica de neutrófilos e macrófagos foram realizadas conforme descrito no item 3.1.8 dos materiais e métodos do Estudo I.

4.1.8 Análise imunohistoquímica e morfométrica pulmonar

A expressão do receptor da Endotelina-A (ET-Ar), receptor da Endotelina-B (ET-Br), e da molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), nos vasos peribronquiolares, foram avaliadas conforme descrito no item 3.1.9 dos materiais e métodos do Estudo I.

4.1.9 Análise estatística

A avaliação da normalidade dos dados foi realizada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Foram realizadas análises descritivas para todas as variáveis avaliadas neste estudo. Para as variáveis com distribuição normal, os valores foram expressos em média $\pm$ DP, e a significância foi determinada pelo *Teste T*. Contudo, nas variáveis não paramétricas, os valores foram expressos em mediana e intervalo interquartil, e a significância foi determinada pelo Teste de Amostras Independentes de Mann-Whitney U. O Teste General Linear para Medidas Repetidas foi utilizado para análise da mecânica pulmonar. O pacote estatístico utilizado foi o SPSS versão 15; SPSS Inc.®, Chicago, IL. O nível estatístico de significância adotado foi de 5%.

4.2 Resultados

4.2.1 Registro da frequência cardíaca (FC), variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e pressão arterial (PA)

Como descrito na Tabela 15 e na Figura 26, não houve diferenças estatisticamente significantes na VFC, FC e PA para os grupos expostos ao AF e às PACs durante os períodos frio/seco e quente/úmido.

Figura 26. Mediana (IQR:25-75%) da VFC, FC e PA para os grupos expostos ao AF e às PACs durante os períodos frio/seco e quente/úmido. **A.** SDNN, **B.** RMSSD, **C.** BFreq, **D.** AFreq, **E.** FC, **F.** PA

Tabela 15. Valores descritivos da VFC, FC e PA para os grupos expostos ao AF e às PACs durante os períodos frio/seco e quente/úmido. Os valores estão apresentados como mediana e intervalo interquartil

	Ar filtrado (AF)						Partículas ambientais concentradas (PACs)					
	(a) Frio/seco (n=34)		(b) Quente/úmido (n=43)		(c) Todos (n=77)		(d) Frio/seco (n=34)		(e) Quente/úmido (n=44)		(f) Todos (n=78)	
	Mediana	IQR (25-75%)	Mediana	IQR (25-75%)	Mediana	IQR (25-75%)	Mediana	IQR (25-75%)	Mediana	IQR (25-75%)	Mediana	IQR (25-75%)
1-SDNN (ms²)	15,79	12,88 - 20,77	14,40	11,88 - 19,53	15,09	12,45 - 20,17	17,66	14,40 - 20,87	14,36	11,86 - 18,06	15,43	12,55 - 20,07
2-RMSSD (ms²)	20,16	16,50 - 28,09	18,58	14,45 - 24,77	19,38	14,90 - 26,60	21,49	16,87 - 28,36	17,43	14,76 - 22,99	18,55	15,39 - 25,47
3- BF (ms)	14,44	8,76 - 30,29	7,66	4,04 - 14,85	11,14	4,58 - 24,19	10,41	6,53 - 17,16	10,55	4,18 - 15,46	10,41	5,81 - 15,95
4- AF (ms)	10,65	5,07 - 20,73	4,80	2,72 - 11,96	7,91	3,81 - 13,71	7,61	5,33 - 12,98	6,94	3,07 - 13,46	7,29	4,80 - 13,43
5-BF/AF	1,67	1,39 - 2,18	1,40	1,10 - 2,43	1,50	1,14 - 2,21	1,29	1,02 - 2,36	1,46	1,00 - 1,93	1,35	1,01 - 2,01
6-FC (bpm)	400,75	366,86 - 427,45	401,27	381,36 - 448,98	400,81	379,77 - 436,54	404,14	362,90 - 433,55	409,34	396,79 - 431,08	409,16	384,43 - 431,94
7-PA (mmHg)	89,05	69,67 - 129,83	91,25	74,87 - 117,13	91,25	72,37 - 120,55	94,13	58,74 - 134,44	85,03	76,53 - 121,01	86,88	71,33 - 125,02

Os grupos foram divididos em: (a) frio/seco-AF; (b) quente/úmido –AF; (c) todos – AF; (d) frio/seco-PACs; (e) quente/úmido –PACs; (f) todos – PACs.

4.2.2 Avaliação da responsividade pulmonar por pletismografia

As PACs produzidas durante os períodos frio/seco elevaram o Penh na dose basal ($p=0,012$) e na dose 6,25 Mch ($p=0,038$), quando comparado ao grupo AF (Figura 27). Não houve diferenças estatisticamente significantes para a área sobre a curva (AUC) e $\text{Penh}_{\text{máx}}$ (Figura 28).

Figura 27. Erro padrão da média do Penh obtido pela curva dose-resposta à metacolina para os grupos expostos ao AF e as PACs durante os períodos frio/seco e quente/úmido. **A.** Frio/seco, **B.** Quente/úmido, **C.** Todos. Frio/seco: **PACs $\neq$ AF** (* $p=0,012$; # $p=0,038$)

Figura 28. Média ($\pm$ EP) do $\text{Penh}_{\text{máx}}$ e área sob a curva (AUC) para os grupos expostos ao AF e às PACs durante os períodos frio/seco e quente/úmido. **A.** $\text{Penh}_{\text{máx}}$, **B.** AUC

4.2.3 Análise dos parâmetros hematológicos

Independentemente do período de exposição (frio/seco e quente/úmido), as PACs reduziram o VCM ($p=0,001$) e elevaram o hematócrito ($p=0,019$), a CHCM ($p=0,004$), os eritrócitos, a hemoglobina e o RDW-CV ($p=0,001$) na comparação com o grupo AF (Figura 29, Tabela 16).

A exposição às PACs geradas durante o período frio/seco reduziram o VCM ($p=0,010$) e elevaram os eritrócitos ($p=0,018$), a hemoglobina ($p=0,022$), a CHCM ($p=0,016$) e o RDW-CV ($p=0,021$), em comparação ao grupo AF. Similarmente, a exposição às PACs geradas durante o período quente/úmido reduziram o VCM ($p=0,001$) e elevaram os eritrócitos, a hemoglobina ($p=0,001$), o hematócrito ($p=0,024$) e o RDW-CV ($p=0,006$), em comparação ao grupo AF (Figura 29, Tabela 16).

A elevação do RDW-CV ($p=0,015$) foi maior no grupo exposto às PACs geradas durante o período frio/seco do que às PACs geradas durante o período quente/úmido. Já, os níveis de hemoglobina ($p=0,034$) foram maiores no grupo exposto às PACs geradas durante o período quente/úmido (Figura 29, Tabela 16).

Figura 29. Média ($\pm$ EP) dos parâmetros hematológicos para os grupos expostos ao AF e as PACs durante os períodos frio/seco e quente/úmido. **A.** Eritrócitos, **B.** Hematócrito, **C.** Hemoglobina, **D.** VCM, **E.** RDW-CV, **F.** CHCM

Tabela 16. Valores descritivos dos parâmetros hematológicos para os grupos expostos ao AF e às PACs durante os períodos frio/seco e quente/úmido. Os valores estão apresentados como média e desvio-padrão

Parâmetros	Ar Filtrado (AF)						Partículas ambientais concentradas (PACs)					
	(a) Frio/seco (n=34)		(b) Quente/úmido (n=39)		(c) Todos (n=73)		(d) Frio/seco (n=39)		(e) Quente/úmido (n=40)		(f) Todos (n=79)	
	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP
1-Eritrócitos (mil/mm ³)	10,18	± 0,47	10,28	± 0,46	10,23	± 0,47	10,50	± 0,63	10,75	± 0,53	10,62	± 0,59
2-Hemoglobina (g/dl)	15,13	± 0,60	15,30	± 0,74	15,22	± 0,68	15,53	± 0,82	15,95	± 0,89	15,74	± 0,87
3-Hematócrito (%)	44,76	± 1,74	45,64	± 1,91	45,23	± 1,87	45,29	± 1,91	46,67	± 2,01	45,99	± 2,07
4-VCM (fl)	43,99	± 1,05	44,41	± 1,03	44,21	± 1,05	43,22	± 1,37	43,45	± 1,20	43,33	± 1,29
5-HCM (pg)	14,86	± 0,29	14,89	± 0,54	14,88	± 0,44	14,81	± 0,27	14,83	± 0,54	14,82	± 0,43
6-CHCM (g/dl)	33,81	± 0,71	33,54	± 1,29	33,67	± 1,06	34,28	± 0,87	34,18	± 1,49	34,23	± 1,21
7-RDW-CV (%)	22,89	± 0,77	21,97	± 1,10	22,40	± 1,06	23,47	± 1,25	22,75	± 1,33	23,10	± 1,33
8- RDW-SD (fl)	28,95	± 1,49	28,13	± 1,67	28,52	± 1,63	29,17	± 1,54	28,23	± 1,56	28,69	± 1,61
9-Plaquetas (mil/mm ³)	890,68	± 220,85	786,29	± 229,20	835,58	± 229,78	979,18	± 226,92	817,63	± 201,47	897,38	± 228,01
10-Reticulócitos (%)	3,19	± 0,83	3,46	± 0,77	3,34	± 0,80	3,03	± 0,86	3,17	± 0,83	3,10	± 0,84
11-Leucocytes (mil/mm ³)	2,89	± 1,33	3,92	± 1,54	3,43	± 1,52	3,19	± 1,38	4,55	± 1,69	3,88	± 1,68
12-PMN (mil/mm ³)	0,31	± 0,21	0,58	± 0,35	0,45	± 0,32	0,37	± 0,32	0,70	± 0,35	0,54	± 0,37
13-Lymphocytes (mil/mm ³)	2,45	± 1,16	3,17	± 1,29	2,83	± 1,28	2,71	± 1,22	3,71	± 1,49	3,22	± 1,44
14-Monócitos (mil/mm ³)	0,10	± 0,16	0,17	± 0,12	0,14	± 0,14	0,11	± 0,12	0,17	± 0,12	0,14	± 0,12

Os grupos foram divididos em: (a) frio/seco-AF; (b) quente/úmido –AF; (c) todos – AF; (d) frio/seco-PACs; (e) quente/úmido –PACs; (f) todos – PACs.
c ≠ f [1, 2, 4 and 7 (p=0,001), 3 (p=0,019) and 6 (p=0,004)]; **d ≠ e** [3 (p=0,003), 7 (p=0,015)];

a ≠ d [1 (p=0,018), 2 (p=0,022), 4 (p=0,010), 6 (p=0,016) and 7 (p=0,021)]; **b ≠ e** [1, 2, 4 (p=0,001), 3 (p=0,024), e 7 (p=0,006)].

4.2.4 Análise histológica pulmonar e imunohistoquímica

Como descrito na Tabela 17, tanto as PACs geradas durante o período frio/seco quanto as PACs geradas durante o período quente/úmido elevaram a densidade numérica de neutrófilos e macrófagos ($p=0,001$), em comparação ao grupo AF. Contudo, o aumento da densidade numérica de neutrófilos ($p=0,001$) foi mais exacerbado no grupo exposto às PACs geradas durante o período frio/seco (Figura 30).

Figura 30. Média ($\pm$ EP) da densidade numérica de células inflamatórias no parênquima pulmonar para os grupos expostos ao AF e às PACs durante os períodos frio/seco e quente/úmido. **A.** PMN, **B.** MNN

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os grupos para a análise da expressão do VCAM-1, ET-Ar e ET-Br nos vasos peribronquiolares (Figura 31, Tabela 18).

Tabela 17. Valores descritivos da densidade numérica de células inflamatórias no parênquima pulmonar para os grupos expostos ao AF e às PACs durante os períodos frio/seco e quente/úmido. Os valores estão apresentados como média e desvio-padrão

Parâmetros ($\cdot 10^5$ cells/mm ²)	Ar filtrado (AF)						Partículas ambientais concentradas (PACs)					
	(a) Frio/seco (n=44)		(b) Quente/úmido (n=44)		(c) Todos (n=88)		(d) Frio/seco (n=46)		(e) Quente/úmido (n=45)		(f) Todos (n=91)	
	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP	Média	± DP
1-PMN	5,36	± 1,68	4,99	± 1,92	5,18	± 1,80	8,67	± 2,10	7,40	± 1,25	8,04	± 1,84
2-MNN	6,99	± 1,11	6,82	± 1,01	6,91	± 1,06	11,38	± 1,45	10,79	± 1,43	11,08	± 1,47

Os grupos foram divididos em: (a) frio/seco-AF; (b) quente/úmido –AF; (c) todos – AF; (d) frio/seco-PACs; (e) quente/úmido –PACs; (f) todos – PACs.
c ≠ f [1, 2 (p=0,001)]; **d ≠ e** [1 (p=0,001)];
a ≠ d [1, 2 (p=0,001)]; **b ≠ e** [1, 2 (p=0,001)].

Tabela 18. Valores descritivos dos parâmetros imunohistoquímicos para os grupos expostos ao AF e às PACs durante os períodos frio/seco e quente/úmido. Os valores estão apresentados como mediana e intervalo interquartil

Parâmetros ($\mu\text{m}/\mu\text{m}^2$)	Ar filtrado (AF)						Partículas ambientais concentradas (PACs)					
	(a) Frio/seco (n=39)		(b) Quente/úmido (n=44)		(c) Todos (n=83)		(d) Frio/seco (n=41)		(e) Quente/úmido (n=44)		(f) Todos (n=84)	
	Mediana	IQR (25-75%)	Mediana	IQR (25-75%)	Mediana	IQR (25-75%)	Mediana	IQR (25-75%)	Mediana	IQR (25-75%)	Mediana	IQR (25-75%)
1-ET-Ar	0,28	0,14 - 0,42	0,16	0,06 - 0,34	0,23	0,10 - 0,36	0,26	0,13 - 0,49	0,14	0,04 - 0,28	0,21	0,07 - 0,36
2- ET-Br	0,63	0,37 - 1,03	0,08	0,03 - 0,27	0,34	0,08 - 0,69	0,56	0,41 - 0,94	0,11	0,04 - 0,23	0,29	0,09 - 0,59
3-VCAM-1	0,09	0,05 - 0,13	0,16	0,11 - 0,23	0,11	0,06 - 0,20	0,07	0,03 - 0,17	0,16	0,11 - 0,27	0,12	0,05 - 0,21

Os grupos foram divididos em: (a) frio/seco-AF; (b) quente/úmido –AF; (c) todos – AF; (d) frio/seco-PACs; (e) quente/úmido –PACs; (f) todos – PACs.

Figura 31. Mediana (IQR:25-75%) da expressão das citocinas nos vasos peribronquiolares para os grupos expostos ao AF e às PACs durante os períodos frio/seco e quente/úmido. **A.** Endotelina-Ar, **B.** Endotelina-Br, **C.** VCAM-1

4.2.5 Sumário dos efeitos

A Tabela 19 descreve os efeitos dos parâmetros avaliados que tiveram diferenças estatisticamente significantes, tais como a responsividade pulmonar obtida pela análise da curva dose-resposta à metacolina (Mch), alterações dos parâmetros sanguíneos, e histologia pulmonar.

Tabela 19. Efeitos no sistema biológico

Sistema	Parâmetros	a	b	c	PACs	
		PACs	Frio/seco	Quente/úmido	Frio/seco	Quente/úmido
Responsividade pulmonar	Penh Basal	—	↑	—	—	—
	Penh 6.25 Mch	—	↑	—	—	—
Hemograma	VCM	↓	↓	↓	—	—
	Eritrócitos	↑	↑	↑	—	—
	Hemoglobina	↑	↑	↑	—	↑
	Hematócrito	↑	—	↑	—	—
	CHCM	↑	↑	—	—	—
	RDW-CV	↑	↑	↑	↑	—
Histologia Pulmonar	Neutrófilos	↑	↑	↑	↑	—
	Macrófagos	↑	↑	↑	—	—

As colunas a, b e c comparou o grupo PACs ao grupo AF. A coluna d comparou o grupo PACs frio/seco versus PACs quente/úmido. Significância: $p < 0,05$.

4.3 Discussão

Uma única exposição a uma concentração relativamente baixa de PACs ($\sim 200 \mu\text{g}/\text{m}^3$) derivadas do bairro Cerqueira César na cidade de São Paulo foi capaz de provocar inflamação pulmonar e alterações na série vermelha sanguínea dos camundongos Balb/C. Os animais expostos às PACs geradas no período frio/seco apresentaram hiperresponsividade pulmonar quando comparados aos animais expostos ao AF. A inflamação pulmonar foi mais acentuada nos animais expostos às PACs geradas no período frio/seco do que nos animais expostos às PACs geradas no período quente/úmido. Note-se que a concentração à que os animais foram expostos, equivale à média diária de

9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, abaixo do nível recomendável pela Organização Mundial de Saúde (25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) (OMS, 2005).

As fontes móveis nos grandes centros urbanos passaram a ter maior participação na emissão de poluentes na atmosfera. Estas podem ser agravadas pelas condições climáticas, que dificultam a dispersão dos poluentes. De acordo com a análise dos componentes principais do $\text{MP}_{2,5}$ originário na cidade de São Paulo, evidencia-se que no período frio/seco a frota de veículos pesados a diesel e o material da crosta terrestre (solo e construção) são os principais causadores da deterioração da qualidade do ar nos grandes centros urbanos. Isso se deve às condições meteorológicas desfavoráveis à dispersão dos poluentes ocorrida nesse período. Em contraste, devido à ação da radiação solar sobre $\text{PM}_{2,5}$ no período seco/úmido, há perpetuação da formação de aerossóis secundários na atmosfera.

Tablin et al. (2012) descreveram uma resposta sistêmica pró-inflamatória e pró-coagulante associada com o aumento da concentração dos metais no $\text{MP}_{0,1}$ e HPA durante o período do inverno, em Fresno, CA. Sabe-se pouco sobre os efeitos sazonais da composição da partícula na cidade de São Paulo, onde as variações de temperatura e umidade são menos intensas quando comparadas às de com outras regiões do mundo.

O efeito das alterações climáticas sobre a composição e o tamanho das partículas na cidade de São Paulo tem sido bem documentado por Albuquerque et al. (2012), que delineiam a influência das condições meteorológicas sob a concentração dos aerossóis em suspensão na atmosfera. Estudos epidemiológicos têm exibido a interação entre poluição do ar e condições meteorológicas associadas com o aumento da mortalidade e

morbidade por doenças respiratórias e cardiovasculares (Gonçalves et al., 2005; Goggins et al. 2013, Meng et al. 2012). Raros estudos experimentais avaliam os efeitos biológicos das partículas geradas em diferentes condições climáticas (Plummer et al. 2012; Tablin et al. 2012).

Nossos resultados mostram que uma curta exposição aguda às partículas ambientais induziram inflamação pulmonar tanto nos animais expostos no período frio/seco quanto no período quente/úmido, com aumento dos neutrófilos e macrófagos no tecido pulmonar. Saldiva et al. (2002), Clarke et al. (1999) e Cassee et al. (2005) descreveram uma correlação positiva entre as concentrações do vanádio e do brometo nas PACs, com o aumento da densidade numérica de neutrófilos nos pulmões de ratos. Maciejczyk et al. (2010) demonstraram uma associação entre a resposta inflamatória pulmonar em ratos com a presença de Mn, Fe, Ni e Pb nas CAPs. Nosso resultados exibem um aumento na densidade numérica de neutrófilos no pulmão dos animais expostos às PACs geradas durante o período frio/seco, o qual foi associado com o aumento da responsividade pulmonar. Especula-se que tais diferenças estejam relacionadas ao aumento da concentração de metais e compostos orgânicos, além da diferença na composição das partículas que ocorre durante esse período (Matsumoto et al. 2010; Albuquerque et al. 2012).

Nossos dados demonstram um aumento da série vermelha sanguínea nos animais expostos às PACs geradas tanto no período frio/seco quanto no período quente/úmido, sugerindo que a estimulação da medula óssea eleva a eritropoietina. A elevação do hematócrito pode gerar aumento da viscosidade sanguínea, contribuindo para a patogênese de eventos cardíacos relacionados à poluição do ar (Yarnell et al, 1991; Ulrich et al, 2002). Estudos têm descrito

que a inalação de partículas ambientais promove significativos efeitos sobre os parâmetros hematológicos (Peters et al, 1995; Gordon et al, 1998; Clarke et al, 2000), sendo que tais efeitos são intimamente relacionados à composição física e química das partículas (Medeiros et al., 2004). Note-se que os efeitos hematológicos evidenciados neste estudo são similares nos dois períodos (frio/seco e quente/úmido).

O aumento das células inflamatórias e dos parâmetros sanguíneos no grupo AF pode ser devido à formação do aerossol secundário (ozônio) gerado durante o período quente/úmido, visto que os animais foram expostos sempre no mesmo horário (das 11h às 12 h, da manhã), o período com maior predominância de luz solar, fator predisponente à formação do aerossol secundário. Ressalta-se que o concentrador de partículas ambientais é um sistema que filtra apenas partículas.

Medeiros et al. (2004) mensuraram os parâmetros sanguíneos e a medula óssea após uma exposição aguda à fuligem da queima de óleo (ROFA) e concluíram que esta aumenta os níveis de reticulócitos no sangue, além de estimular a medula óssea a elevar a produção de eritoblastos. Note-se que o número de células vermelhas circulantes depende da medula óssea, fator importante no entendimento da patogênese das doenças cardíacas relacionadas em episódios de poluição, que induzem alterações na viscosidade sanguínea.

Estudos prévios têm observado que a exposição às partículas ambientais aumenta o número de leucócitos nos camundongos (Rivero et al. 2005), cães (Clarke et al. 2000) e humanos (Schwartz et al. 2001). Adicionalmente, este estudo observou um aumento nos níveis do MCHC e do RDW-CV, que podem

ser associados à inflamação pulmonar. Ressalta-se que o RDW-CV mede a variabilidade do tamanho das células sanguíneas, além de ser um índice de heterogeneidade dos eritrócitos com tipologia imatura (ex: anisocitose) (Casse et al. 2005). Zao et al. (2014) descreveram uma correlação entre o estresse oxidativo e a inflamação pulmonar com o aumento dos níveis do RDW em cães. O mecanismo que promove a liberação das células sanguíneas circulantes pela medula após a exposição às PACs é incerta.

A exposição às PACs não induzirá alterações nos parâmetros preditivos de doença cardiovascular, tais como a FC, VFC e PA, como descrito em estudos prévios de exposição às PACs (Graff et al. 2009), $PM_{2,5}$ (Rivero et al. 2005), partículas do diesel (Brito et al. 2010), e interação entre temperatura e ozônio (Ren et al, 2011; Wu et al, 2013). Similarmente, não foram observadas alterações nas moléculas de adesão e nos valores receptores endoteliais pulmonares. Animais expostos durante o período de 14 dias à poluição atmosférica geraram constrição vascular evidenciada pelo aumento da expressão do ET-Ar (Matsumoto et al., 2010). A ausência de efeitos relacionados à disfunção endotelial em nosso modelo de estudo pode ser relacionada à curta exposição.

É importante notar as limitações do presente estudo. Usamos dados históricos de 2007-2008 para analisar os elementos do MP. Considerando que a qualidade do combustível e a frota veicular não mudaram durante esse período, a utilização dos dados históricos de composição do $MP_{2,5}$ validou nosso estudo. O *cuff* caudal utilizado neste estudo é um sistema de valor limitado para detectar pequenas diferenças da FC, VFC e PA, o que poderia explicar a ausência de diferenças entre os grupos.

Em suma, nossos resultados sugerem que curtas exposições a baixos níveis de PACs induziram modesta, porém significativa inflamação pulmonar e alterações nos parâmetros sanguíneos. Em adição, nossos dados suportam o conceito de que alterações nas condições climáticas modificam levemente a toxicidade da partícula, visto que doses equivalente de PACs geradas durante o período frio/seco produziu uma resposta mais acentuada.

5 CONCLUSÕES

Estudo I: A avaliação dos efeitos locais (pulmonar) e sistêmicos produzidos pela inalação aguda dos gases e partículas da exaustão dos combustíveis diesel e biodiesel em diferentes doses (600 e 1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$), permitiram as seguintes conclusões:

- A exaustão do biodiesel eleva as emissões de NO e NO_2 em relação ao diesel. A fonte emissora dos produtos da exaustão de ambos os combustíveis afetam o tipo e a intensidade da resposta no sistema biológico.
- Houve uma associação positiva entre a exposição a exaustão do biodiesel na dose administrada de 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$ e o aumento da atividade parassimpática. O mesmo efeito foi observado nos animais expostos a exaustão ao diesel em ambas as doses administradas: 600 e 1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$;
- A inflamação sistêmica, evidenciada pelo aumento de linfócitos e reticulócitos, foi positivamente associada com a exposição dos animais as doses administradas de 600 e 1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$ da exaustão do diesel;
- Para o grupo exposto a exaustão do biodiesel na dose administrada de 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$, houve uma resposta inflamatória pulmonar, evidenciada por um infiltrado de neutrófilos no lavado broncoalveolar e no parênquima pulmonar;

- A exposição a exaustão do biodiesel na dose administrada de 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$ está associada a vasoconstrição dos vasos peribronquiolares. A broncoconstrição do epitélio brônquico foi positivamente associada a exaustão dos combustíveis diesel e biodiesel em ambas as doses administradas (600 e 1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$). No epitélio brônquico, o influxo das moléculas de adesão, foram positivamente associadas aos grupos expostos tanto a exaustão do biodiesel (dose: 1200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$) quanto a exaustão do diesel (dose: 600 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$).

Estudo II: Mesmo utilizando uma concentração acumulada de $\text{MP}_{2,5}$ (9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), abaixo do nível médio diário recomendado pela Organização Mundial de Saúde (25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$), as partículas ambientais concentradas geradas durante os diferentes períodos (frio/seco e quente/úmido) desencadearam efeitos similares no sistema pulmonar e hematológico.

- As partículas geradas durante o período frio/seco e quente/úmido não desencadearam alterações na FC, VFC e PA.
- As partículas geradas durante o período frio/seco foram positivamente associadas com a responsividade pulmonar.
- As partículas geradas nos períodos seco/frio e quente/úmido causaram alterações nos parâmetros hematológicos, sugerindo um aumento da viscosidade sanguínea.
- A inflamação pulmonar foi positivamente associada, nos animais expostos, às partículas geradas tanto no período frio/seco como no período quente úmido.

7 REFERÊNCIAS

- Adar SD, Gold DR, Coull BA, Schwartz J, Stone PH, Suh H. Focused exposures to airborne traffic particles and heart rate variability in the elderly. *Epidemiology*. 2007; 18(1):95-03.
- Alander TJ, Leskinen AP, Raunemaa TM, Rantanen L. Characterization of diesel particles: effects of fuel reformulation, exhaust aftertreatment, and engine operation on particle carbon composition and volatility. *Environ Sci Technol*. 2004; 38(9):2707-14.
- Albuquerque TT, Andrade MF, Ynoue RY. Characterization of atmospheric aerosols in the city of São Paulo, Brazil: comparisons between polluted and unpolluted periods. *Environ Monit Assess*. 2012; 184: 969–984.
- Alexis NE, Lay JC, Zeman K, Bennett WE, Peden DB, Soukup JM, Devlin RB, Becker S. Biological material on inhaled coarse fraction particulate matter activates airway phagocytes in vivo in healthy volunteers. *J Allergy Clin Immunol*. 2006; 117: 1396–1403.
- Andrade MD, Miranda RM, Fornaro A, Kerr A, Oyama B, Andre PA, Saldiva P. Vehicle emissions and PM_{2.5} mass concentration in six Brazilian cities. *Air Qual Atmos Health*. 2012; 5: 79–88.
- Agência Nacional do Petróleo. ANP. Resolução ANP nº 43 de 24.12.2008 – DOU 26.12.2008.
- Agência Nacional do Petróleo. ANP. Resolução ANP nº 7 de 19.03.2008 – DOU 20.03.2008.
- Agência Nacional do Petróleo. ANP. Resolução ANP nº 65 de 09.12.2011 – DOU 12.12.2011.
- Agência Nacional do Petróleo. ANP. Resolução ANP nº 14 de 11.05.2012 – DOU 18.05.2012.
- Arantes-Costa FM, Lopes FD, Toledo AC, Magliarelli-Filho PA, Moriya HT, Carvalho-Oliveira R, Mauad T, Saldiva PH, Martins MA. Effects of residual oil fly ash (ROFA) in mice with chronic allergic pulmonary inflammation. *Toxicol Pathol*. 2008;36(5):680-6.
- Batalha JR, Saldiva PH, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GG, Koutrakis P, Godleski JJ. Concentrated ambient air particles induce vasoconstriction of small pulmonary arteries in rats. *Environ Health Perspect*. 2002;110(12):1191-7.

BEN. Balanço Energético Nacional 2013: Ano base 2012 / Empresa de Pesquisa Energética. – Rio de Janeiro : EPE, 2013

Betha R, Balasubramanian R. Emissions of particulate-bound elements from biodiesel and ultra low sulfur diesel: size distribution and risk assessment. *Chemosphere*. 2013; 90(3):1005-15.

Bhavsar TM, Liu X, Cerreta JM, Liu M, Cantor JO. Endothelin-1 potentiates smoke-induced acute lung inflammation. *Exp Lung Res*. 2008; 34(10):707-16.

Biro A, Pallinger E, Major J, Jakab MG, Klupp T, Falus A, Tompa A. Lymphocyte phenotype analysis and chromosome aberration frequency of workers occupationally exposed to styrene, benzene, polycyclic aromatic hydrocarbons or mixed solvents. *Immunol Lett*. 2002; 81, 133–140

Bonvallot V, Baeza-Squiban A, Baulig A, Brulant S, Boland S, Muzeau F, Barouki R, Marano F. Organic compounds from diesel exhaust particles elicit a proinflammatory response in human airway epithelial cells and induce cytochrome p450 1A1 expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001; 25(4):515-21.

Boylen CE, Sly PD, Zosky GR, Larcombe AN. Physiological and inflammatory responses in an anthropomorphically relevant model of acute diesel exhaust particle exposure are sex and dose-dependent. *Inhal Toxicol*. 2011; 23(14): 906–917.

Brito JM, Belotti L, Toledo AC, Antonangelo L, Silva FS, Alvim DS, Andre PA, Saldiva PH, Rivero DH. Acute cardiovascular and inflammatory toxicity induced by inhalation of diesel and biodiesel exhaust particles. *Toxicol Sci*. 2010; 116: 67–78.

Bunger J, Krah J, Baum K, Schroder O, Muller M, Westphal G, Ruhnau P, Schulz TG, Hallier E. Cytotoxic and mutagenic effects, particle size and concentration analysis of diesel engine emissions using biodiesel and petrol diesel as fuel. *Arch Toxicol*. 2000a; 74(8): 490-498.

Camm AJ, Malik M, Bigger JT, et al. Heart rate variability—standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *Circulation*. 1996; 93:1043–1065.

Campen MJ, Babu NS, Helms GA, Pett S, Wernly J, Mehran R, McDonald JD. Nanoparticulate Components of diesel exhaust promote constriction in coronary arteries from ApoE^{-/-} mice. *Toxicol Sci*. 2005; 88(1):95-102.

Capareda SC, Powell J, Parnell C. Engine Performance and Exhaust Emissions of Cottonseed Oil Biodiesel; Beltwide Cotton Conferences: Nashville, TN, 2008.

Carll AP, Hazari MS, Perez CM, Krantz QT, King CJ, Winsett DW, Costa DL, Farraj AK. Whole and particle-free diesel exhausts differentially affect cardiac electrophysiology, blood pressure, and autonomic balance in heart failure-prone rats. *Toxicol Sci*. 2012; 128(2):490-499.

- Carvalho AL, Annoni R, Silva PR, Borelli P, Fock RA, Trevisan MT, Mauad T. Acute, subacute toxicity and mutagenic effects of anacardic acids from cashew (*Anacardium occidentale* Linn.) in mice. *J Ethnopharmacol*. 2011; 135(3):730-736.
- Cassee FR, Boere AJ, Fokkens PH, Leseman DL, Sioutas C, Kooter IM, Dormans JA. Inhalation of concentrated particulate matter produces pulmonary inflammation and systemic biological effects in compromised rats. *J Toxicol Environ Health A*. 2005; 68: 773–796.
- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo - 2012. Cetesb, 125p., São Paulo, 2013.
- Chai M, Lu M, Liang F, Tzillah A, Dendramis N, Watson L. The use of biodiesel blends on a non-road generator and its impacts on ozone formation potentials based on carbonyl emissions. *Environ Pollut*. 2013; 178:159-65.
- Channell MM, Paffett ML, Devlin RB, Madden MC, Campen MJ. Circulating factors induce coronary endothelial cell activation following exposure to inhaled diesel exhaust and nitrogen dioxide in humans: evidence from a novel translational in vitro model. *Toxicol Sci*. 2012;127(1):179-86.
- Cheung KL, Polidori A, Ntziachristos L, Tzamkiozis T, Samaras Z, Cassee FR, Gerlofs M, Sioutas C. Chemical characteristics and oxidative potential of particulate matter emissions from gasoline, diesel, and biodiesel cars. *Environ Sci Technol*. 2009; 43(16):6334-40.
- Clarke RW, Catalano P, Murthy GG, Koutrakis P, Wolfson M, Sioutas C, Godleski JJ. Pulmonary function and inflammatory response alterations following inhalation of concentrated urban air. *Inhal Toxicol*. 1999; 11: 101–120.
- Clarke RW, Coull B, Reinisch U, Catalano P, Killingsworth CR, Koutrakis P, Kavouras I, Murthy GG, Lawrence J, Lovett E, Wolfson JM, Verrier RL, Godleski JJ. Inhaled concentrated ambient particles are associated with hematologic and bronchoalveolar lavage changes in canines. *Environ Health Perspect*. 2000; 108: 1179–1187.
- Conselho Nacional do Meio Ambiente. CONAMA. Resolução 03 de 28.06.1990. Estabelece padrões para a qualidade do ar. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 20.08.1990.
- Conselho Nacional do Meio Ambiente. CONAMA. Resolução 315 de 29.10.2002. Estabelece limites máximos de emissão de poluentes para os motores destinados a veículos pesados novos, nacionais e importados. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 29.10.2002.
- Conselho Estadual do Meio Ambiente. CONSEMA. Deliberação CONSEMA 25/2012. Disponível em: <<http://www.ambiente.sp.gov.br/consema/files/2012/04/DEL25.pdf>>. Acesso em: 05 Jan. 2014.

Davel AP, Lemos M, Pastro LM, Pedro SC, de André PA, Hebeda C, Farsky SH, Saldiva PH, Rossoni LV. Endothelial dysfunction in the pulmonary artery induced by concentrated fine particulate matter exposure is associated with local but not systemic inflammation. *Toxicology*. 2012; 295(1-3):39-46.

Di Y, Cheung CS, Huang Z. Experimental investigation on regulated and unregulated emissions of a diesel engine fueled with ultra-low sulfur diesel fuel blended with biodiesel from waste cooking oil. *Sci Total Environ*. 2009; 407(2):835-846.

Diaz EA, Chung Y, Papapostolou V, Lawrence J, Long MS, Hatakeyama V, Gomes B, Calil Y, Sato R, Koutrakis P, Godleski JJ. Effects of fresh and aged vehicular exhaust emissions on breathing pattern and cellular responses--pilot single vehicle study. *Inhal Toxicol*. 2012; 24:288-295.

Dolhnikoff M, da Silva LF, de Araujo BB, Gomes HA, Ferneztian S, Mulder A, Lindeman JH, Mauad T. The outer wall of small airways is a major site of remodeling in fatal asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2009; 123(5):1090-1097.

Dubowsky SD. Diabetes, obesity, and hypertension may enhance associations between air pollution and markers of systemic inflammation. *Environ Perspect Health*. 2006;114:992-998.

Environmental Protection Agency. EPA. Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons. US department of health and human services. 1995.

Environmental Protection Agency. EPA. A comprehensive analysis of biodiesel impacts on exhaust emissions. Estados Unidos: US EPA, 2002. 420-P-02-001.

Environmental Protection Agency. EPA. Particle pollution and your health. Estados Unidos: US EPA, 2006. 2p. folheto informativo em arquivo pdf.

Ergul A, Portik-Dobos V, Giulumian AD, Molero MM, Fuchs LC. Stress upregulates arterial matrix metalloproteinase expression and activity via endothelin A receptor activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 285:H2225-H2232.

Fajersztajn L, Veras M, Barrozo LV, Saldiva P. Air pollution: a potentially modifiable risk factor for lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13(9):674-678.

Finch GL, Hobbs CH, Blair LF, Barr EB, Hahn FF, Jaramillo RJ, Kubatko JE, March TH, White RK, Krone JR, Ménache MG, Nikula KJ, Mauderly JL. Effects os subchronic inhalation exposure of rats to emissions from a diesel engine burning soybean oil-derived biodiesel fuel. *Inhal Toxicol*. 2002; 14:1017-1048.

Fukagawa NK, Li M, Poynter ME, Palmer BC, Parker E, Kasumba J, Holmén BA. Soy biodiesel and petrodiesel emissions differ in size, chemical composition and stimulation of inflammatory responses in cells and animals. *Environ Sci Technol*. 2013; 47(21):12496-12504.

- Galis ZS, Khatri JJ. Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherosclerosis: The good, the bad and the ugly. *Circ Res*. 2002; 90:251–262.
- Garshick E, Laden F, Hart JE, Rosner B, Smith TJ, Dockery DW, Speizer FE. Lung cancer in railroad workers exposed to diesel exhaust. *Environ Perspect Health*. 2004; 112(15):1539-1543.
- Geris R, Santos NAC, Amaral BA, Maia IS, Castro VD, Carvalho JRM. Biodiesel de soja - reação de transesterificação para aulas práticas de química orgânica. *Quím Nova*. 2007; 30:35.
- Gilmour PS, Brown DM, Lindsay TG, Beswick PH, MacNee W, Donaldson K. Adverse health-effects of PM₁₀ particles: involvement of iron in generation of hydroxyl radical. *Occup Environ Med*. 1996; 53:817-822.
- Godleski JJ, Rohr AC, Coull BA, Kang CM, Diaz EA, Koutrakis P. Toxicological evaluation of realistic emission source aerosols (TERESA): summary and conclusions. *Inhal Toxicol*. 2011; 2:95–103.
- Goggins WB, Chan EYY, Yang CY. Weather, pollution, and acute myocardial infarction in Hong Kong and Taiwan. *Int J Cardiol*. 2013; 20:243–249.
- Gonçalves FL, Carvalho LM, Conde FC, Latorre MR, Saldiva PH, Braga AL. The effects of air pollution and meteorological parameters on respiratory morbidity during the summer in São Paulo City. *Environ Int*. 2005; 31:343–349.
- Gordon T, Nadziejko C, Schlesinger R, Chen LC. Pulmonary and cardiovascular effects of acute exposure to concentrated ambient particulate matter in rats. *Toxicol Lett*. 1998; 96-97:285–288.
- Goto Y, Hogg JC, Shih CH, Ishii H, Vincent R, van Eeden SF. Exposure to ambient particles accelerates monocyte release from bone marrow in atherosclerotic rabbits. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004; 287(1):L79-L85.
- Graboski MS, McCormick RL, Alleman TL, Herring AM. The Effect of Biodiesel Composition on Engine Emissions from a DDC Series 60 Diesel Engine. NREL/SR-510-31461. Golden, CO:Colorado Institute for Fuels and Engine Research, Colorado School of Mines. 2003.
- Graff DW, Cascio WE, Rappold A, Zhou H, Huang YC, Devlin RB. Exposure to concentrated coarse air pollution particles causes mild cardiopulmonary effects in healthy young adults. *Environ Perspect Health*. 2009; 117:1089–1094.
- Hazari MS, Haykal-Coates N, Winsett DW, Krantz QT, King C, Costa DL, Farraj AK. TRPA1 and sympathetic activation contribute to increased risk of triggered cardiac arrhythmias in hypertensive rats exposed to diesel exhaust. *Environ Perspect Health*. 2011; 119(7):951-957.
- Hemmingsen JG, Møller P, Nøjgaard JK, Roursgaard M, Loft S. Oxidative stress, genotoxicity, and vascular cell adhesion molecule expression in cells exposed to particulate matter from combustion of conventional diesel and methyl ester biodiesel blends. *Environ Sci Technol*. 2011; 45(19):8545-8551.

Holder AL, Lucas D, Goth-Goldstein R, Koshland CP. Inflammatory response of lung cells exposed to whole, filtered, and hydrocarbon denuded diesel exhaust. *Chemosphere*. 2007; 70(1):13-19.

Hotta H, Lazar J, Orman R, Koizumi K, Shiba K, Kamran H, Stewart M. Vagus nerve stimulation-induced bradyarrhythmias in rats. *Auton Neurosci*. 2009; 151:98–105.

Huang CH, Lin LY, Tsai MS, Hsu CY, Chen HW, Wang TD, Chang WT, Cheng TJ, Chen WJ. Acute cardiac dysfunction after short-term diesel exhaust particles exposure. *Toxicol Lett*. 2010; 192(3):349-355.

International Agency for Research on Cancer. IARC. Solar and Ultraviolet Radiation. Volume 55. Lyon: Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 1992

International Agency for Research on Cancer. IARC. Some Non-heterocyclic Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Some Related Exposures. Volume 92. Lyon: Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2010

International Agency for Research on Cancer. IARC. Diesel engine exhaust carcinogenic. Press Release Number 213. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2012

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Ministério do Planejamento. IBGE, 2013 Cidades. Disponível em: www.ibge.gov.br/cidades/default.php. Acesso em: 01 Fev. 2014.

Institute for Laboratory Animal Research. ILAR. Behavioral Research Outside the Laboratory. 2003; 44:185–248.

Inventário Nacional de Emissões Atmosféricas por Veículos Automotores Rodoviários, 2011. Disponível em: http://www.mma.gov.br/estruturas/163/_publicacao/163_publicacao27072011055200.pdf. Acesso em: 06 Abril. 2014.

Ishii H, Fujii T, Hogg JC, Hayashi S, Mukae H, Vincent R, van Eeden SJ. Contribution of IL-1 beta and TNFalpha to the initiation of the peripheral lung response to atmospheric particles (PM10). *Am J Physiol Lung Cel Mol Physiol*. 2004; 287:L176–L183.

Jalava PI, Tapanainen M, Kuusalo K, Markkanen A, Hakulinen P, Happonen MS, Pennanen AS, Ihalainen M, Yli-Pirilä P, Makkonen U, Teinilä K, Mäki-Paakkanen J, Salonen RO, Jokiniemi J, Hirvonen MR. Toxicological effects of emission particles from fossil- and biodiesel-fueled diesel engine with and without DOC/POC catalytic converter. *Inhal Toxicol*. 2010; 22 Suppl 2:48-58.

Jalava PI, Aakko-Saksa P, Murtonen T, Happonen MS, Markkanen A, Yli-Pirilä P, Hakulinen P, Hillamo R, Mäki-Paakkanen J, Salonen RO, Jokiniemi J, Hirvonen MR. Toxicological properties of emission particles from heavy duty engines powered by conventional and bio-based diesel fuels and compressed natural gas. *Part Fibre Toxicol*. 2012; 9:37.

- Kafoury RM, Kelley J. Ozone enhances diesel exhaust particles (DEP)-induced interleukin-8 (IL-8) gene expression in human airway epithelial cells through activation of nuclear factors- kappaB (NF-kappaB) and IL-6 (NF-IL6). *J Environ Res Public Health*. 2005; 2(3-4):403-410.
- Karakaya, A., Ates, I. & Yucesoy, B. Effects of occupational polycyclic aromatic hydrocarbon exposure on T-lymphocyte functions and natural killer cell activity in asphalt and coke oven workers. *Hum Exp Toxicol*. 2004; 23:317–322.
- Karavalakis G, Tzirakis E, Mattheou L, Stournas S, Zannikos F, Karonis D. The impact of using biodiesel/marine gas oil blends on exhaust emissions from a stationary diesel engine. *J Environ Sci Saúde A Tox Hazard Subst Ambiente Eng*. 2008; 43:1663-1672.
- Karavalakis G, Fontaras G, Ampatzoglou D, Kousoulidou M, Stournas S, Samaras Z, Bakeas E. Effects of low concentration biodiesel blends application on modern passenger cars. Part 3: impact on PAH, nitro-PAH, and oxy-PAH emissions. *Environ Pollut*. 2010;158(5):1584-1594.
- Karavalakis G, Boutsika V, Stournas S, Bakeas E. Biodiesel emissions profile in modern diesel vehicles. Part 2: Effect of biodiesel origin on carbonyl, PAH, nitro-PAH and oxy-PAH emissions. *Sci Total Environ*. 2011; 409(4):738-747.
- Karthikeyan S, Thomson EM, Kumarathasan P, Guénette J, Rosenblatt D, Chan T, Rideout G, Vincent R. Nitrogen dioxide and ultrafine particles dominate the biological effects of inhaled diesel exhaust treated by a catalyzed diesel particulate filter. *Toxicol Sci*. 2013;135(2):437-450.
- Kegl B. Effects of biodiesel on emissions of a bus diesel engine. *Bioresour Techno*. 2008; 99:863-873.
- Knuckles TL, Lund AK, Lucas SN, Campen MJ. Diesel exhaust exposure enhances venoconstriction via uncoupling of eNOS. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008; 230:346–351.
- Krishnan RM, Sullivan JH, Carlsten C, Wilkerson HW, Beyer RP, Bammler T, Farin F, Peretz A, Kaufman JD. A randomized cross-over study of inhalation of diesel exhaust, hematological indices, and endothelial markers in humans. *Part Fibre Toxicol*. 2013; 10:7.
- Lapuerta M, Armas O, Rodríguez-Fernández J. Effect of biodiesel fuels on diesel engine emissions. *Prog Energy Combust Sci*. 2008a; 34:198-223.
- Lewis JA, Rao KM, Castranova V, Vallyathan V, Dennis WE, Knechtges PL. Proteomic analysis of bronchoalveolar lavage fluid: effect of acute exposure to diesel exhaust particles in rats. *Environ Perspect Health*. 2007;115(5):756-763.
- Li N, Sioutas C, Cho A, Schmitz D, Misra C, Sempf J, Wang MY, Oberley T, Froines J, Nel A. Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ Perspect Health*. 2003; 111:455–460.

Lin CY, Lin HA. Diesel engine performance and emission characteristics of biodiesel characteristics of biodiesel produced by the peroxidation process. *Fuel*. 2006; 85:298-305.

Li-ren D, Kai W, Fahmy B, Hua-hao S, Stephania C. Airborne fine particulate matter induced pulmonary inflammation as well as oxidative stress in neonate rats. *Chin Med J*. 2010;123(20):2895-2900.

Lowe GDO. Can hematological tests predict cardiovascular risk? The 2005 Kettle Lecture. *Br J Haematol*. 2006; 133:232-250.

Lund AK, Lucero J, Lucas S, Madden MC, McDonald JD, Seagrave JC, Knuckles TL, Campen MJ. Vehicular emissions induce vascular MMP-9 expression and activity associated with endothelin-1-mediated pathways. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009; 29(4):511-517.

Maatz LF, Wood, GJA, Rivero DHRF, Saldiva PHN. Tracheal instillation of urban PM_{2.5} suspension promotes acute cardiac polarization changes in rats. *Brazilian J Med Biol Research*. 2009; 42:207-213.

Maciejczyk,P, Chen LC. Effects of subchronic exposures to concentrated ambient particles (CAPs) in mice. VIII. Source-related daily variations in vitro responses to CAPS. *Inhal Toxicol*. 2005; 17:243–253.

Maciejczyk P, Zhong M, Lippmann M, Chen LC. Oxidant generation capacity of source-apportioned PM_{2.5}. *Inhal Toxicol*. 2010; 2:29–36.

Madrigano J, Baccarelli A, Wright RO, Suh H, Sparrow D, Vokonas PS, Schwartz J. Air pollution, obesity, genes and cellular adhesion molecules. *Occup Environ Med*. 2010; 67(5):312-317.

Mapa da Exclusão/Inclusão Social, segundo a Qualidade de Vida no Município de São Paulo, 2002. Disponível em: <http://www9.prefeitura.sp.gov.br/sempla/mm/mapas/indice4_4.pdf>. Acesso em: 10 Março. 2014.

Martins LC, Latorre Mdo R, Saldiva PH, Braga AL. Air pollution and emergency room visits due to chronic lower respiratory diseases in the elderly: an ecological time-series study in São Paulo, Brazil. *J Occup Environ Med*. 2002; 44(7):622-627.

Matsumoto G, Nakagawa NK, Vieira RP, Mauad T, da Silva LF, de André CD, Carvalho-Oliveira R, Saldiva PH, Garcia ML. The time course of vasoconstriction and endothelin receptor A expression in pulmonary arterioles of mice continuously exposed to ambient urban levels of air pollution. *Environ Res*. 2010;110(3):237-243.

Mauad T, Rivero DH, Oliveira RC, Lichtenfels AJ, Guimarães ET, Andre PA, Kasahara DI, Bueno HM, Saldiva PH. exposure to ambient levels of urban particles affects mouse lung development. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008; 178:721-728.

- Mazzoli-Rocha F, Magalhães CB, Malm O, Saldiva PH, Zin WA, Faffe DS. Comparative respiratory toxicity of particles produced by traffic and sugar cane burning. *Environ Res.* 2008; 108(1):35-41.
- Mazzoli-Rocha F, Carvalho GM, Lanzetti M, Valença SS, Silva LF, Saldiva PH, Zin WA, Faffe DS. Respiratory toxicity of repeated exposure to particles produced by traffic and sugar cane burning. *Respir Physiol Neurobiol.* 2014; 191:106-113.
- McCormick RL. The impact of biodiesel on pollutant emissions and public health. *Inhal Toxicol.* 2007; 19(12):1033-1039.
- Medeiros NJr, Rivero DH, Kasahara DI, Saiki M, Godleski JJ, Koutrakis P, Capelozzi VL, Saldiva PH, Antonangelo L. Acute pulmonary and hematological effects of two types of particle surrogates are influenced by their elemental composition. *Environ Res.* 2004; 95:62–70.
- Meng X, Zhang Y, Zhao Z, Duan X, Xu X, Kan H. Temperature modifies the acute effect of particulate air pollution on mortality in eight Chinese cities. *Sci Total Environ.* 2012; 1:215–221.
- Miranda RM, Andrade MF, Fornaro A, Astolfo R, Andre PA, Saldiva P. Urban air pollution: a representative survey of PM(2.5) mas concentrations in six Brazilian cities. *Air Qual Atmos Health.* 2012; 5:63–77.
- Mundandhara SD, Becker S, Madden MC. Effects of diesel exhaust particles on human alveolar macrophage ability to secrete inflammatory mediators in response to lipopolysaccharide. *Toxicol In Vitro.* 2005; 20:614–624.
- Nemmar A, Al-Maskari S, Ali BH, Al-Amri IS. Cardiovascular and lung inflammatory effects induced by systemically administered diesel exhaust particles in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007; 292:L664–L670.
- Nemmar A, Dhanasekaran S, Yasin J, Ba-Omar H, Fahim MA, Kazzam EE, Ali BH. Evaluation of the direct systemic and cardiopulmonary effects o f diesel particles in spontaneously hypertensive rats. *Toxicology.* 2009; 262:50-56.
- Nemmar A, Al-Salam S, Zia S, Marzouqi F, Al-Dhaheiri A, Subramaniyan D, Dhanasekaran S, Yasin J, Ali BH, Kazzam EE. Contrasting actions of diesel exhaust particles on the pulmonary and cardiovascular systems and the effects of thymoquinone. *Br J Pharmacol.* 2011; 164(7):1871-1882.
- Nemmar A, Al-Salam S, Subramaniyan D, Yasin J, Yuvaraju P, Beegam S, Ali BH. Influence of experimental type 1 diabetes on the pulmonary effects of diesel exhaust particles in mice. *Toxicol Lett.* 2013; 217(2):170-176.
- Oh E, Lee E, Im H, Kang,HS, Jung WW, Won NH, Kim EM, Sul D. Evaluation of immuno- and reproductive toxicities and association between immunotoxicological and genotoxicological parameters in waste incineration workers. *Toxicology.* 2005; 210:65–80.

Organização Mundial de Saúde. Diretrizes de qualidade do ar. OMS. Global update 2005. Disponível em: <<http://www.euro.who.int/Document/E90038.pdf>>. Acesso em: 10 Out. 2013.

Organização Mundial de Saúde. OMS. Diretrizes de qualidade do ar para material particulado, ozônio, dióxido de nitrogênio e dióxido de enxofre. 2005.

Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD. Environmental Outlook to 2050: The Consequences of Inaction". 2012. Disponível em: <<http://www.oecdbookshop.org/oecd/display.asp?sf1=identifiers&st1=9789264122161>>. Acesso em: 10 Abril. 2014.

Papapostolou V, Lawrence JE, Diaz EA, Wolfson JM, Ferguson ST, Long MS, Godleski JJ, Koutrakis P. Laboratory evaluation of a prototype photochemical chamber designed to investigate the health effects of fresh and aged vehicular exhaust emissions. *Inhal Toxicol*. 2011; 23:495–505.

Pereira CEL, Heck TG, Saldiva PHN, Rhoden CR. Ambient particulate air pollution from vehicles promotes lipid peroxidation and inflammatory responses in rat lung. *Braz J Med Biol Res*. 2007; 40:1353-1359.

Pereira FA, Lemos M, Mauad T, Assunção JV, Saldiva PH. Urban, traffic-related particles and lung tumors in urethane treated mice. *Clinics* (Sao Paulo). 2011; 66(6):1051-1054.

Peters A, Doring A, Wichmann HE, Koenig W. Increased plasma viscosity during an air pollution episode: a link to mortality. *Lancet*. 1995; 349:1582–1587.

Plummer LE, Ham W, Kleeman MJ, Wexler A, Pinkerton KE. Influence of season and location on pulmonary response to California's San Joaquin Valley airborne particulate matter. *J Toxicol Environ Health A*. 2012; 75:253–271.

Ren C, O'Neill MS, Park SK, Sparrow D, Vokonas P, Schwartz J. Ambient temperature, air pollution, and heart rate variability in an aging population. *Am J Epidemiol*. 2011; 73:1013–1021.

Renewables Global Status Report, 2013. REN21. Disponível em: <http://www.ren21.net/portais/o/documents/resources/GSR/2013/GSR2013_low_ers.pdf>. Acesso em: 01 Fev. 2014.

Riva DR, Magalhães CB, Lopes AA, Lanças T, Mauad T, Malm O, Valença SS, Saldiva PH, Faffe DS, Zin WA. Low dose of fine particulate matter (PM_{2.5}) can induce acute oxidative stress, inflammation and pulmonary impairment in healthy mice. *Inhal Toxicol*. 2011; 23(5):257-267.

Rivero DHRF, Sasaki C, Lorenzi-Filho G, Saldiva PHN. PM_{2.5} induces acute electrocardiographic alterations in healthy rats. *Environ Res*. 2005; 99(2):262-266.

Rückerl R, Phipps RP, Schneider A, Frampton M, Cyrus J, Oberdörster G, Wichmann HE, Peters A. Ultrafine particles and platelet activation in patients with coronary heart disease--results from a prospective panel study. *Part Fibre Toxicol.* 2007; 4:11.

Saldiva PH, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GG, Diaz E, Koutrakis P, Suh H, Tsuda A, Godleski JJ. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165(12):1610-1617.

Savage ST, Lawrence J, Katz T, Stearns RC, Coull BA, Godleski JJ Does the Harvard/U.S. Environmental Protection Agency Ambient Particle Concentrator change the toxic potential of particles? *J Air Waste Manag Assoc.* 2003; 53(9):1088-1097.

Salvi S, Blomberg A, Rudell B, Kelly F, Sandstrom T, Holgate ST, Frew A. Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999; 159:702-709.

Saxena QB, Saxena RK, Siegel PD, Lewis DM. Identification of organic fractions of diesel exhaust particulate (DEP) which inhibit nitric oxide (NO) production from a murine macrophage cell line. *Toxicol.Lett.* 2003; 143:317-322.

Sawyer K, Mundandhara S, Ghio AJ, Madden MC. The effects of ambient particulate matter on human alveolar macrophage oxidative and inflammatory responses. *J Toxicol Environ Health A.* 2010; 73(1):41-57.

Schwartz J. Air pollution and blood markers of cardiovascular risk. *Environ Health Perspect.* 2001; 109(3):405-409.

Sexton KG, Jeffries HE, Jang M, Kamens RM, Doyle M, Voicu I. Photochemical Products in Urban Mixtures Enhance Inflammatory Responses in Lung Cells. *Inhal Toxicol.* 2004; 16:107-114.

Shvedova AA, Yanamala N, Murray AR, Kisin ER, Khaliullin T, Hatfield MK, Tkach AV, Krantz QT, Nash D, King C, Ian Gilmour M, Gavett SH. Oxidative stress, inflammatory biomarkers, and toxicity in mouse lung and liver after inhalation exposure to 100% biodiesel or petroleum diesel emissions. *J Toxicol Environ Health A.* 2013; 76(15):9079-21.

Sioutas C, Koutrakis P, Burton RM. A technique to expose animals to concentrated fine ambient aerosols. *Environ Perspect Health.* 1995; 103:172-177.

Silverman DT, Samanic CM, Lubin JH, Blair AE, Stewart PA, Vermeulen R, Coble JB, Rothman N, Schleiff PL, Travis WD, Ziegler RG, Wacholder S, Attfield MD. The Diesel Exhaust in Miners study: a nested case-control study of lung cancer and diesel exhaust. *J Natl Cancer Inst.* 2012; 104(11):855-868.

Solomon PA, Sioutas C. Continuous and semicontinuous monitoring techniques for particulate matter mass and chemical components: a synthesis of findings from EPA's Particulate Matter Supersites Program and related studies. *J Air Waste Manag Assoc.* 2008; 58(2):164-195.

Song WW, He KB, Wang JX, Wang XT, Shi XY, Yu C, Chen WM, Zheng L. Emissions of EC, OC, and PAHs from Cottonseed Oil Biodiesel in a Heavy-Duty Diesel Engine. *Environ Sci Technol.* 2011; 45:6683–6689.

Spiers JP, Kelso EJ, Siah WF, Edge G, Song G, McDermott BJ, Hennessy M. Alterations in vascular matrix metalloproteinase due to ageing and chronic hypertension: effects of endothelin receptor blockade. *J Hypertens.* 2005; 23:1717–1724.

Standiford TJ, Kunkel, Strieter RM. Interleukin-8: a major mediator of acute pulmonary inflammation. *Reg Immunol.* 1993; 5:134-141.

Stenfors N, Nordenhäll C, Salvi SS, Mudway I, Söderberg M, Blomberg A, Helleday R, Levin JO, Holgate ST, Kelly FJ, Frew AJ, Sandström T. Different airway inflammatory responses in asthmatic and healthy humans exposed to diesel. *Eur Respir J.* 2004; 23(1):82-86.

Strieter RM. Interleukin-8: a very important chemokine of the human airway epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002; 283:1688-689.

Surawski NC, Miljevic B, Ayoko GA, Roberts BA, Elbagir S, Fairfull-Smith KE, Bottle SE, Ristovski ZD. Physicochemical characterization of particulate emissions from a compression ignition engine employing two injection technologies and three fuels. *Environ Sci Technol.* 2011; 45(13):5498-5505.

Tablin F, Den Hartigh LJ, Aung HH, Lamme MW, Kleeman MJ, Ham W, Norris JW, Pombo M, Wilson DW. Seasonal influences on CAPs exposures: differential responses in platelet activation, serum cytokines and xenobiotic gene expression. *Inhal Toxicol.* 2012; 24:506–517.

Tamagawa E, Bai N, Morimoto K, Gray C, Mui T, Yatera K, Zhang X, Xing L, Li Y, Laher I, Sin DD, Man SF, van Eeden SF. Particulate matter exposure induces persistent lung inflammation and endothelial dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2008; 295(1):L79-L85.

Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurements, physiological interpretation, and clinical use. *Circulation.* 1996; 93:1043-1065.

Törnqvist H, Mills NL, Gonzalez M, Miller MR, Robinson SD, Megson IL, Macnee W, Donaldson K, Söderberg S, Newby DE, Sandström T, Blomberg A. Persistent endothelial dysfunction in humans after diesel exhaust inhalation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 176(4):395-400.

- Totlandsdal AI, Cassee FR, Schwarze P, Refsnes M, Låg M. Diesel exhaust particles induce CYP1A1 and pro-inflammatory responses via differential pathways in human bronchial epithelial cells. *Part Fibre Toxicol*. 2010; 7:41.
- Totlandsdal AI, Herseth JI, Bølling AK, Kubátová A, Braun A, Cochran RE, Refsnes M, Ovrevik J, Låg M. Differential effects of the particle core and organic extract of diesel exhaust particles. *Toxicol Lett*. 2012; 208:262-268.
- Tsai JH, Chen SJ, Huang KL, Lin YC, Lee WJ, Lin CC, Lin WY. PM, carbon, and PAH emissions from a diesel generator fuelled with soy-biodiesel blends. *J Hazard Mater*. 2010; 179(1-3):237-243.
- Tsai JH, Chen SJ, Huang KL, Lin WY, Lee WJ, Chao HR, Lin CC, Hsieh LT. Emission reduction of NO_x, PM, PM-carbon, and PAHs from a generator fuelled by biodieselhol. *J Hazard Mater*. 2014; 274C:349-359.
- Tsuji H, Larson MG, Venditti FJ Jr, Manders ES, Evans JC, Feldman CL, Levy D. Impact of reduced heart rate variability on risk for cardiac events—the Framingham Heart Study. *Circulation*. 1996; 94:2850–2855.
- Tzamkiozis T, Stoeger T, Cheung K, Ntziachristos L, Sioutas C, Samaras Z. Monitoring the inflammatory potential of exhaust particles from passenger cars in mice. *Inhal Toxicol*. 2010; 22 Suppl 2:59-69.
- Ulrich MM, Alink GM, Kumarathasan P, Vincent R, Boere AJ, Cassee FR. Health effects and time course of particulate matter on the cardiopulmonary system in rats with lung inflammation. *J Toxicol Environ Health A*. 2002; 65(20):1571-1595.
- Van Eeden SF, Hogg JC. Systemic inflammatory response induced by particulate matter air pollution: the importance of bone-marrow stimulation. *J Toxicol Environ Health A*. 2002; 65(20):1597-1613.
- Vasconcelos PC, Artaxo P, Ciccioli P, Cecinato A, Brancaleoni E, Frattoni M. Determinação dos Hidrocarbonetos Saturados e Policíclicos Aromáticos Na Atmosfera Amazonica. *Química Nova*. 1998; 21(4):385-393.
- Vasconcellos PC, Souza DZ, Sanchez-Ccoyllo O, Bustillos JO, Lee H, Santos FC, Nascimento KH, Araújo MP, Saarnio K, Teinilä K, Hillamo R. Determination of anthropogenic and biogenic compounds on atmospheric aerosol collected in urban, biomass burning and forest areas in São Paulo, Brazil. *Sci Total Environ*. 2010; 408:5836–5844.
- Vieira RP, Toledo AC, Silva LB, Almeida FM, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, Santos AB, Rivero DH, Hizume DC, Lopes FD, Olivo CR, Castro-Faria-Neto HC, Martins MA, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Anti-inflammatory effects of aerobic exercise in mice exposed to air pollution. *Med Sci Sports Exerc*. 2012; 44(7):1227-1234.

Xia T, Korge P, Weiss JN, Li N, Venkatesen MI, Sioutas C, Nel A. Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity. *Environ Health Perspect.* 2004; 112(14):1347-1358.

Zhang P, Summer WR, Pagby GJ, Nelson S. Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol Rev.* 2000; 173:39–51.

Zhang J, Defelice AF, Hanig JP, Colatsky T. Biomarkers of endothelial cell activation serve as potential surrogate markers for drug-induced vascular injury. *Toxicol Pathol.* 2010; 38:856-871.

Zhang P, Dong G, Sun B, Zhang L, Chen X, Ma N, Yu F, Guo H, Huang H, Lee YL. Long-term exposure to ambient air pollution and mortality due to cardiovascular disease and cerebrovascular disease in Shenyang, China. *PLoS One.* 2011; 6:e20827.

Zao Z, Liu T, Li J, Yang W, Liu E, Li G. Elevated red cell distribution width level is associated with oxidative stress and inflammation in a canine model of rapid atrial pacing. *Int J Cardiol.* 2014; 174(1):174-176.

Zin WA, Silva AG, Magalhães CB, Carvalho GM, Riva DR, Lima CC, Leal-Cardoso JH, Takiya CM, Valença SS, Saldiva PH, Faffe DS. Eugenol attenuates pulmonary damage induced by diesel exhaust particles. *J Appl Physiol.* 2012; 112(5):911-7.

Zou L, Atkinson S. Characterising vehicle emissions from the burning of biodiesel made from vegetable oil. *Environ Technol.* 2003; 24(10):1253-1260.

Wang X, Cheung CS, Di Y, Huang Z. Diesel engine gaseous and particle emissions fueled with diesel–oxygenate blends. *Fuel.* 2011.

World Bank. Indicator of PM10 on countries. Disponível em: <<http://data.worldbank.org/indicator/EN.ATM.PM10.MC.M3/countries/1W-IN-CN-BR-US-EU?display=map>>. Acesso em: 10 Mar. 2014.

Wu W, Peden DB, McConnell R, Fruin S, Diaz-Sanchez D. Glutathione-S-transferase M1 regulation of diesel exhaust particle-induced pro-inflammatory mediator expression in normal human bronchial epithelial cells. *Part Fibre Toxicol.* 2012; 9:31.

Wu S, Deng F, Liu Y, Shima M, Niu J, Huang Q, Guo X. Temperature, traffic-related air pollution, and heart rate variability in a panel of healthy adults. *Environ Res.* 2013; 120:82–89.

Yanamala N, Hatfield MK, Farcas MT, Schwegler-Berry D, Hummer JA, Shurin MR, Birch ME, Gutkin DW, Kisin E, Kagan VE, Bugarski AD, Shvedova AA. Biodiesel versus diesel exposure: Enhanced pulmonary inflammation, oxidative stress, and differential morphological changes in the mouse lung. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013; 272(2):373-383.

Yarnell J, Baker I, Sweetnam P, Bainton D, O'Brien P. Fibrinogen, viscosity and white cell count are major risk factors for ischaemic heart disease. *Circulation*. 1991; 83:836–844.

Yoshizaki K, Brito JM, Toledo AC, Nakagawa NK, Piccin VS, Junqueira MS, Negri EM, Carvalho AL, Oliveira AP, Lima WT, Saldiva PH, Mauad T, Macchione M. Subchronic effects of nasally instilled diesel exhaust particulates on the nasal and airway epithelia in mice. *Inhal Toxicol*. 2010; 22(7):610-617.

Yuan CS, Lin HY, Lee WJ, Lin YC, Wu TS, Chen KF. A new alternative fuel for reduction of polycyclic aromatic hydrocarbon and particulate matter emissions from diesel engines. *Air Waste Manag Assoc*. 2007; 57(4):465-471.

APROVAÇÃO

O Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **26.06.13**, **APROVOU AS MUDANÇAS ABAIXO** do Protocolo de Pesquisa nº 149/10 intitulado: **"Caracterização do aerossol secundário da queima do diesel e biodiesel, e o efeito destas emissões no sistema cardiopulmonar de camundongos Balb/C"**, apresentado pelo Departamento de **Patologia**.

- Mudança de título de: **Caracterização do aerossol secundário da queima do diesel e biodiesel, e o efeito destas emissões no sistema cardiopulmonar de camundongos Balb/C** para: **Avaliação das partículas urbanas concentradas e da exaustão do diesel e biodiesel sobre o perfil hemodinâmico, inflamatório pulmonar e sistêmico.**
- **Adendo datado de 06.06.2013**

Pesquisador (a) Responsável: Paulo Hilário Nascimento Saldiva

Pesquisador (a) Executante: Jôse Mara de Brito

CEP-FMUSP, 01 de julho de 2013.

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa