MONIQUE MATSUDA

**Efeitos das emissões geradas pela queima dos
canaviais sobre a superfície ocular**

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

Área de concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva

**São Paulo
2009**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Matsuda, Monique

Efeitos das emissões geradas pela queima dos canaviais sobre a superfície ocular / Monique Matsuda. -- São Paulo, 2009.

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

Área de concentração: Patologia.

Orientador: Paulo Hilário Nascimento Saldiva.

Descritores: 1.Poluição do ar/efeitos adversos 2.Exposição ocupacional
3.Cana-de-açúcar 4.Túnica conjuntiva 5.Células calciformes

USP/FM/SBD-448/09

MONIQUE MATSUDA

**Efeitos das emissões geradas pela queima dos
canaviais sobre a superfície ocular**

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

Área de concentração: Patologia

Orientador: Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva

**São Paulo
2009**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes da minha vida, sem as quais qualquer estudo ou esforço não teriam o menor sentido:

Aos meus pais Isa e Norio;

À minha irmã Mery;

Ao meu irmão Rony;

Ao meu marido Rômulo.

AGRADECIMENTOS

Expresso aqui os meus especiais agradecimentos a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação acadêmica e para a realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, por ter acreditado e confiado em mim desde o início. Agradeço por ter acreditado na minha capacidade como pesquisadora, que enfim, se concretizou graças a ele. Ele é um exemplo a ser seguido, que respeita o ser humano, o profissional, o educador. Dos poucos que realmente conseguem desenvolver a profissão no dia-a-dia de forma descontraída e leve para todos;

À Maristela Peres Rangel, pelo auxílio na elaboração deste trabalho e também pelos momentos de riso, que com alegria conduzimos todos os projetos no laboratório durante este período. É mais do que este auxílio, fico feliz por tê-la como uma nova amiga;

À Dra. Priscila Novaes, por ter me recebido pela primeira vez de braços abertos no Laboratório de Oftalmologia e por ter acreditado no meu trabalho desde o princípio;

Ao Dr. Ubiratan de Paula Santos, por ter concedido a permissão para a realização dos exames oftalmológicos deste estudo no projeto principal sob sua coordenação;

À Dra. Mônica Valeria Marquezini, minha amiga, professora, orientadora para sempre, por se preocupar comigo, em qualquer hora, local ou situação. Toda a minha formação e conduta acadêmica eu devo a ela. Obrigada por sempre permitir que eu retorne para "debaixo das suas asas" quando necessário. Tenho saudades dos cafés e das conversas prolongadas na sua casa;

Ao Dr. Alejandro Berra, pelo auxílio científico constante neste e em todos os trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Oftalmologia - LIM33;

Ao Prof. Dr. Newton Kara-José, por ter me recebido e confiado no meu trabalho no desenvolvimento do Laboratório de Oftalmologia - LIM33;

À Rose, do Laboratório de Histologia do Depto. Patologia da FMUSP, pelo auxílio no processamento das citologias de impressão;

Ao Dr. Luiz Alberto Amador Pereira, por sempre me incentivar e pelos conselhos acadêmicos;

À Maria Paula, do Laboratório de Oftalmologia - LIM33, pela companhia e por atender a todas às minhas solicitações;

Ao prefeito, aos funcionários, aos profissionais, aos voluntários da cidade de Tatuí e aos trabalhadores envolvidos no corte da cana por ter permitido e colaborado para a realização deste estudo;

À secretária da Patologia, Liduvina, por sempre me atender prontamente e pelas conversas descontraídas;

Às secretárias, Dalva e Márcia, do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da FMUSP por sempre atender às minhas solicitações e torcer por mim e pela minha família;

À secretária da Pós-Graduação da Oftalmologia, Regina, pelo auxílio e pelas conversas descontraídas durante todo este período;

A todas as secretárias e auxiliares da Oftalmologia, Sandra, Ana, Cléa, Edson, Carlos, pelo auxílio às minhas solicitações;

A todas às meninas do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da FMUSP, Mariângela Macchione, Regiani, Miriam Lemos, Heloísa, Ana Júlia, Eliane, por ter me recebido no Depto. Patologia;

Ao pessoal do DIREX-LIM e, em especial, à Cida, por torcer por mim durante este período em que estive no Laboratório de Oftalmologia;

Ao CNPq pelo apoio financeiro de parte deste estudo;

À CAPES, pela bolsa concedida durante esta etapa.

Enfim, a todas às pessoas do Departamento de Patologia, da Divisão de Clínica Oftalmológica e do Laboratório de Oftalmologia da FMUSP que participaram na realização deste trabalho.

Minha gratidão!

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de siglas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	RELEVÂNCIA DA QUESTÃO	1
2	REVISÃO DA LITERATURA	8
2.1	POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA: CONSIDERAÇÕES INICIAIS	8
2.1.1	<i>Definição e Classificação dos Poluentes Atmosféricos</i>	9
2.1.2	<i>Características dos principais poluentes atmosféricos</i>	14
2.1.2.1	Material Particulado	14
2.1.2.2	Monóxido de Carbono (CO)	17
2.1.2.3	Hidrocarbonetos	18
2.1.2.4	Óxidos de Nitrogênio (NO _x)	18
2.1.2.5	Ozônio (O ₃)	19
2.1.2.6	Dióxido de enxofre (SO ₂)	20
2.2	FONTES DE POLUIÇÃO AMBIENTAL	20
2.2.1	<i>Queima da Biomassa</i>	22
2.2.1.1	Cenário brasileiro das emissões geradas pela queima da cana-de-açúcar	23
2.3	POLUIÇÃO AMBIENTAL E SAÚDE	29
2.3.1	<i>Efeitos das emissões da queima da cana-de-açúcar sobre a saúde</i>	32
2.4	SUPERFÍCIE OCULAR: A INTERFACE COM O MEIO AMBIENTE	34
2.5	EFEITOS DA POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA SOBRE A SUPERFÍCIE OCULAR	36
2.6	CITOLOGIA DE IMPRESSÃO: UM MÉTODO PARA AVALIAÇÃO DO TECIDO EPITELIAL OCULAR FRENTE À EXPOSIÇÃO À POLUIÇÃO DO AR	42
3	OBJETIVOS	47
3.1	OBJETIVOS GERAIS	47
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48

4	MÉTODOS.....	49
4.1	CASUÍSTICA.....	49
4.2	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....	50
4.3	ASPECTOS ÉTICOS	50
4.4	INFRAESTRUTURA E MATERIAIS UTILIZADOS	51
4.5	AVALIAÇÃO AMBIENTAL DE MATERIAL PARTICULADO, DA TEMPERATURA E DA UMIDADE RELATIVA DO AR.....	52
4.6	AVALIAÇÕES OCULARES	53
4.6.1	<i>Questionário de sintomas</i>	53
4.6.2	<i>Antecedentes Oftalmológicos</i>	53
4.6.3	<i>Biomicroscopia</i>	53
4.6.4	<i>Tempo de Rotura do Filme Lacrimal (TRFL)</i>	54
4.6.5	<i>Colorações Vitais</i>	55
4.6.5.1	Fluoresceína	55
4.6.5.2	Rosa Bengala	55
4.6.6	<i>Teste de Schirmer I</i>	56
4.6.7	<i>Citologia de Impressão</i>	57
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	60
5	RESULTADOS	62
5.1	OS NÍVEIS DE MP _{2,5} FORAM ELEVADOS NOS CANAVIAIS	62
5.2	ANÁLISE DESCRITIVA DOS PARTICIPANTES DO ESTUDO	64
5.3	EXAMES E TESTES CLÍNICOS.....	66
5.3.1	<i>Os indivíduos avaliados não apresentaram diferenças nos sintomas oculares</i>	66
5.3.2	<i>Biomicroscopia</i>	69
5.3.2.1	Observa-se presença marcante de meibomite	69
5.3.2.2	Aumento na frequência de muco e oleosidade no filme lacrimal dos cortadores durante a entresafra.....	71
5.3.2.3	Os indivíduos não apresentaram alterações na córnea ..	71
5.3.2.4	Aumento na frequência de hiperemia nos cortadores de cana durante a entresafra	72
5.4.1	<i>Não houve alterações na córnea e conjuntiva pela coloração por Rosa Bengala</i>	74

5.4.2	<i>Não houve alteração da córnea pela coloração por fluoresceína para os grupos e períodos avaliados</i>	74
5.4.3	<i>Ocorrência de instabilidade no filme lacrimal nos cortadores de cana durante o período da queima</i>	76
5.4.4	<i>Exposição crônica às emissões dos poluentes gerados pela queima da cana tende a diminuir o TRFL</i>	78
5.4.5	<i>Emissões geradas pela queima da cana não provocam alterações na quantidade de lágrimas</i>	81
5.4.6	<i>Diminuição da quantidade de lágrima devido à exposição crônica às emissões dos poluentes gerados pela queima da cana</i>	83
5.5	CITOLOGIA DE IMPRESSÃO	85
5.5.1	<i>Análise morfológica das células epiteliais não secretoras e quantificação de células caliciformes</i>	85
5.5.2	<i>Diminuição das áreas PAS positivas nas amostras dos cortadores de cana durante o período da queima</i>	86
5.5.3	<i>Exposição crônica às emissões dos poluentes gerados pela queima da cana aumenta a proporção de áreas PAS positivas</i>	88
6	DISCUSSÃO.....	90
7	CONCLUSÕES.....	106
8	ANEXOS.....	107
9	REFERÊNCIAS	116

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	análise de variância
CO	monóxido de carbono
CO₂	dióxido de carbono
DNA	ácido desoxirribonucléico
EGF	fator de crescimento endotelial
et al.	e outros
HC	hidrocarbonetos
HNO₃	ácido nítrico
HPAs	hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
IC	Intervalo de confiança
ICAM-1	molécula de adesão intercelular-1
IFN-γ	interferon-gama
IL-1β	interleucina-1 beta
IL-6	interleucina-6
MAPK	Proteína quinase mitogênica
MP_{2,5}	material particulado <2,5µm
MP₁₀	material particulado <10µm
MUC5AC	mucina 5AC
NO	monóxido de nitrogênio
NO₂	dióxido de nitrogênio
NO_x	óxidos de nitrogênio
O₃	ozônio
OH-	radical hidroxila
PAS	ácido periódico de Schiff
p.	página
PTS	partículas totais em suspensão
SO₂	dióxido de enxofre

SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
TGF-β1	fator de crescimento transformante-beta 1
TNF-α	fator de necrose tumoral-alfa
TRFL	tempo de rotura do filme lacrimal
VEGF	fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE SIGLAS

CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAPPesq	Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CICPAA	Comissão Intermunicipal de Controle da Poluição das Águas e do Ar
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DIREX-LIM	Diretoria Executiva dos Laboratórios de Investigação Médica
EUA	Estados Unidos da América
INCOR	Instituto do Coração
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPAS	Organização Pan-Americana de Saúde
SUSAM	Superintendência de Saneamento Ambiental
TAC	Termo de Ajustamento de Conduta
UNICA	União das Indústrias Canavieira de São Paulo
USEPA	Agência Ambiental Americana
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Poluentes atmosféricos monitorados pela CETESB.....	09
Tabela 2 –	Índice de Qualidade do Ar de acordo com o índice de cada poluente obtido em 24h de monitoramento pela CETESB.....	11
Tabela 3 –	Classificação de Nelson (1988) para a análise morfológica e quantitativa das células epiteliais não-secretoras e das células caliciformes da conjuntiva pela técnica de citologia de impressão.....	57
Tabela 4 –	Média dos níveis de MP _{2,5} , temperatura e umidade mensurados nos canaviais nas atividades de corte da cana e na cidade de Tatuí durante o período de queima; e nas atividades de preparação do solo e corte de cana crua nos canaviais durante o período de entressafra.....	61
Tabela 5 –	Características descritivas dos participantes do estudo.....	63
Tabela 6 –	Frequência dos sintomas dos cortadores de cana (grupo CC) durante os períodos de queima (Q) e entressafra (E) e dos indivíduos da cidade durante o período de queima.....	66
Tabela 7 –	Frequência das alterações nas pálpebras, filme lacrimal, córnea e conjuntiva avaliadas pela biomicroscopia nos cortadores de cana (grupo CC) durante os períodos de queima (Q) e entressafra (E) e nos indivíduos da cidade durante o período de queima.....	68
Tabela 8 –	Distribuição dos valores médios das áreas PAS positivas, do TRFL e do teste de Schirmer I nas categorias C1, C2 e C3 durante os períodos de queima e entre safra.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Hipóteses da ação dos poluentes atmosféricos sobre a superfície ocular.	04
Figura 2 –	Fotos representativas das emissões geradas pela queima da cana-de-açúcar.	23
Figura 3 –	Foto de um trabalhador durante o corte da cana-de-açúcar após a queima da plantação.....	26
Figura 4 –	Coleta de citologia de impressão da região tarsal inferior após prévia anestesia tópica.....	41
Figura 5 –	Comparação entre os valores medianos de Rosa Bengala do grupo controle (Grupo Ctr) durante o período de queima e do grupo de cortadores de cana (Grupo CC) durante os períodos da queima e entressafra.....	72
Figura 6 –	Comparação entre os valores médios do TRFL do grupo controle (Grupo Ctr) durante o período de queima e do grupo de cortadores de cana (Grupo CC) durante os períodos da queima e entressafra.....	75
Figura 7 –	Correlação entre os valores médios do TRFL distribuídos nas categorias C1, C2 e C3 durante os períodos de queima (barras azul-escuras) e entre safra (barras azul-claras) do Grupo CC.....	77
Figura 8 –	Comparação entre os valores medianos do Teste de Schirmer I do grupo controle (Grupo Ctr) durante o período de queima e do grupo de cortadores de cana (Grupo CC) durante os períodos da queima e entressafra.....	80
Figura 9 –	Correlação entre os valores medianos de Schirmer I distribuídos nas categorias C1, C2 e C3 durante os períodos de queima (barras azul-escuras) e entre safra (barras azul-claras) do Grupo CC.....	82
Figura 10 –	Comparação entre os valores médios da morfometria das áreas PAS positivas das amostras de citologia de impressão do grupo controle (Grupo Ctr) durante o período de queima e do grupo de cortadores de cana (Grupo CC) durante os períodos da queima e entressafra.....	85
Figura 11 –	Correlação entre os valores médios das áreas PAS positivas distribuídos nas categorias C1, C2 e C3 durante os períodos de queima (barras azul-escuras) e entre safra (barras azul-claras) do Grupo CC.....	87

RESUMO

MATSUDA, M. Efeitos das emissões geradas pela queima dos canaviais sobre a superfície ocular [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 124p.

Efeitos adversos das emissões geradas pela queima da cana-de-açúcar representa um problema que afeta principalmente os países em desenvolvimento. Estudos prévios têm demonstrado que, durante o período de queima, há um aumento das admissões hospitalares e atendimentos de emergência nas cidades do Brasil próximas às plantações de cana. Entretanto, até o momento, não há estudos que avaliaram os efeitos sobre a superfície ocular. O presente trabalho avalia o impacto causado pela queima da cana sobre a superfície ocular em cortadores de cana e na população da região de Tatuí-SP. Vinte e dois cortadores de cana e dezenove voluntários do perímetro urbano de Tatuí-SP, localizada no Estado de São Paulo, foram recrutados para o estudo. Medidas ambientais das concentrações de material particulado de 2,5 μm (MP_{2,5}), temperatura e umidade foram mensuradas durante os períodos de queima e entressafra. Ao mesmo tempo, avaliações histológicas e clínicas da superfície ocular, tais como, citologia de impressão da região tarsal, tempo de rotura do filme lacrimal (TRFL), teste de Schirmer I, colorações vitais por rosa bengala e fluoresceína, biomicroscopia e sintomas oculares foram realizadas durante os dois períodos. Níveis de MP_{2,5} durante a atividade de corte da cana queimada foi 3,5 vezes mais elevados do que o limite de 25 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ sugerido pelo órgão de regulamentação. Nas avaliações oculares, observamos que os valores médios das áreas coradas por ácido periódico de Schiff (PAS) das amostras dos cortadores foram menores durante o período de queima (57 $\pm$ 6,8%) do que na entressafra (64,3 $\pm$ 12%; p=0,014) e quando comparadas com as

amostras dos voluntários da cidade ($63,9 \pm 6.8\%$; $p=0,009$). Modelo de regressão não-linear revela uma forte associação entre os valores médios das áreas PAS positivas e os anos de trabalho no corte da cana queimada. Detectamos um aumento nas áreas PAS positivas conforme os anos de trabalho acumulados no corte da cana queimada durante o período da entressafra ($r=0,99$; $p=0,015$). Teste de Schirmer I revela uma diminuição dos valores conforme os anos de trabalho no corte da cana queimada observados durante o período de queima. ($r=0,99$; $p=0,026$). Valores médios de TRFL dos cortadores de cana durante o período de queima ($6,48 \pm 3.47s$) foram menores do que na entressafra ($10,16 \pm 7,79$) e quando comparadas com o TRFL dos voluntários da cidade ($8,6 \pm 4,6s$; $p<0,05$). Não houve diferenças estatísticas em relação às outras variáveis oculares. Nossos resultados sugerem que a exposição sazonal às altas concentrações das emissões geradas pela queima da cana-de-açúcar pode causar efeitos tóxicos sobre a mucosa epitelial e afetar a estabilidade do filme lacrimal, permitindo que o epitélio torne-se menos protegido aos agentes deletérios. Por outro lado, a exposição crônica às emissões da cana parece induzir uma resposta adaptativa do epitélio ocular, associado a um aumento da densidade de muco para compensar a perda de células caliciformes durante o período da queima, todos os anos. Em conclusão, esses achados reforçam a importância de futuras investigações para melhor compreender as consequências da poluição atmosférica sobre a superfície ocular e sugere medidas para proteção da superfície ocular durante este período.

Descritores: poluentes atmosféricos; queima da cana-de-açúcar; superfície ocular; conjuntiva; poluição do ar/efeitos adversos; hiperplasia de células caliciformes.

SUMMARY

MATSUDA, M. *Effects of sugar cane burning emissions on the ocular surface* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009. 124p.

The adverse effects of particle emissions produced by sugar cane burning represent a problem that affects mostly developing countries. Previous studies have shown that, during the burning period, there is an increase in respiratory hospital admissions and emergency room visits in communities surrounded by sugar cane plantations in rural cities of Brazil. However, until this date, no previous studies have evaluated the effects on the ocular surface. The aim of the present work is to study the impact of the sugar cane burning on the ocular surface of cane workers and the people at the city of Tatuí, near the burning crops. Twenty-two healthy sugar cane workers and nineteen volunteers from Tatuí region located at the State of Sao Paulo, Brazil, were recruited to the study. Measurements of the average concentrations of particulate matter 2.5 μm , temperature and humidity were done during the burning and non-burning periods. Concurrently, histological and clinical assessments of the ocular surface such as, inferior tarsal impression cytology, tear film break-up time, Schirmer's I test, fluorescein and rose bengal staining, biomicroscopy and eye irritation symptoms were evaluated during the two periods. $\text{PM}_{2.5}$ exposure levels in the crops during the activity of burnt cane cutting were 3.5-fold higher than the suggest limit of $25\mu\text{g}/\text{m}^3$ proposed by governmental regulation. On ocular assessments, we observed that the average of periodic acid-Schiff (PAS) positive areas of sugar cane workers samples were lower during the burning (mean 57%, SD 6.8) than the non-burning period (mean 64.3%, SD 12; $p=0.014$) and the downtown volunteers samples (mean 63.9%, SD 6.8; $p=0.009$). A non-linear regression model reveals a strong relationship between average PAS positive areas and years working in sugar cane harvesting. We noticed an

increase in PAS positive areas as long as the years accumulated in sugar cane harvesting labor during non-burning period ($r=0.99$, $p=0.015$). Schirmer test t reveals impairment at the values across the years of labour in sugar cane harvesting observed during the burning period ($r=0.99$, $p=0.026$). Mean TBUT values of sugar cane workers during the burning period (mean 6.48s; SD 3.47) were lower than non-burning period (mean 10.16s; SD 7.79) and than TBUT of the volunteers of downtown (mean 8.6s, SD 4.6; $p<0.05$). There were no statistically differences among the groups for the other ocular variables. Our results suggest that seasonal exposition of higher concentrations of emissions generated by sugar cane burning may cause toxic effects on the mucosal epithelium and affect tear film stability that may leave underlying ocular epithelium less protected to harmful agents. On the other hand, chronic occupational exposure to sugar cane emissions during harvest may induce an adaptive response of ocular epithelium associated with an increase of mucus density in order to compensate loss of goblet cells every year during burning period. In conclusion, these findings reinforce the importance for further investigations to better understanding the consequences of air pollution on the ocular surface and suggest procedures to protect ocular surface during this period.

Keywords: environmental air pollutants; sugar cane burning; ocular surface; conjunctiva; air pollution/adverse effects; goblet cell hyperplasia.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Relevância da questão

Dentre os tópicos relacionados aos fatores ambientais, a poluição do ar é sem dúvida um dos maiores impactantes no mundo. Este fato pode ser comprovado pelos inúmeros trabalhos descritos na literatura, os quais relatam os efeitos dos poluentes atmosféricos sobre a saúde humana. Esses trabalhos associam, sobretudo, a poluição do ar a grandes centros urbanos e seus efeitos sobre a morbidade e mortalidade. Estudos clínicos e epidemiológicos têm indicado um agravamento dos sintomas respiratórios e cardiovasculares (Lin et al., 2003; de Paula Santos, 2005), aumento no número de atendimentos e internações hospitalares devido a problemas cardiorespiratórios (Lin et al., 1999; Martins et al., 2002a; Martins et al., 2002b; Farhat et al., 2005; Cendon et al., 2006; Gouveia et al., 2006; Pereira Filho et al., 2008; Arbex et al., 2009), alterações oculares (Novaes et al., 2007), baixo peso em recém-nascidos (Gouveia et al., 2004; Medeiros et al., 2005); morte de neonatos (Lin et al., 2004; de Medeiros et al., 2005), crianças (Saldiva et al., 1994; Braga et al., 2001; Conceição et al., 2001) e idosos (Saldiva et al., 1995; Freitas et al., 2004); bem como estudos experimentais envolvendo a detecção de mutagenicidade (Guimarães et al., 2000; Soares et al., 2003; Guimarães et al., 2004; Savóia et al., 2009).

De modo similar, os estudos especificamente relacionados aos efeitos adversos da poluição do ar proveniente da queima da biomassa se traduzem nos efeitos sobre o sistema respiratório (Betchley et al., 1997; Aditama et al.,

2000; Emmanuel, 2000; Mott et al., 2002; Künzli et al., 2006 Regalado et al., 2006; Díaz et al., 2007; Romieu et al., 2009). Observa-se uma diminuição da função pulmonar e agravamento de doenças respiratórias, e alguns poucos demonstram um aumento na incidência de catarata (Pokhrel et al., 2005; Saha et al., 2005) e efeitos nos olhos sob a forma de sintomas oculares (Ellegard 1997; Saha et al., 2005; Díaz et al., 2007). Contudo, cabe ressaltar que os sintomas oculares desses trabalhos foram baseados somente nos relatos referidos pelos pacientes, sem que não houvesse a realização de exames oculares adicionais. Além disso, os efeitos oculares foram analisados em ocasiões distintas da situação observada neste trabalho, os quais envolveram episódios de incêndios florestais e queima da biomassa utilizada como fonte de energia doméstica. De acordo com a literatura, diferentes tipos de biomassa apresentam emissões muito variadas, pois depende da diversidade de espécies vegetais, que demandam tempo de secagem e queima diferentes, e das variações temporais e espaciais que atuam na intensidade e severidade da combustão, fatores que podem modificar o padrão de emissão final (Zou et al., 2003; Wegesser et al., 2009).

No Brasil, a queima da biomassa é intensivamente observada no desmatamento das florestas para a obtenção de madeira, na limpeza do terreno para propiciar áreas livres para pastagens e cultivos agrícolas.

Neste último cenário, a queima dos canaviais antes da colheita é observada todos os anos, entre os meses de maio a novembro, sobretudo na região centro-oeste do estado de São Paulo e contribui significativamente no aumento das concentrações dos poluentes atmosféricos durante este

período (Arbex et al., 2000; Arbex et al., 2004; Cançado et al., 2006; Arbex et al., 2007).

Assim como nos estudos que envolvem a queima da biomassa no geral, acredita-se que as emissões da queima da cana-de-açúcar também estejam associadas ao aumento nos atendimentos ambulatoriais e internações hospitalares em decorrência de problemas respiratórios (Arbex et al., 2000; Arbex et al., 2004; Cançado et al., 2006; Lopes & Ribeiro, 2006; Arbex et al., 2007; Ribeiro, 2008). Contudo, não há estudos publicados até o momento que tratem de questões que envolvam as emissões da queima da cana-de-açúcar sobre a superfície ocular.

Em virtude da carência dos trabalhos envolvendo este tema, nos últimos anos nosso grupo tem sido pioneiro nos estudos clínicos e experimentais no Brasil, fruto da parceria entre o Laboratório de Oftalmologia e o Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da FMUSP.

Neste sentido, no nosso estudo anterior detectou-se alterações histológicas significativas na mucosa ocular frente à exposição crônica aos poluentes atmosféricos presentes em São Paulo. Além disso, encontramos uma correlação positiva e um efeito dose-resposta entre a hiperplasia de células caliciformes e a exposição individual ao NO₂, utilizado como poluente de referência de emissão veicular (Novaes et al., 2007). A relevância desse achado reside no fato dessas células serem parte chave do sistema de defesa dos epitélios em resposta aos agentes agressores (Rogers, 1994; Rogers, 2003).

Adicionalmente, esse achado histológico foi associado à instabilidade do filme lacrimal e à presença de sintomas oculares, evidências sub-clínicas da superfície ocular em resposta à exposição aos poluentes atmosféricos (Novaes et al., 2008), o que provavelmente possam indicar uma resposta inicial da superfície ocular.

Algumas conjecturas são sugeridas em relação aos efeitos dos poluentes atmosféricos sobre a superfície ocular (Figura 1).

Figura 1. Hipóteses da ação dos poluentes atmosféricos sobre a superfície ocular. A. Indução da apoptose ou inibição da proliferação de células epiteliais não-secretoras e células caliciformes. B. Interferência sobre a lubrificação e defesa ocular por meio da diminuição da produção de lágrimas e de suas proteínas com propriedades antidefensivas. C. Estímulo na produção e secreção do muco ocular por meio da hiperplasia ou diferenciação de células caliciformes; aumento da síntese de muco e conseqüente, secreção para o filme lacrimal. D. Indução de resposta inflamatória através do estímulo de células do sistema imunológico e aumento de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, importantes para a indução do processo inflamatório. E. Alterações no DNA capazes, por sua vez, de promover o surgimento de células com padrão proliferativo descompensado ou com características distintas, resultando no surgimento de doenças e tumores oculares.

Uma hipótese é que níveis elevados mantidos na atmosfera em curto prazo possam causar toxicidade às células da conjuntiva e da córnea, podendo estimular processos apoptóticos. Em contrapartida, em longo prazo, a exposição crônica aos poluentes tóxicos poderia desencadear um aumento no risco de catarata (Mohan et al., 1989; Sreenivas et al., 1999; Zoodpey & Ughade, 1999; Pokhrel et al., 2005; Saha et al., 2005) e até de cegueira (Mishra et al., 1999), em virtude de alterações nas características das células da conjuntiva.

Outra suposição é que o epitélio ocular poderia sofrer transformações com o tempo, iniciando um processo evolutivo para a malignidade com o aparecimento de tumores, haja vista que substâncias cancerígenas, como os hidrocarbonetos e as dioxinas, estão presentes no material particulado proveniente da combustão da biomassa (Lemieux et al., 2004; Magalhães et al., 2007; Mazzoli-Rocha et al., 2008).

Os poluentes também poderiam desencadear um processo inflamatório crônico, assim como observado para as doenças pulmonares agravadas pela presença dos poluentes tóxicos (Lee et al., 2001; Peden et al., 2002; Tamagawa et al., 2008; Wang et al., 2008) .

Além disso, de um modo geral, poderia interferir na lubrificação e defesa do epitélio. Neste sentido, é oportuno salientar que, a mucosa ocular possui um importante papel na defesa e manutenção do epitélio ocular. A produção de muco promove a lubrificação e retém a lágrima produzida pelas glândulas lacrimais. Acredita-se que, o muco, quando produzido de maneira

adequada, possui a propriedade de se aderir às partículas externas para propiciar a limpeza e retirada das mesmas da superfície ocular. Além disso, a integridade do epitélio ocular é importante por manter uma capa protetora contra a invasão de agentes externos e promover a transparência da córnea, imprescindível para a visão (Watanabe 2002; Dartt 2004).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Poluição Atmosférica: considerações iniciais

Para entender os efeitos da poluição sobre a saúde em geral e sobre a superfície ocular, em particular, é preciso compreender previamente o que é a poluição atmosférica.

O nível de poluição atmosférica é determinado pela quantificação de substâncias poluentes no ar. De acordo com resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº3 de 28/06/1990, poluente atmosférico é:

qualquer forma de matéria ou energia com intensidade e em quantidade, concentração, tempo ou características em desacordo com os níveis estabelecidos, e que tornem ou possam tornar o ar impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde, inconveniente ao bem-estar público, danoso aos materiais, à fauna e à flora ou prejudicial à segurança, ao uso e gozo da propriedade e às atividades normais da comunidade.

Em linhas gerais, essas substâncias podem se acumular de maneira a causar efeitos negativos sobre os seres vivos quando o meio ambiente torna-se incapaz de absorver e eliminar os poluentes atmosféricos.

Entre os poluentes, existem alguns grupos que são usados como indicadores da qualidade do ar, em particular, causados pelos efeitos adversos sobre o meio ambiente e à saúde da população. Nesse contexto

estão inseridos: monóxido de carbono (CO), dióxido de enxofre (SO₂), óxido de nitrogênio (NO) e dióxido de nitrogênio (NO₂), hidrocarbonetos (HC), ozônio (O₃) e o material particulado (MP). Esses poluentes, uma vez presentes no ar, ainda podem interagir química e fisicamente entre si, de modo a gerar componentes derivados (CETESB, 2009).

2.2 Definição e Classificação dos Poluentes Atmosféricos

A legislação federal, estabelecida pela Portaria nº 231/1976 do Ministério do Interior e aprovada pela resolução CONAMA nº3 de 28/06/90, institui que os poluentes podem ser classificados segundo dois padrões de qualidade do ar: primários ou secundários (tabela 1).

As concentrações foram definidas com base nos estudos da ação desses poluentes sobre o meio ambiente e a vida dos seres vivos. Dessa forma, as concentrações do padrão primário, uma vez ultrapassadas, poderiam acarretar prejuízos à saúde humana. Por outro lado, as concentrações dos poluentes estabelecidas no padrão secundário expressariam os níveis mínimos nos quais poderiam ser observados alguns efeitos sobre a saúde humana, a fauna e a flora. Além disso, a resolução recomenda que os padrões primários devam ser adotados em curto prazo, e os secundários devem ser buscados em longo prazo.

Tabela 1. Poluentes atmosféricos monitorados pela CETESB (adaptado do relatório da CETESB, 2008)						
Poluentes atmosféricos indicadores da qualidade do ar						
Poluente	Tempo de amostragem	Padrão Primário	Padrão Secundário	Estados Atenção	Alerta	Emergência
		µg/m³	µg/m³			
partículas totais em suspensão	24 horas*	240	150	375	625	875
	MGA**	80	60			
partículas inaláveis	24 horas*	150	150	250	420	500
	MAA [#]	50	50			
fumaça	24 horas*	150	100	250	420	500
	MAA [#]	60	40			
dióxido de enxofre	24 horas*	365	100	800	1.600	2.100
	MAA [#]	80	40			
dióxido de nitrogênio	1 hora*	320	190	1.130	2.260	3.000
	MAA [#]	100	100			
monóxido de carbono	1 hora*	40.000	40.000			
		35 ppm	35 ppm			
	8 horas*	10.000	10.000			
		9 ppm	9 ppm	15	30	40
ozônio	1 hora*	160	160	200	800	1000
*Nível não pode ser ultrapassado mais do que uma vez por ano						
**Média geométrica anual						
[#] Média aritmética anual						

Do ponto de vista histórico, as primeiras iniciativas para o monitoramento dos poluentes atmosféricos ocorreram na década de 60, em São Paulo, época em que foi estabelecida a Comissão Intermunicipal de Controle da Poluição das Águas e do Ar (CICPAA). Posteriormente, até o ano de 1971, houve o apoio da Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), seguida pela transferência do domínio para a Superintendência de Saneamento Ambiental (SUSAM) em 1970. Por fim, esse controle foi transferido para a Companhia Estadual de Saneamento Básico (CETESB), que desde então, tem mantido o controle para o monitoramento da qualidade do ar, da água e do solo no Estado de São Paulo (CETESB, 2009).

Esses poluentes são registrados através de estações automáticas fixas na Região Metropolitana de São Paulo, Cubatão, Campinas, São José dos Campos, Sorocaba e Paulínia e por meio de estações manuais temporárias, todas coordenadas de modo a gerar as informações de forma integrada (CETESB, 2009).

Informações adicionais para níveis elevados dos poluentes em curto espaço de tempo ainda são adotadas como medidas de proteção à população. Essas medidas têm como base o Plano de Emergência para Episódios Críticos de Poluição do Ar da CETESB, regido pela resolução CONAMA nº3 de 28/06/90, em que são declarados os estados de Atenção, Alerta e Emergência para os episódios críticos em cada região de São Paulo (CETESB, 2009). O parâmetro tem como base o poluente que apresentar o maior nível em 24 horas de monitoramento, levando-se em conta os fatores meteorológicos (tabela 1).

Além disso, para a um melhor entendimento e acesso às informações à população, a CETESB definiu um índice para cada poluente. Ele é composto por uma faixa de concentração e está associado às seguintes categorias: boa, irregular, inadequada, má e péssima, de acordo com a tabela 2. Assume-se a categoria em decorrência do pior resultado entre os poluentes tidos como indicadores da qualidade do ar (CETESB, 2009).

Tabela 2. Índice de Qualidade do Ar de acordo com o índice de cada poluente obtido em 24h de monitoramento pela CETESB. O índice mais elevado dentre os poluentes resulta na qualidade do ar divulgada diariamente às 16h (adaptado do relatório da CETESB, 2008).

Qualidade	Índice	MP ₁₀ (µg/m ³)	O ₃ (µg/m ³)	CO (ppm)	NO ₂ (µg/m ³)	SO ₂ (µg/m ³)
Boa	0 - 50	0 - 50	0 - 80	0 - 4,5	0 - 100	0 - 80
Regular	51 - 100	50 - 150	80 - 160	4,5 - 9	100 - 320	80 - 365
Inadequada	101 - 199	150 - 250	160 - 200	42248	320 - 1130	365 - 800
Má	200 - 299	250 - 420	200 - 800	15 - 30	1130 - 2260	800 - 1600
Péssima	>299	>420	>800	>30	>2260	>1600

Outro aspecto importante a ser ressaltado é que os poluentes atmosféricos podem ser caracterizados de acordo com a sua origem e classificados, dessa forma, como primários ou secundários.

Poluentes primários são classificados como aqueles lançados diretamente na atmosfera por suas fontes de emissão. A partir dos poluentes primários, são gerados poluentes secundários pela reação química entre os

poluentes primários dispersos na atmosfera e os fatores de radiação ultravioleta, calor, umidade e outras substâncias dispersas no ar (CETESB, 2009).

Além disso, o tipo e a concentração dos poluentes podem variar de maneira espaço-temporal, os quais dependem da posição e das características das fontes de poluição e da influência dos fatores ambientais, tais como a velocidade e o sentido do vento, a temperatura do ar, a umidade relativa e os fatores geográficos, como a topografia (Bernard et al., 2001; Ito et al., 2008; Tagaris et al., 2009). Por exemplo, no inverno, a qualidade do ar das cidades piora em relação aos parâmetros de CO, MP e SO₂, devido às condições meteorológicas desfavoráveis à dispersão dos poluentes. Por outro lado, na primavera e no verão, há maior concentração de ozônio, pois este é um poluente secundário que depende da luz solar para ser formado. Há que se reforçar ainda que, além dos fatores ambientais, os níveis dos poluentes dependem da interferência antrópica, adotado pelo estilo de vida urbano. Por exemplo, os níveis de NO₂ são mais elevados durante o *rush* diário, em decorrência de uma maior concentração de veículos automotivos neste horário. Consequentemente, o O₃ que depende do NO₂ e da luz solar para ser formado, tem pico máximo no meio da manhã, com decaimento no início da noite (CETESB, 2009). Além disso, níveis locais dos poluentes atmosféricos estão condicionados às proximidades com grandes avenidas em locais de tráfego intenso. Estudos recentes apontam que a quantidade de partículas e gases provenientes do tráfego é proporcionalmente mais

elevada na medida em que se aproxima de grandes avenidas ou estradas (Bacarelli et al., 2009; Morgenstern et al., 2008).

Em linhas gerais, a exposição individual é dependente das concentrações dos poluentes multiplicado pela exposição em horas ou dias e geralmente expressas em $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ou ppm.

Destaca-se ainda que, mesmo em concentrações ambientais e em conformidade com os valores limites estabelecidos pelas agências de monitoramento, os poluentes podem ser capazes de promover efeitos não desejáveis à saúde humana, principalmente em indivíduos mais susceptíveis como em crianças (Vedal et al., 2003; Bakonyi et al., 2004; Cendon et al., 2006; Nascimento et al., 2006; Moura et al., 2008) e idosos. Essa nova informação ressalta que os níveis estabelecidos como “seguros” à população devem ser revisados quanto à atuação sobre a saúde da população.

2.2.1 Características dos principais poluentes atmosféricos

A seguir, seguem as principais características dos poluentes atmosféricos monitorados pela CETESB.

2.2.1.1 Material Particulado

O material particulado (MP) pode ser derivado de fontes naturais, como vulcões e queima natural da vegetação ou por intermédio de

atividades antropogênicas, como a queima de combustíveis fósseis e da biomassa (Simoneit, 2002; Schwarze et al., 2006; Polichetti et al., 2009).

As queimadas são consideradas a principal fonte de emissão de MP no mundo (Freitas et al., 2005). O MP é composto de uma mistura de partículas sólidas ou líquidas suspensas no ar, que variam de acordo com a forma, composição e origem. Os principais aspectos salientados em relação ao MP, refere-se à sua caracterização de acordo com o tamanho de sua massa, sendo, portanto, apresentada sob a forma de partículas totais em suspensão (PTS), partículas grossas (coarse mode) e partículas finas (fine mode).

As PTS possuem diâmetro menor que 100 μ m e as partículas grossas

são compostas por diâmetro entre 2,5 a 10 μ m (MP₁₀), provenientes da

ressuspensão do solo, da combustão direta dos veículos automotores, além de outras fontes biológicas, como pólenes e esporos. As partículas finas

possuem diâmetro menor que 2,5 μ m (MP_{2,5}) e são originadas da combustão

dos automóveis, de indústrias e queima da biomassa (Simoneit, 2002). Em virtude de seu tamanho, essas partículas são as mais incisivas sobre o sistema respiratório e podem atingir os alvéolos pulmonares (Ribeiro & Assunção, 2002; Zanobetti et al., 2009; Wegesser et al., 2009). Além disso, é capaz de transportar gases adsorvidos na sua superfície na forma de aerossóis, tais como óxidos de nitrogênio e enxofre, que são potentes agentes oxidantes com efeito tóxico (Simoneit, 2002).

Estudos específicos relacionados às características da composição do material particulado fino têm relatado que a sua composição é constituída por compostos inorgânicos como, nitrato, sulfato, amônio, sódio, cloreto, traços de metais; e carbono elementar e orgânico, contribuindo para a formação de diversos compostos orgânicos e metais (Allen et al., 2004; Sillanpää et al., 2005; Reiss et al., 2007; Schlesinger 2007; Chen & Lippmann, 2008; Mazzoli-Rocha et al., 2008).

É oportuno salientar que a definição de parâmetros de qualidade do ar para o material particulado tendo em vista somente o tamanho da massa parece ser inadequada. Partículas produzidas por diferentes fontes e materiais, e, conseqüentemente, com diferentes composições, possuem potencial tóxicos distintos.

Mazzoli-Rocha et al. (2008) demonstraram que MP fino proveniente de São Paulo continha maiores quantidades de hidrocarbonetos em relação ao MP derivado das emissões queima da cana-de-açúcar. Em compensação, a quantidade de metais, principalmente ferro e zinco, no MP fino da cana foi superior à quantidade encontrada no tráfego urbano. Essas

disparidades podem desencadear efeitos biológicos distintos quando se trata da saúde humana, embora não haja estudos adicionais para a comprovação desses achados.

Embora os critérios de qualidade do ar da legislação brasileira não tenham adotado o $MP_{2,5}$ como poluente padrão, a partir de 2000, a CETESB iniciou a monitoração deste poluente por meio de estações manuais, tendo como base os estudos científicos que relataram os efeitos deletérios deste poluente. A CETESB tem como critério, os padrões de qualidade do ar estabelecidos pela Agência Ambiental Americana (USEPA) em 1997 e pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2005.

2.2.1.2 Monóxido de Carbono (CO)

É um gás derivado da combustão incompleta da queima de combustíveis fósseis e da biomassa. Acredita-se que ele possa provocar danos ao organismo, devido a sua alta afinidade pela hemoglobina.

Em concentrações elevadas podem provocar diminuição da capacidade de trabalho e aprendizagem, dores de cabeça ou, dependendo da concentração, até a morte por asfixia. Outro aspecto relevante, é que o CO está associado ao aumento da incidência de infarto do miocárdio, infecções das vias aéreas superiores em idosos (Martins et al., 2001) e mortalidade (Freitas et al., 2004).

Em São Paulo, estima-se que 97% do CO da atmosfera são procedentes dos veículos automotivos. No total, cerca de um quarto do CO

existente na troposfera mundial resulta da queima da biomassa (CETESB, 2009).

2.2.1.3 Hidrocarbonetos

Dentre os hidrocarbonetos, os policíclicos aromáticos são os mais relevantes (HPAs) devido aos seus efeitos cancerígenos e mutagênicos. Os HPAs se formam a partir da combustão incompleta de material orgânico e são adsorvidos em partículas de poeira e fuligem ou na forma de gases, reagindo rapidamente com radicais hidroxila (OH⁻), nitrato e O₃. A presença dos HPAs para o meio ambiente deve-se às fontes biogênicas como a queima de florestas e emissões vulcânicas, e às fontes antropogênicas (Santos et al., 2002; Simoneit, 2002; Magalhães et al., 2007).

2.2.1.4 Óxidos de Nitrogênio (NO_x)

No grupo dos óxidos de nitrogênio (NO_x) estão inseridos as moléculas de dióxido de nitrogênio (NO₂), o monóxido de nitrogênio (NO) e o ácido nítrico (HNO₃).

Dentre estes, o NO₂ é o gás de maior destaque, uma vez que é o poluente primário produto principalmente da queima incompleta dos combustíveis fósseis dos veículos automotivos. Ele é formado pela reação do nitrogênio do ar com o oxigênio, seguida da ação da radiação ultravioleta. Adicionalmente, esse poluente tem participação como precursor na formação de oxidantes fotoquímicos, como o ozônio (Oppenheimer et al., 2004; Machado et al., 2008).

Não obstante, a biomassa é responsável por cerca de um terço das emissões de NO_x. Machado et al. (2008) observaram que concentrações de NO₂ foram positivamente correlacionadas com a frequência da queima, sobretudo durante os meses do inverno nas regiões produtoras de cana.

De fato, as concentrações de NO_x são elevadas durante a estação seca, o que poderia ocasionar uma elevação nos níveis de O₃ nas regiões canavieiras.

Como já mencionado na introdução deste trabalho, este fato implica no aumento de complicações respiratórias observadas durante o período de queima, uma vez que os estudos mostram que o NO₂ é um gás incisivo sobre o trato respiratório (Garret et al., 1998; Gauderman et al., 2000). Por último, parece afetar a superfície ocular e induzir conjuntivite (Bourcier et al., 2003).

2.2.1.5 Ozônio (O₃)

O O₃ é um gás formado pela colisão de átomos livre de oxigênio com moléculas de oxigênio. O O₃ a temperatura ambiente é instável e altamente reativo. Na estratosfera, forma uma camada protetora contra a radiação ultravioleta do Sol. Na troposfera, em contrapartida, está condicionado à fotólise do NO₂, podendo agir como um poderoso agente oxidante e causar efeitos irritativos para os pulmões e os olhos. Em relação às interferências ambientais, é tido como causador de danos à vegetação e à agricultura, uma vez que está associado à inibição da fotossíntese (Finlayson-Pitts & Pitts Jr, 1997; Hoppe et al., 2003; Semple et al., 2009; Srebot et al., 2009).

Como mencionado anteriormente, seu nível é elevado no período da manhã, com pico máximo à tarde e decaimento no início da noite.

2.2.1.6 Dióxido de enxofre (SO₂)

É um gás proveniente principalmente da queima de óleo diesel e gasolina dos escapamentos dos veículos automotivos. O SO₂, assim como os óxidos de nitrogênio, é responsável pela formação da chuva ácida e capaz de interferir no processo da fotossíntese. Em humanos, está associado a um efeito cumulativo que pode agravar casos de rinite, asma e sinusite alérgica. Acredita-se que, nos pulmões, interfere na defesa do organismo e pode aumentar risco de enfisemas e doenças cardiovasculares e na taxa de mortalidade (Devalia et al, 1994; Katsouyanni et al., 1997).

2.3 Fontes de Poluição Ambiental

Antes da Revolução Industrial e do uso de carvão, problemas de poluição ambiental eram eventos esporádicos, consequência principalmente de fenômenos naturais, como incêndios e erupções vulcânicas. Após a Revolução Industrial, o uso disseminado do carvão como fonte energética ocasionou o fenômeno da poluição atmosférica, como conhecemos hoje.

A migração da população da zona rural para as cidades e a formação dos grandes conglomerados urbanos, causada pelo desenvolvimento industrial, expôs os habitantes dos grandes centros aos efeitos das substâncias tóxicas dispersas no ar. Naquela época, a principal fonte de poluição do ar era procedente das indústrias que emergiram.

Com o advento da era do petróleo e o aumento exponencial do número de veículos automotivos durante o século XX, surgiram problemas relacionados à fumaça e gases gerados pela combustão do petróleo dos veículos automotivos. Atualmente, essas são as principais fontes de poluição atmosférica nos grandes centros urbanos (Baldasano et al., 2003; Molina & Molina, 2004; Chen & Kan, 2008).

Outros fatores, como a queima de biomassa, acidental ou provocada, comumente observada nos incêndios florestais e na queima de plantações agrícolas, também são fontes adicionais na contribuição da presença de substâncias tóxicas no ar. Aliás, a queima da biomassa a céu aberto ocasionada pelo desflorestamento, como pode ser visto na Amazônia, é responsável pela maior parte das emissões brasileiras (Arbex et al., 2000; Simoneit, 2002; Arbex et al., 2004; Freitas et al., 2005; Cançado et al., 2006; Arbex et al., 2007).

Para fins classificatórios, as fontes de poluição podem ser originadas de fontes estacionárias e móveis. Dentre as estacionárias, podemos inserir as emissões da queima de combustíveis, dos processos industriais, da construção civil, das petroquímicas, assim como a queima de biomassa. As fontes móveis, por sua vez, são formadas pelos veículos automotores, sendo originadas das emissões do escapamento e da poeira do solo das vias públicas (CETESB, 2009).

2.4 Queima da Biomassa

A queima da biomassa envolve o processo de combustão incompleta, pelo qual está sujeita ao tipo de biomassa queimada, assim como fatores relacionados às condições ambientais (Simoneit, 2002; Zou et al., 2003; Freitas et al., 2005; Wegesser et al., 2009).

Ela provém, sobretudo, do desflorestamento de novas áreas para ocupação e uso da terra para diversas finalidades. Esse tipo de queima é resultante da ação antropogênica e ocorre principalmente na região dos trópicos, o que contribui significativamente para a emissão de gases do efeito estufa, como CO₂, CO, NO_x, metano, HC e MP orgânico e elementar (Simoneit, 2002; Freitas et al., 2005).

No Brasil, o desmatamento é responsável por 70% das emissões de gases poluentes. As partículas de aerossol emitidas durante a estação seca compõem uma espessa camada de fumaça sobre as regiões Norte e Centro Oeste do Brasil, observadas por meio de um *smog* fotoquímico durante este período. Essas emissões afetam sobremaneira as comunidades ao redor, porém podem alcançar uma escala regional, uma vez favorecidas pelos movimentos de correntes atmosféricas (Freitas et al., 2005; Mascarenhas et al., 2008).

Outro tipo de exposição relacionada às emissões da queima da biomassa refere-se à exposição derivada do uso de biocombustíveis (madeira, esterco) para uso interno das casas. Estima-se que cerca de três bilhões de pessoas, principalmente nas comunidades rurais de países em desenvolvimento, estão expostas diariamente às emissões da queima dos

biocombustíveis, em especial mulheres que utilizam a biomassa para a preparação da comida.

Essa exposição aumenta sobremaneira o risco de doenças e complicações respiratórias, como pneumonia, bronquite crônica e câncer de pulmão (Ellegard 1997; Regalado et al., 2006; Díaz et al., 2007; Díaz et al., 2008). Recentemente, há evidências de baixo peso ao nascer (Tielsch et al., 2009), mortalidade perinatal, aparecimento de câncer de nasofaringe (Yu et al., 1985) e laringe (Clifford 1972; Bruce et al., 2000) e catarata em adultos (Mohan et al., 1989; Zodpey et al., 1999; Pokhrel et al., 2005).

2.4.1.1 Cenário brasileiro das emissões geradas pela queima da cana-de-açúcar

A queima da vegetação é muito utilizada na prática agrícola para a limpeza do terreno e no auxílio pré-colheita e preparo do terreno para novos plantios.

Anualmente, no Brasil, entre os meses de abril a novembro, vastas extensões de cana plantada são queimadas para facilitar o corte e a colheita e proteger os trabalhadores de animais peçonhentos, comuns nessas plantações. A queima da palha de cana também melhora o rendimento do corte, auxilia no preparo do terreno para novos plantios e aumenta a quantidade de açúcar por peso, pois reduz o conteúdo de água. Todavia, essas emissões contribuem anualmente para o aumento da poluição atmosférica nas regiões de cultivo de cana-de-açúcar e nas cidades próximas às queimadas (Arbex et al., 2000; Arbex et al., 2004; Cançado et al., 2006; Arbex et al., 2007; Figura 2).

Figura 2. Fotos representativas das emissões geradas pela queima da cana-de-açúcar. A. Queima de plantação de cana. B. Emissões atingem cidades próximas às plantações.

Nesse aspecto, a atividade sulcroalcooleira é observada principalmente na região centro-oeste do Estado de São Paulo. Segundo a União da Indústria de Cana-de-Açúcar de São Paulo (UNICA, 2009), o Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar. Na safra de 2006/2007, o Brasil produziu 426 milhões de toneladas, sendo que as regiões produtoras em São Paulo foram responsáveis pela colheita de 264 milhões de toneladas deste produto agrícola, dado que mostra a região de São Paulo como a principal produtora de cana.

Todas essas transformações possuem impactos nos municípios que abrigam tanto os trabalhadores do corte da cana quanto as novas usinas incorporadas no processo produtivo do etanol a partir da cana-de-açúcar. Há um aumento municipal da renda tributária e uma maior capacidade de investimento em infra-estrutura e outros setores econômicos da região. Todavia, há um despreparo do município frente a uma demanda crescente e momentânea por serviços públicos em decorrência da migração desses trabalhadores à região durante o período da safra (UNICA, 2009).

Estima-se que esse número alcance cerca de 250.000 migrantes, sendo muitos deles provenientes de regiões do nordeste brasileiro. Durante a safra de 2006/2007, a produção de etanol gerou cerca de um milhão de empregos diretos, sendo metade voltada especificamente para a produção da cana-de-açúcar. Não obstante, empregos indiretos da cadeia do etanol somaram ainda 3,6 milhões de indivíduos (UNICA, 2009).

O número de usinas também tem sido crescente, no momento estão em funcionamento 367 usinas, sendo 288 concentradas na região Centro-Sul, com projeção de mais 86 novas usinas até o ano de 2010 (UNICA, 2009).

O mais provável é que a expansão da área canavieira no Brasil se concretize, devido à grande demanda do mercado interno para atender a frota de veículos tipo *flex fuel*. Com o aumento crescente das áreas plantadas com cana-de-açúcar, cresce também os impactos causados pelas atividades que envolvem desde o seu plantio, até a obtenção do etanol como produto energético renovável.

Uma parte deste impacto é sentido no meio ambiente. As emissões geradas durante a queima pré-colheita da cana produz cerca de 3kg de MP, 35kg de CO e 5kg de HC por cada tonelada de cana (Ribeiro & Assunção, 2002). Isso gera uma dubiedade, ao mesmo tempo em que o objetivo de produção de cana para produzir etanol é servir como fonte energética alternativa ao combustível fóssil, sendo mais barata e “limpa”, e diminuir as emissões de agentes tóxicos provocadas pelo combustível fóssil, ela traz impactos consideráveis sobre o meio ambiente, aumentando as emissões de dióxido de carbono e outros poluentes durante o seu processo de queima pré-colheita.

Como consequência, cortadores de cana e a população da cidade ao redor ficam expostos à fuligem durante a safra da cana-de-açúcar por até sete meses seguidos todos os anos (Figura 3). Essa exposição está associada a um aumento na frequência dos problemas respiratórios e,

portanto, a um forte aumento da demanda por serviços de saúde pública (Arbex et al., 2000; Arbex et al., 2004; Cançado et al., 2006; Arbex et al., 2007).

Figura 3. Foto de um trabalhador durante o corte da cana-de-açúcar após a queima da plantação. Nota-se as emissões geradas pelo processo da queima.

Como parte das ações mitigadoras que estão sendo conduzidas para atenuar os efeitos das emissões sobre a população em geral, o governo brasileiro instituiu um programa geral de biocombustíveis para estruturar a cadeia produtiva da bioenergia. Neste cenário, o governo do Estado de São Paulo e a UNICA assinaram, em 04/08/2007, um acordo para erradicar as queimadas até 2017, denominado Termo de Ajustamento de Conduta (TAC). Neste acordo é previsto a substituição do processo de cana queimada e manual pelo processo mecanizado sem queima, em áreas que forem

propícias à mecanização. A data estabelecida foi acordada até o ano de 2014 e 2017, para áreas com declividade de até 12% e acima deste valor, respectivamente. Esse acordo resulta na antecipação da Lei 111.241, promulgada em 2002, que prevê a eliminação total da queima em 2021 nas áreas mecanizáveis e para 2031 para as áreas não mecanizáveis.

Essas medidas já foram observadas na safra de 2008/2009, em que houve um aumento de 14,9% nas áreas de cana crua colhida mecanicamente sem a utilização do fogo, em substituição à colheita com queima.

Outras diretrizes ainda foram tomadas, no sentido de proibir a queima em determinadas condições inadequadas. Recentemente, a Resolução da Secretaria Meio Ambiente nº44 de 16/06/2009, estabeleceu que permanecesse proibida a queima no período de 22/06/09 à 30/11/09, no horário das 6 às 20 horas, sendo permitida somente após este horário. Além disso, caso as condições de umidade do ar estejam abaixo de 20%, a queima fica suspensa em qualquer horário do dia. Após a data de 30/11/09, ela é permitida em qualquer horário, sendo suspensa nos horários entre 6 e 20 horas e mediante a umidade do ar abaixo de 30% ou igual e menor do que 20% por dois dias seguidos.

Por um lado, algumas medidas trarão consequências negativas em termos de desemprego e geração de renda para essas regiões. Contudo, colabora, em longo prazo, para que os envolvidos nas atividades da cadeia da cana-de-açúcar, assim como a população ao redor, tenham melhores

condições na qualidade do ar. Portanto, medidas urgentes são necessárias para manter o desenvolvimento econômico nessas regiões.

A magnitude dos impactos ambientais causados sobre a biodiversidade e sobre a saúde humana ainda são incipientes ou não são totalmente esclarecidos. Logo, estudos que enfoquem os impactos das queimadas sobre a saúde humana são de extrema urgência e relevância, para que sejam reforçadas as políticas públicas que resultem em um modelo de sustentabilidade ambiental e sócio-econômica.

2.5 Poluição Ambiental e Saúde

Como mencionado na introdução, os estudos acerca da poluição ambiental têm enfoque principalmente na poluição atmosférica que afeta milhões de habitantes dos grandes centros urbanos sendo, portanto, um tema de grande importância em saúde pública.

A importância do estudo da poluição atmosférica urbana iniciou-se por meio de tristes episódios como o do Vale do Meuse, na França, em 1930 (Nemeury et al., 2001); em Donora, nos EUA, em 1948 (Helfand et al., 2001) e em Londres, em 1952 (Waller et al., 1973), acidente este em que ocorreu em torno de 4000 mortes, decorrentes principalmente por doenças respiratórias. Esses fatos deram surgimento às políticas de controle da poluição do ar na Europa e nos EUA, que vieram estimular a investigação acerca dos efeitos da poluição atmosférica sobre a saúde.

Em relação à queima de biomassa também ocorreram episódios no passado que causou impactos consideráveis à saúde dos indivíduos expostos.

Em 1987, na Califórnia, um incêndio florestal de grande magnitude causou um aumento nos atendimentos por asma e infecções respiratórias (Duclos et al., 1990). Posteriormente, um incêndio no ano de 1997 atingiu milhões de hectares de floresta na Indonésia e Malásia, alcançando níveis extremos de poeira total em suspensão ($839 \mu\text{g}/\text{m}^3$), onde também foram

observados aumentos nos atendimentos e internações por problemas respiratórios (Kunii et al., 2002). Os estudos observaram que os efeitos são mais exacerbados em indivíduos com patologias prévias, p.ex. doenças cardiovasculares, em crianças e idosos (Huang & Ghio 2009).

Todavia, os efeitos adversos sobre a saúde são dependentes ainda do tipo, da concentração e da duração da exposição ao poluente, e alguns órgãos podem ser mais afetados do que outros. Conseqüências freqüentes são: irritação de olhos, nariz e garganta; diminuição da função pulmonar; aumento da susceptibilidade a infecções respiratórias e uma incidência aumentada de bronquite crônica. De um modo geral, uma das maiores conseqüências da contaminação ambiental é o seu efeito sobre o sistema respiratório, sendo a mucosa respiratória um dos principais locais de ação dos poluentes pela função que este sistema desempenha (Lin et al., 1999; Martins et al., 2002a; Martins et al., 2002b; Lin et al., 2003; Farhat et al., 2005; Cendon et al., 2006; Gouveia et al., 2006; Pereira Filho et al., 2008;

Arbex et al., 2009). No entanto, a superfície ocular também é outra estrutura igualmente exposta aos efeitos da contaminação ambiental.

O mecanismo de ação dos poluentes para o sistema respiratório é bem descrito. Ele se inicia pela indução de um estado inflamatório pulmonar, com prejuízo das defesas respiratórias contra agentes infecciosos inalados. A sua presença induz a ativação de macrófagos que liberam diversos mediadores locais, como citocinas, que aumentam a permeabilidade vascular e o recrutamento e ativação de outras células do processo inflamatório, como linfócitos. Por consequência, essas células liberam espécies reativas de oxigênio que podem ter efeito direto sobre o epitélio pulmonar. Além disso, esse processo leva a um aumento da produção, da acidez, da viscosidade e da consistência do muco, levando, conseqüentemente, à diminuição da resposta e/ou eficácia do sistema mucociliar, exacerbando os efeitos sobre a asma e bronquite. Por conseguinte, essas partículas podem atingir níveis mais profundos do pulmão e induzir o desenvolvimento de doenças crônicas como doença pulmonar obstrutiva crônica, cancro e enfisema, caso essa exposição persista por muitos anos. Também podem ser absorvidos ou difundidos diretamente pela circulação sistêmica, podendo atingir outros órgãos (Peden 2002; Ciencewicky et al., 2008; Li et al., 2008; Wang et al., 2008). Hipóteses recentes também sugerem que os mediadores pró-inflamatórios podem levar à inflamação sistêmica e alteração da coagulação, como um aumento de proteínas hepáticas, como o fibrinogênio e proteína C-reativa, que possivelmente reflete em efeitos cardiovasculares (Scapellato & Lotti, 2007).

Entretanto, os efeitos desses poluentes sobre outros sistemas do organismo ainda não foram elucidados. No caso da superfície ocular, é possível que esses poluentes também possam desencadear eventos inflamatórios, a partir de um mecanismo similar ao que acontece no epitélio pulmonar, com a indução de proteínas pró-inflamatórias e seus efeitos diretos e indiretos sobre o epitélio ocular.

2.6 Efeitos das emissões da queima da cana-de-açúcar sobre a saúde

Os estudos sobre os efeitos das emissões da cana-de-açúcar sobre a saúde são baseados principalmente nos efeitos sobre o sistema respiratório.

No Brasil, estudos realizados nas cidades de Araraquara (Arbex et al., 2000; Arbex et al., 2007) Piracicaba (Cançado et al., 2006) apontaram, tanto em cortadores de cana quanto na população local, um aumento de sintomas irritativos e agravamento de doenças respiratórias durante o período da queima dos canaviais.

Arbex et al. (2000) encontrou associação entre o peso de sedimento de MP e o número de visitas e inalação nos dias mais poluídos em Araraquara. Um aumento cumulativo de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de MP total em suspensão

foi positivamente correlacionado com uma elevação de 12,7% de admissões hospitalares por asma no período da queima (Arbex et al., 2007). Em Piracicaba, Cançado et al. (2006) já haviam observado um aumento no

número de internações por doenças respiratórias em 21,4% em crianças a

um incremento de $10,2\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$ e de 31,03% em idosos a um aumento

de $42,9\mu\text{g}/\text{m}^3$ de MP_{10} . A média anual de $\text{MP}_{2,5}$ foi de $56\mu\text{g}/\text{m}^3$, alcançando

$88\mu\text{g}/\text{m}^3$ na safra e $29\mu\text{g}/\text{m}^3$ na entressafra, sendo que o limite estabelecido

pela USEPA é de $50\mu\text{g}/\text{m}^3$ (Cançado et al., 2006).

Corroborando os estudos anteriores, Lopes & Ribeiro (2006), por meio de um sistema de mapeamento por georreferenciamento, observaram maior incidência de internações por problemas respiratórios em regiões com maior foco de calor (queimadas) no Estado de São Paulo. Essas regiões se

traduziram principalmente nas cidades em que há maior cultivo de cana-de-açúcar, como em Ribeirão Preto, Piracicaba e Bauru.

Além dos efeitos sazonais e agudos, acredita-se que existam efeitos crônicos da exposição. Rothschild & Mulvey (1982) detectaram um aumento no risco de morte por câncer de pulmão em cerca de 2,4 vezes em trabalhadores envolvidos no cultivo de cana. Posteriormente, outro estudo na Índia, observou uma associação entre o cultivo de cana e o aumento de 1,92 vezes no risco de câncer de pulmão, sendo que o risco foi maior nos trabalhadores envolvidos no preparo do solo e na queima da cana. Além disso, foi observado um aumento no risco em 1,21 vezes a cada 10 anos acumulados de trabalho (Amre et al, 1999).

. Em suma, os estudos deixam evidentes que a queima da palha da cana-de-açúcar é, sem dúvida, uma importante fonte de poluição atmosférica. Ela está associada ao aumento da morbidade respiratória em períodos de curta exposição, ao passo que efeitos prolongados devem ser estudados para a obtenção de dados mais conclusivos.

2.7 Superfície ocular: a interface com o meio ambiente

A integridade da superfície ocular depende do funcionamento adequado da Unidade Funcional Lacrimal, um sistema o que compreende o interrelacionamento entre as glândulas lacrimais, a superfície ocular (córnea, conjuntiva e glândulas de Meibomius) e os nervos sensórios e motores que se conectam a essas estruturas. Esta unidade funcional permite a produção adequada de lágrima e proteínas, importantes na composição do filme

lacrimal e na sua integridade, além de proteger o epitélio ocular contra a dessecação e promover uma superfície lisa e refrativa de alta qualidade óptica da córnea. Esta unidade responde às mudanças fisiológicas do indivíduo e do meio ambiente e qualquer alteração ou dano a qualquer um desses componentes pode levar à instabilidade do filme lacrimal e consequentemente ao surgimento de doenças oculares (Sousa et al., 2006).

A superfície ocular compreende a região da córnea, conjuntiva e Glândulas de Meibomius, que são recobertas por tecido epitelial, cuja função principal é proteger a superfície ocular contra traumas mecânicos, dessecação do olho e infecções por agentes patogênicos. O epitélio conjuntival normal é constituído pela região bulbar e pelas superfícies internas das pálpebras, esta última denominada de região tarsal da conjuntiva. Este tecido conjuntival é composto por células epiteliais não queratinizadas, células caliciformes abundantes, principalmente na região tarsal, e ausência de células inflamatórias. O epitélio corneal, diferentemente do epitélio conjuntival, não possui células caliciformes e é delimitado pelo limbo, que separa a região corneal e conjuntival, sendo um possível reservatório de células germinativas para a córnea (Sousa et al., 2006).

A superfície ocular por sua vez é recoberta pelo filme lacrimal produzido pelas glândulas lacrimais e glândulas de Meibomius. O filme lacrimal possui a função de evitar a dessecação ocular, promover nutrientes (glicose, fatores de crescimento) e oxigênio às células epiteliais e componentes importantes para a defesa do epitélio. Ele é composto por três camadas: uma camada externa lipídica, cujos componentes (ácidos graxos e

colesterol) são produzidos pelas glândulas de Meibomius, que evita a evaporação da água da camada aquosa-mucosa do filme lacrimal para o ambiente externo; uma camada intermediária, de gel mucoso composta por água, mucinas e nutrientes dissolvidos; e uma camada adjacente ao epitélio, denominada de glicocálise, que forma uma barreira física e química cuja composição se inserem glicoproteínas, incluindo mucinas transmembranas (Sousa et al., 2006).

Nesse contexto, o epitélio ocular é um dos tecidos de primeiro contato com os poluentes presentes no ar e dessa maneira, necessita de mecanismos de defesa constantes contra os agentes externos, que estão frequentemente atuando sobre a superfície ocular.

2.8 Efeitos da poluição atmosférica sobre a superfície ocular

Os primeiros trabalhos na literatura científica que relatam os efeitos irritantes dos poluentes atmosféricos sobre a superfície ocular já foram publicados desde as décadas de 60 e 70 (Mettier et al., 1962; Schuck et al., 1966; Partridge et al., 1966; Basu & Doms, 1972; Altshuller 1977; Altshuller 1978). Alguns poucos e na maioria, mais recentes, relatam os aspectos fisiomoleculares desses agentes tóxicos, tais como alterações no perfil protéico e mucosecretor no filme lacrimal e tecido conjuntival (Sapse et AL., 1969; Gupta et al., 2002; Saxena et al., 2003; Ansonye et al., 2004; Novaes et al., 2007).

As manifestações da poluição sobre a superfície ocular pode abranger desde sintomas leves ou ausentes a desconforto crônico e irritação ocular.

Situações específicas como o uso de lentes de contato ou doenças sistêmicas pré-existentes, como o diabetes, síndrome de Sjögren, artrite reumatóide, alergias, entre outros, bem como fatores intrínsecos individuais e comportamentais (Kjaergaard et al., 1992) e fatores ambientais (Paschides et al., 1998) poderiam agravar ou potencializar o efeito dos poluentes.

Os efeitos irritativos sobre o olho, até o momento, são baseados principalmente por relatos individuais (Ellegard 1997; Díaz et al., 2007; Díaz et al., 2008). O termo irritação ocular tem sido utilizado para referir-se às manifestações de vermelhidão, prurido, ardência e lacrimejamento oculares. Como os indivíduos diferem em relação à sensibilidade, o padrão de respostas depende de fatores psicológicos e fisiológicos, que são extremamente difíceis de serem controlados. Pode existir uma variabilidade grande entre um estudo e outro, portanto existe a necessidade de correlacionar as medidas subjetivas de irritação sensorial com medidas objetivas de alterações oculares induzidas pela poluição. Existem poucos estudos que comprovam a relação entre a percepção referida de irritação ocular e medidas objetivas de alterações fisiológicas, que validem as medidas subjetivas e ajudem na elucidação dos mecanismos fisiopatológicos das alterações induzidas pela poluição (Versura et al., 1999; Saxena et al., 2003; Ansonye et al., 2004).

No estudo de Versura et al. (1999), foi encontrada uma maior frequência de “síndrome do desconforto ocular” em indivíduos que procuraram o serviço de emergência oftalmológica. Esses sintomas foram associados à redução na produção lacrimal observada pelo teste de

Schirmer e uma instabilidade do filme lacrimal detectada pelo tempo de rotura do filme lacrimal (TRFL), durante o verão e inverno, em dois períodos em que houve picos de poluição documentados. Neste mesmo estudo, foram descritas alterações citológicas nesses pacientes, como perda de células caliciformes e presença de queratinização e células inflamatórias, naqueles que viviam em áreas mais poluídas.

Posteriormente, Saxena et al. (2003) também observaram os mesmos efeitos irritativos, como presença de vermelhidão e irritação ocular em indivíduos residentes em áreas mais poluídas, corroborado por Sánchez-Carrilo et al. (2003). Assim como no estudo de Versura et al. (1999), Saxena et al. (2003) detectaram piores resultados no teste de Schirmer I e no TRFL.

Asonye & Bello (2004) ainda associaram esses sintomas irritativos comumente observados com a presença de carbono grafítico e tetraetila nas amostras de lágrima em crianças que residiam em locais próximos à indústria petroquímica e de refinaria.

Alterações sub-clínicas foram observadas no estudo de Bourcier *et al.* (2003), sendo que houve maior frequência na presença de conjuntivite associada com concentrações elevadas de NO₂, NO, temperatura e baixa turbulência do ar. Nesse mesmo estudo, altos níveis de poluição ainda foram acompanhados por um aumento nos atendimentos de emergência hospitalares.

De modo similar, no que tange ao tema queima da biomassa e superfície ocular, os sintomas oculares observados foram de desconforto e lacrimejamento, tanto em indivíduos expostos às emissões de incêndios

florestais (Künzli et al. 2006) quanto da queima da biomassa em ambientes internos (Ellegard, 1997; Díaz et al., 2006; Díaz et al., 2008).

Além disso, um estudo epidemiológico observou que a queima da madeira foi associada a um aumento no risco de catarata em 2,12 vezes (IC 95% 1,03-4,34; Saha et al., 2005). Embora haja poucos estudos epidemiológicos que explorem o efeito da queima de biocombustíveis na etiologia da catarata, estudos experimentais com camundongos demonstraram danos à superfície ocular, causando descoloração, opacidades e aumento de debris. Provavelmente, a fumaça, que contém os agentes tóxicos, são capazes de oxidar moléculas presentes na superfície ocular e geram espécies reativas de oxigênio, que diminuem o pH da lágrima, provocam danos no tecido epitelial e consequentemente, inflamação e o surgimento de complicações e doenças oculares.

Embora haja evidências dos efeitos da poluição sobre a superfície ocular, somente os estudos de Versura et al. (1999) e Saxena et al. (2003) nos fornecem informações mais precisas, através da correlação de exames e testes clínicos e análise histológica. Seriam importantes mais estudos enfocando a análise do comportamento celular do tecido epitelial da superfície ocular e do filme lacrimal, que permitam buscar respostas para compreender os mecanismos que envolvem e provocam a instabilidade do filme lacrimal. Esse tipo de análise molecular poderia nos fornecer informações sobre as alterações histológicas que ocorrem nos processos inflamatórios, alérgicos, tumores, bem como verificar os fatores agravantes, por ex. poluição, que acometem a mucosa conjuntival (Novaes et al., 2007).

O estudo recente de Novaes et al. (2007) foi o primeiro trabalho investigado no Brasil que correlacionou a exposição individual aos poluentes urbanos com alterações no epitélio secretor da mucosa conjuntival e os níveis de NO₂. Neste trabalho detectamos um aumento significativo de células caliciformes da mucosa conjuntival em indivíduos expostos cronicamente aos poluentes atmosféricos urbano. O NO₂ foi usado como o poluente de referência das emissões veiculares.

Esses dados coincidem com os achados encontrados em cerca de 8.000 indivíduos avaliados entre 2000 e 2006 na cidade de Buenos Aires, que apresentavam uma correlação direta entre o aumento de células caliciformes com o aumento de emissões veiculares registradas pelo sistema de monitoramento ambiental da cidade (Berra et al, 2008). Os resultados em humanos foram sustentados por modelo experimental, em que camundongos expostos cronicamente a níveis ambientais de poluição também revelou um aumento de células caliciformes no epitélio conjuntival (Santo 2007).

A hiperplasia de células caliciformes é uma resposta estereotipada das mucosas expostas cronicamente à poluição do ar, já observada nos estudos de Saldiva et al. (1992) e Camargo Pires-Neto et al. (2006) em pulmão e epitélio nasal de ratos e no estudo de Souza et al. (1998) em humanos. Assim como no epitélio pulmonar, os achados oculares indicam que a mucosa ocular também é um alvo para a agressão ambiental crônica, podendo ser usada como bioindicador dos efeitos adversos da poluição sobre a saúde.

Do ponto de vista clínico, os estudos supracitados contribuíram significativamente para reforçar a importância da poluição atmosférica urbana e da queima da vegetação como um fator a ser considerado nos atendimentos ambulatoriais e de emergência.

Os achados do nosso grupo implicam na investigação do papel do muco como mecanismo de defesa frente à agressão crônica à mucosa conjuntival e conseqüentemente na importância do papel das mucinas, os principais componentes produzidos pelas células caliciformes do tecido epitelial da conjuntiva e das glândulas lacrimais.

As mucinas do tecido conjuntival compõem uma barreira física (glicocálice) e química e têm um papel essencial no mecanismo de defesa, associando-se à patógenos para que as células fagocitárias possam reconhecer e destruir o agente infeccioso. Também podem ser secretadas para a camada mucosa do filme lacrimal, como componente essencial para a lágrima. Os níveis de mucina liberados para o filme lacrimal são cruciais para a manutenção da integridade da superfície ocular, e qualquer alteração na quantidade ou na qualidade das mucinas pode ser um fator desencadeante de doenças da superfície ocular (Watanabe, 2002; Dartt, 2004).

Cabe lembrar que a quantidade de mucina pode ser regulada por três diferentes processos: pela proliferação das células caliciformes, taxa de síntese de mucinas e pela secreção de mucinas estocadas frente a um determinado estímulo (Dartt, 2004).

Os pesquisadores sugerem que os fatores envolvidos na taxa proliferativa bem como na síntese e secreção de mucinas parece estar associados à presença de fatores de crescimento. Por exemplo, o fator de crescimento endotelial (EGF) tem sido associado à ativação da cascata de sinalização envolvendo as proteínas quinases mitogênicas (MAPK), responsáveis pelo estímulo da proliferação e secreção de mucinas (Nadel et al., 2001; Kanno et al., 2003; Horikawa et al., 2003; Dartt 2004; Hewson et al., 2004).

Outros fatores, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), TGF- β e membros da família das neutrofinas também parecem estar envolvidos na produção das mucinas (Dartt et al., 2004; Gu et al., 2008; Lambiase et al., 2009).

Além disso, tem sido demonstrado que o controle das mucinas talvez possa envolver estímulos parassimpáticos e a presença de nucleotídeos, como uracila e adenosina trifosfato. Paralelamente, seus receptores foram observados nas células caliciformes (Dartt, 2004).

2.9 Citologia de impressão: um método para avaliação do tecido epitelial ocular frente à exposição à poluição do ar

A análise morfométrica do epitélio mucosecretor e não-secretor é um método muito utilizado para estudar as em diversas doenças que acometem a superfície ocular. Recentemente nosso grupo utilizou esta técnica para avaliar as alterações da superfície ocular, onde foram encontradas

associação entre as alterações na mucosa conjuntival e os níveis de poluição individual (Novaes et al., 2007).

A citologia de impressão é uma técnica não invasiva para o estudo do epitélio conjuntival e corneal, e representa uma alternativa para os raspados e biópsias da conjuntiva, causando um mínimo desconforto ao paciente (Calonge et al., 2004; Singh et al., 2005; Haller-Schober et al., 2006 ; Figura 4).

Figura 4. Coleta de citologia de impressão da região tarsal inferior após prévia anestesia tópica.

A técnica consiste em obter uma amostra das camadas mais superficiais do epitélio através da aposição de um fragmento de papel de 0,22 a 0,44 μm , de acetato de celulose ou nitrocelulose, no olho previamente

anestesiado. O papel tem a propriedade de aderir as células do epitélio ocular quando ele é retirado. Em seguida, as células são fixadas no papel utilizando um fixador e coradas com PAS e hematoxilina para a visualização em microscópio óptico. Ao final deste procedimento pode-se detectar a morfologia das células epiteliais não-secretoras, células caliciformes e presença de células do sistema imune (Calonge et al., 2004; Sigh et al., 2005; Haller-Schober et al., 2006).

O estágio das alterações que ocorrem na conjuntiva pode ser classificado por diversos sistemas de graduação. A primeira classificação foi proposta por Nelson em 1983 e posteriormente reformulada em 1988, em que o autor baseou-se na morfologia das células epiteliais não-secretoras, na relação núcleo-citoplasma, na metacromasia do citoplasma, na densidade de células caliciformes e no grau de metaplasia escamosa. Com base nas alterações encontradas, as citologias podem ser classificadas em 4 graus (0,1,2 ou 3), conforme a tabela 3. O sistema de classificação proposto por Nelson et al. (1988) é a mais utilizada pelos estudos. Alguns anos anteriores a este período, Tseng et al. (1985) havia publicado um sistema de graduação, com escalas de 0 a 5, incluindo o grau de queratinização das células epiteliais com base na perda de células caliciformes, aumento da estratificação e presença ou não de queratinização. Posteriormente, Adams (1988) adicionou ao sistema proposto por Tseng et al. (1985), o grau de coesão entre as células epiteliais. Por fim, Heiligenhaus et al. (1995)* citado por Haller-Schober et al. (2006) incrementou o parâmetro de grau de condensação da cromatina nuclear.

Baseada nos critérios descritos acima, a citologia de impressão tem sido usada para a avaliação de diversas doenças da superfície ocular, tais como ceratoconjuntivite sica (Haller-Schober et al., 2006), deficiência limbal (López-García et al., 2006), ceratoconjuntivite primaveril (Camargo et al., 2004), infecções virais (Thiel et al., 1997) e neoplasia escamosa (Tananuvat et al., 2008) .

Esta técnica pode auxiliar no diagnóstico diferencial de doenças da superfície ocular, por exemplo, pacientes com olho seco apresentam diminuição ou ausência de células caliciformes na conjuntiva bulbar, muitas vezes associada a uma metaplasia de células epiteliais e queratinização em casos mais graves. Já indivíduos com alergia ocular apresentam hiperplasia de células caliciformes e presença de eosinófilos, e suas células epiteliais não-secretoras estão normais. Rivas et al. (2002) demonstraram que a citologia de impressão ainda é capaz de distinguir pacientes com Síndrome de Sjögren primário, uma doença auto-imune cujos indivíduos desenvolvem o quadro de olho seco, de pacientes com olho seco sem a doença auto-imune. Por ser uma metodologia rápida, pequenas alterações histológicas poderiam colaborar para o diagnóstico antes mesmo das provas séricas.

Adicionalmente, a citologia de impressão pode ser aplicada para monitorar os efeitos do tratamento e pode ainda servir como material para realizar técnicas de imunohistoquímica e biologia molecular, para a determinação de parâmetros inflamatórios e presença de agentes infecciosos usando anticorpos específicos para o antígeno a ser detectado e

o estudo da expressão gênica das moléculas cujos níveis podem estar alterados (Thiel et al., 1997).

Diferentemente, este é o primeiro estudo que utiliza um método de morfometria denominado de Contagem de Pontos Cruzados para quantificar a densidade de células caliciformes e o muco produzido sobre a superfície ocular. Até o momento, esta técnica havia sido utilizada somente nos estudos para quantificar a densidade de células caliciformes e o muco produzido em cortes histológicos de pulmão em camundongos submetidos às câmaras de poluição (Camargo Pires-Neto et al., 2006). A idéia inicial foi padronizar um método morfométrico que permitisse a quantificação de células caliciformes e muco da superfície ocular quando a contagem das células caliciformes não fosse possível, dado que em algumas situações há uma enorme quantidade de células caliciformes sobrepostas umas às outras. A limitação do Método pela Contagem dos Pontos Cruzados é que não se pode afirmar a ocorrência de hiperplasia de células caliciformes pois não permite a contagem unitárias das células. No entanto, uma vez observado alterações na densidade do muco produzido pelas células caliciformes, pode-se associar metodologias que permitam verificar a ocorrência de proliferação ou apoptose e a secreção de muco, utilizando para tal marcadores específicos.

Em suma, os estudos de Novaes et al. (2007), Berra et al. (2008) e o estudo proposto demonstra que a citologia de impressão mostra-se como um bom indicador para monitorar a superfície ocular frente à exposição aos poluentes atmosféricos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Verificar o efeito dos poluentes emitidos pela queima da cana-de-açúcar sobre a superfície ocular nos cortadores de cana e na população no entorno das queimadas, através de exames clínicos e da análise histológica.

Vimos durante a revisão de literatura que não há trabalhos que reportem se as atuações periódicas das emissões geradas pela queima poderiam provocar alterações significativas sobre a superfície ocular. Observamos também que os estudos mostram que a poluição do ar urbano pode alterar a camada muco-secretora do filme lacrimal e induzir uma maior frequência de irritação ocular.

É importante lembrar que a superfície ocular está diretamente exposta aos efeitos dos poluentes presentes no ar e que esses agentes tóxicos, em concentrações elevadas por um curto e/ou longo período de tempo, podem alterar as características e a composição físico-química da mesma, modificando sobremaneira o padrão das proteínas e dos lipídios presentes nas camadas do filme lacrimal influenciando no mecanismo fisiológico das glândulas lacrimais responsáveis pela quantidade e qualidade da lágrima.

Essas mudanças nas camadas da superfície ocular induzem à instabilidade do filme lacrimal, resultando na diminuição da acuidade visual, no surgimento de doenças oculares que afetam a qualidade de vida ou levar à cegueira.

3.2 Objetivos específicos

- 1) investigar se os poluentes emitidos pela queima da cana-de-açúcar durante a safra podem a) alterar a quantidade de lágrima pelas glândulas lacrimais, b) alterar a quantidade do muco produzido pelas células caliciformes da mucosa conjuntival, c) induzir à instabilidade do filme lacrimal, d) induzir uma maior frequência de sintomas de irritação ocular, e) provocar a desepitelização e desvitalização do epitélio conjuntival e corneal, f) provocar alterações nas pálpebras, conjuntiva, córnea e filme lacrimal nos cortadores de cana e na população próxima às queimadas;
- 2) comparar as possíveis alterações oculares ocorridas durante a queima nos cortadores de cana com a superfície ocular desses mesmos indivíduos durante a entressafra (período sem queima);
- 3) estudar se ocorrem alterações sobre a superfície ocular nos cortadores de cana em decorrência dos anos de exposição crônica às emissões sazonais da queima;
- 4) e comparar a superfície ocular de cortadores de cana e da população urbana (não-cortadores) durante a safra em relação às alterações supracitadas.

4 MÉTODOS

4.1 Casuística

Participaram deste estudo 41 voluntários da região de Tatuí no Estado de São Paulo, que foram distribuídos em dois grupos:

Grupo dos Cortadores de Cana (CC): constituído de 22 indivíduos, todos do sexo masculino, com idades variando de 23 a 45 anos (média±DP: 31±5,7).

Grupo Controle (Ctr): constituído de 19 indivíduos, todos do sexo masculino, com idades variando de 22 a 44 anos (média=35±5,1).

O grupo CC foi submetido às avaliações oftalmológicas clínicas e laboratoriais durante o período da entressafra da cana-de-açúcar, em fevereiro e março de 2008. Essas mesmas avaliações foram repetidas durante o período da queima da cana, em setembro a novembro de 2008. O grupo Ctr foi avaliado somente durante o período da safra em setembro de 2008.

O grupo dos cortadores de cana foi avaliado durante cinco semanas seguidas e divididos em subgrupos de seis indivíduos por semana. A cada sábado, cerca de seis cortadores de cana partiam da região de Tatuí-SP, às 5h e chegavam ao Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (INCOR-HCFMUSP), às 8h. Imediatamente eram submetidos ao questionário de sintomas oculares e posteriormente submetidos à coleta da citologia de impressão.

Essas avaliações foram realizadas em uma sala gentilmente cedida pelo INCOR.

Às quartas-feiras, os mesmos indivíduos eram conduzidos ao Ambulatório de Oftalmologia do HCFMUSP para realizar os exames oftalmológicos restantes de biomicroscopia, colorações vitais, tempo de rotura do filme lacrimal e teste de Schirmer I. As avaliações clínicas foram realizadas pela oftalmologista Dra. Priscila Novaes.

As mesmas avaliações foram conduzidas no grupo controle na cidade de Tatuí-SP.

4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos indivíduos com histórico de:

- a) Uso de lentes de contato;
- b) Uso de medicamentos tópicos, corticóides e anti-inflamatórios não esteroidais nos últimos 3 meses;
- c) Uso de medicamentos sistêmicos;
- d) Portadores de doenças sistêmicas;
- e) Portadores de síndromes e malformações oculares;
- f) Infecções oculares durante o projeto.

4.3 Aspectos Éticos

Este trabalho faz parte do projeto principal **“Avaliação dos impactos da expansão sucroalcooleira na saúde dos trabalhadores e da população afetada”** (ANEXO D) sob a coordenação do Dr. Ubiratan de

Paula Santos em que foram avaliados outros parâmetros clínicos, como abordagens sobre o sistema respiratório. O projeto e o termo de consentimento pós-informado foram submetidos ao Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq) e foi aprovado nesta Instituição (Anexos A e C).

As avaliações nos indivíduos que participaram deste estudo foram conduzidas sob acompanhamento do médico responsável.

No termo de consentimento pós-informado constavam todas as informações necessárias acerca dos objetivos do estudo, do protocolo de avaliações oculares e da conduta de encaminhamento posterior à sua conclusão, caso fosse necessário algum tratamento oftalmológico.

4.4 Infraestrutura e materiais utilizados

Os materiais dos testes clínicos oftalmológicos (*strips* para os testes de Schirmer I, Rosa Bengala e Fluoresceína) foram gentilmente cedidos pela Ophthalmos Ind. e Com. de Produtos Farmacêuticos Ltda., mediante a apresentação da proposta do estudo em questão. A lâmpada de fenda utilizada para as avaliações clínicas pertence à Divisão de Clínica Oftalmológica do HC-FMUSP. O processamento histológico das amostras de citologia de impressão foi executado pelo serviço do Laboratório de Histologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP. As análises morfométricas do muco ocular das lâminas de citologia foram

realizadas no microscópio óptico do Laboratório de Investigação em Oftalmologia – LIM33 da Faculdade de Medicina da USP.

4.5 Avaliação ambiental de material particulado, da temperatura e da umidade relativa do ar

Medidas das concentrações do MP_{2.5} (Monitor DUSTTRAK Aerosol, modelo 8520), foram realizadas em três períodos de 10 dias cada uma, durante a atividade de corte da cana queimada, e concomitantemente, no centro da cidade de Tatuí, todas realizadas no mês de novembro/2007. As avaliações ambientais foram repetidas durante as atividades de preparo do solo e corte da cana crua nos canaviais, durante a entressafra, no mês de fevereiro/2008. As determinações da temperatura e da umidade relativa do ar foram feitas com emprego de termohigrômetro digital, nos mesmos períodos da avaliação do material particulado. Os resultados das concentrações do MP_{2.5} foram expressos em $\mu\text{g}/\text{m}^3$, de temperatura em graus Celsius e de umidade em porcentagem.

Foi considerada para análise estatística, a média dos três períodos de 10 dias em cada situação.

4.6 Avaliações Oculares

4.6.1 Questionário de sintomas

Todos os pacientes foram submetidos a um questionário de sintomas oculares (anexo B) composto por nove questões para avaliar a presença ou ausência de areia/cisco, irritação, olho seco, peso e cansaço, ardor, fotofobia, lacrimejamento, vermelhidão e prurido.

4.6.2 Antecedentes Oftalmológicos

Foram abordadas questões a respeito da presença ou ausência de problema nos olhos, cirurgias prévias ou uso de medicação tópica ocular.

4.6.3 Biomicroscopia

A avaliação externa das pálpebras, glândulas de Meibomius, conjuntiva, córnea, menisco lacrimal e filme lacrimal foi realizada com o auxílio da lâmpada de fenda. O intuito desta avaliação é observar alterações que podem estar presentes em cada região (listadas no anexo B). Para fins estatísticos, essas variáveis foram analisadas de acordo com a presença ou ausência da alteração em cada região.

Ainda, foram avaliadas a frequência do grau de severidade das alterações de meibomite, blefarite, hiperemia, pterígeo, papilas e folículos, sendo que o grau variou de 1 a 4, sendo 1 o grau mais leve e 4 o grau mais severo de cada alteração.

4.6.4 Tempo de Rotura do Filme Lacrimal (TRFL)

O TRFL é um exame em que se observa a estabilidade do filme lacrimal, que depende da integridade do epitélio e de todas as camadas do filme lacrimal. O TRFL consiste na observação do tempo entre o último pestanejar até o aparecimento do primeiro ponto de dessecação na córnea. Ele é realizado sob a lâmpada de fenda após a aplicação de duas tiras de papel estéreis contendo 1 mg de fluoresceína sódica (Ophthalmos) previamente umedecidas com uma gota de solução salina estéril. As tiras umedecidas foram aplicadas levemente sobre o fórnice da conjuntiva bulbar inferior nos olhos direito e esquerdo do sujeito avaliado. Em seguida, foi solicitado para que o sujeito piscasse várias vezes para espalhar a fluoresceína sobre a superfície ocular. A fluoresceína é uma substância fluorescente que fornece um espectro verde quando submetida à luz de comprimento de onda de 465 e 490 nm (espectro azul). Com o auxílio da lâmpada de luz de cobalto, foi solicitado ao avaliado para que permanecesse sem piscar até o próximo comando para que pudesse voltar a piscar normalmente. Com o auxílio de um cronômetro, foi anotado o intervalo (em segundos) entre o último piscar e o primeiro ponto de dessecação corneal observado. Esse procedimento foi realizado três vezes seguidas para cada avaliado, sendo considerada a média dessas três avaliações. Valores acima de 10 segundos são considerados normais, valores entre 6 e 10 segundos são considerados baixos e entre 0 e 5 segundos são considerados muito baixos.

4.6.5 Colorações Vitais

4.6.5.1 Fluoresceína

Ainda sob a ação da fluoresceína aplicada para a avaliação do TRFL, foi realizada a avaliação da córnea com o intuito de verificar a presença de defeitos epiteliais, desepitelização, ulcerações e pontuações.

A intensidade de impregnação da fluoresceína foi graduada segundo o critério proposto por van Bijsterveld (1969), que divide a córnea em três regiões: superior, medial e inferior (conforme desenho do anexo B). Em cada porção é dada uma pontuação de 0 a 3, sendo que a soma total máxima é de 9. A pontuação de 0 indica ausência de áreas ponteadas; uma pontuação de 1 indica a presença de pequenos pontos esparsos; uma pontuação de 2 indica a presença de pontos convergentes e a pontuação de 3 indica a presença de pontos com total convergência. É considerado alterado uma pontuação total ≥ 3 .

4.6.5.2 Rosa Bengala

Outro corante vital usado foi o Rosa Bengala que possui a propriedade de corar em vermelho as áreas dos epitélios da conjuntiva e da córnea desvitalizadas, assim como o muco e filamentos corneais. Duas tiras de papel estéreis impregnadas com 1,3 mg de corante Rosa Bengala (Ophthalmos) foram umedecidas com uma gota de solução salina estéril. As tiras umedecidas foram aplicadas levemente sobre o fórnice da conjuntiva bulbar inferior nos olhos direito e esquerdo do sujeito avaliado.

A intensidade de impregnação da Rosa Bengala foi graduada segundo o critério proposto por van Bijsterveld (1969), que divide a conjuntiva em duas regiões: nasal e temporal e a região da córnea (conforme desenho do anexo B). Em cada região é dada uma pontuação de 0 a 3, sendo a soma total máxima de 9. A pontuação de 0 indica ausência de áreas ponteadas; uma pontuação de 1 indica a presença de pequenos pontos esparsos; uma pontuação de 2 indica a presença de pontos convergentes e a pontuação de 3 indica a presença de pontos com total convergência. É considerado alterado uma pontuação total ≥ 3 .

4.6.6 Teste de Schirmer I

Após 15 minutos transcorridos do exame pelos corantes vitais, foi realizado o Teste de Schirmer I para a avaliação da quantidade de lágrimas produzidas pelas glândulas lacrimais. Neste estudo, observamos a secreção total da lágrima (basal e reflexa), sem prévia anestesia tópica.

Para tal, foram introduzidas duas tiras estéreis (Ophthalmos), uma de cada lado do olho, a um terço da distância do canto lateral e apoiado sobre o fórnice conjuntival inferior do olho direito e esquerdo, sem tocar a córnea. Essas tiras são constituídas de papel filtro Whatman nº41 de tamanho 5 mm x 60 mm. A ponta distal é arredondada e possui uma marcação a 0,5 cm de distância da extremidade, onde tem início a escala milimétrica de 0 a 35 mm.

Os indivíduos ficaram sentados em uma sala com iluminação indireta e sem correntes de ar. As tiras foram dispostas por 5 minutos com os olhos fechados, sem contração das pálpebras. Após este período, as tiras foram

retiradas e foi anotado o comprimento da porção úmida dada pela medida da escala milimetrada dos dois olhos separadamente.

Foi considerada como valor normal para a produção de lágrima uma medida ≥ 10 mm na tira de papel. Para fins estatísticos, foi considerada a média dos dois olhos.

4.6.7 Citologia de Impressão

A análise histológica do epitélio da região tarsal da conjuntiva foi realizada pela técnica de citologia de impressão. Este método de avaliação permite a coleta e análise morfológica e quantitativa das células epiteliais não-secretoras e secretoras (caliciformes) da conjuntiva.

Previamente ao exame foi instilado uma gota de anestésico tópico cloridrato de proximetacaína a 0,5% (Anestalcon) em cada olho. Em seguida, a impressão foi tomada através da aposição de um papel de filtro de poliestersulfona de 0,22 μ m de poro (Millipore GSWP04700) sobre a conjuntiva e pressionado por 5 segundos com a parte posterior de uma pinça. Após este período as membranas foram retiradas do olho cuidadosamente com o auxílio de uma pinça de conjuntiva e fixadas imediatamente em tubos contendo álcool etílico absoluto. Todas as membranas haviam sido previamente esterilizadas por óxido de etileno. Para a coleta da impressão da região tarsal da conjuntiva foi padronizado o formato arredondado “meia-lua”, de modo a acomodar melhor o papel de filtro sobre a tarsal e com um corte diagonal para indicar a posição superior do filtro.

Após a fixação, as membranas foram coradas pela técnica de Ácido Periódico de Schiff (PAS) para a coloração de muco neutro, conforme a descrição a seguir:

1. Três lavagens com água destilada;
2. Submersão das membranas em Ácido Periódico 0,5% por 10 minutos;
3. Três lavagens com água destilada;
4. Submersão das membranas no Reagente de Schiff por 10 minutos (protegido da luz);
5. Lavagens das membranas com água destilada para ativação do Reagente de Schiff , até que as mesmas se tornem rosadas;
6. Submersão das membranas em Hematoxilina de Carazzi por 5 minutos;
7. Três lavagens com água destilada;

O processo de desidratação foi realizado por uma bateria de álcool etílico (Merck) com diluições de 96%, 96%, 100%, 100%, 1:1 álcool absoluto:xilol, xilol e xilol, realizadas nesta sequência. Após a desidratação, as membranas foram dispostas nas lâminas e seladas permanentemente, visualizadas e documentadas em sistema de captação de imagens acopladas ao microscópio ótico Nikon modelo Eclipse 50i.

Para a quantificação das áreas PAS positivas da região tarsal da conjuntiva das amostras de citologia de impressão, foi utilizado o método de Contagem dos Pontos Cruzados. Neste método, um painel de pontos é acoplado à tela do computador, sendo este, por sua vez, integrado ao sistema de imagem do microscópio óptico. A imagem do campo da lâmina aleatoriamente escolhida é projetada na tela do computador e, em seguida, é feita a contagem dos pontos de intersecção contendo áreas PAS positivas. Para cada membrana foram contados 15 campos aleatoriamente escolhidos,

de modo que o erro padrão foi menor do que 5%. Foi considerada a média dos 15 campos para considerar o valor absoluto final. Para fins estatísticos, foi considerado o valor percentual relativo ao total de pontos de um campo a partir do valor absoluto final:

$$\text{Valor relativo} = \text{valor absoluto final} / \text{valor total de pontos} \times 100\%$$

Adicionalmente, foi realizada a análise morfológica baseada na classificação de Nelson (1988) com base nesses critérios da tabela 3.

Os dados foram interpretados descritivamente comparando a frequência em porcentagem.

Tabela 3. Classificação de Nelson (1988) para a análise morfológica e quantitativa das células epiteliais não-secretoras e das células caliciformes da conjuntiva pela técnica de citologia de impressão.

Graduação	Superfície ocular	Características das células epiteliais
0	Normal	Células epiteliais menores e citoplasma eosinofílico, núcleos grandes e basofílicos, razão núcleo-citoplasmática 1:2; células caliciformes abundantes, ovais e citoplasma PAS positivo.
1	Levemente alterada	Células epiteliais levemente maiores, poligonais e citoplasma eosinofílico; núcleos menores e basofílicos, razão núcleo-citoplasmática 1:3; células caliciformes em menor quantidade do que grau 0, ovais e citoplasma PAS positivo.
2	Alterada	Células epiteliais maiores, poligonais e citoplasma eosinofílico e basofílico; núcleos menores, razão núcleo-citoplasmática 1:4 a 1:5 e às vezes multinucleadas; poucas células caliciformes.
3	Muito alterada	Presença de metaplasia escamosa e queratinização. Células epiteliais grandes, poligonais e citoplasma basofílico; núcleos menores, picnóticos, razão núcleo-citoplasmática 1:6 ; células caliciformes ausentes.

4.7 Análise Estatística

As variáveis foram analisadas por métodos estatísticos descritivos (média, mediana, desvio padrão e intervalo de confiança de 95%). Todas as variáveis obtidas em cada avaliação ocular neste estudo foram analisadas para verificação do padrão de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

Para as diferenças entre os períodos de queima e entressafra das variáveis obtidas das citologias de impressão e do TRFL dos cortadores de cana foi utilizado o teste t de Student pareado. Para os valores de Schirmer I, Rosa Bengala e Fluoresceína foram utilizados o teste de Wilcoxon. Para as variáveis categóricas obtidas pelo questionário de sintomas e pela biomicroscopia, foi utilizado o teste de McNemar.

Para as comparações entre as variáveis dos cortadores de cana e dos voluntários da cidade foi utilizado o teste t de Student independente para os resultados das citologias de impressão e TRFL. Para os valores de Schirmer I, Rosa Bengala e Fluoresceína foram utilizados o teste de Mann-Whitney. Para a comparação das variáveis categóricas entre esses dois grupos, foi utilizado o teste de qui-quadrado.

Para determinar o padrão de associação entre os anos de exposição à queima da cana e os parâmetros oculares avaliados, os cortadores de cana foram distribuídos em três categorias de acordo com os anos de trabalho acumulados no corte da cana queimada:

- Categoria 1 (C1): inclui os cortadores de cana que trabalharam durante 2 a 5 anos no corte da cana queimada (média 2,8 anos);
- Categoria 2 (C2): inclui os cortadores de cana que trabalharam durante 7 a 18 anos no corte da cana queimada (média 12,5 anos);
- Categoria 3 (C3): inclui os cortadores de cana que trabalharam durante 20 a 27 anos no corte da cana queimada (média 23,5 anos);

Para verificar a associação entre as variáveis deste estudo e as categorias de anos no corte da cana queimada (C1, C2 e C3) utilizou-se modelos de regressão não-lineares. A comparação entre os valores médios das variáveis distribuídas nas três categorias foi feita por análise de variância (ANOVA).

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa SPSS (SPSS Incorporation, Chicago, Il., EUA), versão 13.0. O nível de significância adotado foi de 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 Os níveis de MP_{2,5} foram elevados nos canaviais

A tabela 4 mostra a análise descritiva dos níveis de MP_{2,5}, temperatura e umidade nas quatro situações: 1) durante a atividade de corte de cana queimada, 2) na atividade de preparo do solo nos canaviais durante a entressafra, 3) no corte da cana crua durante a entressafra e 4) na região urbana de Tatuí-SP durante o período de queima.

Os valores médios foram de MP_{2,5}($\mu\text{g}/\text{m}^3$) 90,3 $\pm$ 28,5 ; 62,5 $\pm$ 14,2; 41,9 $\pm$ 2,6 e 35 $\pm$ 5,77, respectivamente. A média dos níveis de MP_{2,5} apresentou-se maior durante o corte da cana queimada, seguida pelos níveis encontrados nas atividades de preparação do solo e corte da cana crua nos canaviais durante a entressafra. O menor nível foi constatado no perímetro urbano de Tatuí-SP durante o período de queima.

A média da temperatura apresentou-se também mais elevada durante o corte da cana queimada e na preparação do solo, seguida pelos níveis encontrados no corte da cana crua e no perímetro urbano.

Detectou-se também um valor médio de umidade menor durante o corte da cana queimada, seguida por valores semelhantes nas outras atividades e no perímetro urbano.

Tabela 4. Média dos níveis de MP_{2,5}, temperatura e umidade mensurados nos canaviais nas atividades de corte da cana e no perímetro urbano durante o período de queima; e nas atividades de preparação do solo e corte de cana crua nos canaviais durante o período de entressafra.

Atividade/Período	PM _{2,5} µg/m ³ média±DP (intervalo)	Temperature °C média±DP (intervalo)	Umidade média±DP (intervalo)
Corte da cana/ queima	90,3±28,5 (70-149)	31±4,5 (22-38)	43,5±8,9 (27-64)
Preparação do solo/ entressafra	62,5±14,2 (40-96)	30,8±2,3 (20-29)	60,1±10,3 (41-73)
Corte da cana crua/ entressafra	41,9±2,6 (40-48)	25,9±1,8 (22-28)	69,9±7,7 (52-79)
Cidade/ queima	35±5,77 (31-45)	18,6±0,33 (18-20)	63,2±2,55 (57-67)

5.2 Análise descritiva dos participantes do estudo

A tabela 5 mostra a análise descritiva dos grupos CC e Ctr em relação aos dados obtidos para a faixa etária, atividade ocupacional durante o período da queima e entresafra e o tempo em anos de trabalho acumulados no corte da cana queimada para os cortadores de cana, que foram distribuídos nas categorias C1, C2 e C3, conforme descrito anteriormente.

Os valores médios da faixa etária dos grupos CC e Ctr foram de $31 \pm 5,7$ anos e $35 \pm 5,1$ anos, respectivamente. Não houve diferenças estatísticas em relação à faixa etária ($p=0,11$).

A frequência dos cortadores envolvidos nas atividades dos canaviais durante a entresafra foi de 73% ($n=16$), sendo que o restante de 27% ($n=6$) não desenvolveram atividades relacionadas ao cultivo da cana-de-açúcar. Todos os indivíduos da cidade ($n=19$) possuíam atividades ocupacionais relacionadas ao comércio e serviços e não desenvolveram atividades relacionadas ao cultivo de cana-de-açúcar durante o período de queima.

Em relação ao tempo de trabalho no corte da cana queimada, cerca da metade dos cortadores foram inseridos na categoria 2 (C2), cuja média foi de 12,5 anos de trabalho nesta atividade.

Tabela 5. Características descritivas dos participantes do estudo			
Característica		Cortadores	Cidade
N		22	19
Faixa etária (anos)		31±5,7	35±5,1
Atividade ocupacional			
Cana-de-açúcar		16 (73)	-
Outras		6 (27)	19 (100)
Tempo de trabalho no corte da cana queimada	C1: 2-5 anos (média 2,8)	7 (32)	-
	C2: 7-18 anos (média 12,5)	12 (54)	-
	C3: 20-27 anos (média 23,5)	3 (14)	-
Os valores representam o n(%) ou média±DP.			
Atividade ocupacional para os cortadores e para os participantes do perímetro urbano refere-se aos períodos de entressafra e queima, respectivamente.			

5.3 Exames e Testes Clínicos

5.3.1 Os indivíduos avaliados não apresentaram diferenças nos sintomas oculares

A tabela 6 mostra a frequência dos sintomas durante os períodos de queima e entresafra para o grupo CC e durante a queima para o grupo Ctr.

Detectou-se a presença de todos os sintomas nos dois grupos, independentemente do período avaliado. A frequência dos sintomas foi de 18% a 68%, sendo os menos freqüentes a presença de olho seco e sensação de corpo estranho, com exceção do grupo Ctr, que relatou a presença de corpo estranho em 53%.

A irritação ocular esteve presente em 45% dos indivíduos do grupo CC durante a queima e entresafra e em 58% dos indivíduos do grupo Ctr. O sintoma de peso e cansaço ocular foi maior nos indivíduos do grupo CC durante a queima (60%) e menor durante a entresafra (41%). No grupo Ctr detectou-se a presença de sintoma de peso e cansaço ocular em 47% dos indivíduos. Já o sintoma de ardor foi menos frequente nos indivíduos do grupo CC durante a queima (32%), e mais frequente durante a entresafra (41%) e maior no grupo Ctr (53%).

A freqüência de fotofobia foi maior no grupo Ctr (58%) do que no grupo CC durante a queima (36%) e entresafra (46%). A presença de lacrimejamento também foi maior no grupo Ctr (53%) do que no grupo CC durante a queima (41%) e entresafra (36%).

A hiperemia foi o sintoma ocular mais frequente, estando presente em 64% e 55% dos indivíduos do grupo CC durante a queima e entresafra,

respectivamente, e em 68% dos indivíduos do grupo Ctr. A frequência de prurido foi de 45% e 41% dos indivíduos do grupo CC durante a queima e entresafra, respectivamente, e em 53% dos indivíduos do grupo Ctr.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes para as comparações das frequências entre os períodos do grupo CC e dos sintomas do grupo Ctr para todos os itens avaliados ($p > 0,05$).

Tabela 6. Frequência dos sintomas dos cortadores de cana (grupo CC) durante os períodos de queima (Q) e entressafra (E) e dos indivíduos do perímetro urbano durante o período de queima. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos (McNemar e qui-quadrado).

Sintomas		Grupo CC		Grupo Ctr
		Q	E	Q
Sensação de corpo estranho	Sim	5 (23)	4 (18)	10 (53)
	Não	17 (77)	18 (82)	9 (47)
Irritação	Sim	10 (45)	10 (45)	11 (58)
	Não	12 (55)	12 (55)	8 (42)
Olho seco	Sim	4 (18)	6 (27)	4 (21)
	Não	18 (82)	16 (73)	15 (79)
Peso e cansaço	Sim	13 (59)	9 (41)	9 (47)
	Não	9 (41)	13 (59)	10 (53)
Queimação	Sim	7 (32)	9 (41)	10 (53)
	Não	15 (68)	13 (59)	9 (47)
Fotofobia	Sim	8 (36)	10 (45)	11 (58)
	Não	14 (64)	12 (55)	8 (42)
Lacrimejamento	Sim	9 (41)	8 (36)	10 (53)
	Não	13 (59)	14 (64)	9 (47)
Vermelhidão	Sim	14 (64)	12 (54)	13 (68)
	Não	8 (36)	10 (56)	6 (32)
Prurido	Sim	10 (45)	9 (41)	10 (53)
	Não	12 (55)	13 (59)	9 (47)

Os valores representam o n(%).

5.3.2 Biomicroscopia

A tabela 7 apresenta os resultados da frequência das alterações nas pálpebras, filme lacrimal, córnea e conjuntiva observadas na avaliação para o grupo CC durante os dois períodos e para o grupo Ctr durante a queima.

5.3.2.1 Observa-se presença marcante de meibomite

Dentre as alterações nas pálpebras, foi constatada somente a presença de meibomite e blefarite, sendo ausentes alterações como triquíase, tumor ou irregularidade. No geral, houve uma presença marcante de meibomite em todos os grupos e períodos avaliados. No grupo CC a frequência foi de 82% e 91% durante o período da queima e entressafra, respectivamente, e de 79% no grupo Ctr durante o período de queima. A frequência de blefarite no grupo CC foi de 17% e 18% durante o período da queima e entressafra, respectivamente, e de 11% no grupo Ctr durante o período de queima. Não houve diferenças estatísticas nas comparações da frequência de meibomite e blefarite entre os períodos e grupos.

Em relação ao grau de severidade, o grupo CC durante a queima foi o único a apresentar um grau de meibomite com severidade 3, sendo constatada a presença em 5% dos cortadores nesta condição. Não houve grandes diferenças no grau de severidade entre os períodos do grupo CC e o grupo Ctr. O grau máximo de severidade de blefarite encontrada no grupo CC e Ctr em ambos os períodos foi de 2.

Tabela 7. Frequência das alterações nas pálpebras, filme lacrimal, córnea e conjuntiva avaliadas pela biomicroscopia nos cortadores de cana (grupo CC) durante os períodos de queima (Q) e entressafra (E) e nos indivíduos do perímetro urbano durante o período de queima. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e períodos (McNemar e qui-quadrado).

Alterações		Grupo CC		Grupo Ctr
Pálpebras		Q	E	Q
Meibomite	Sim	18 (82)	20 (91)	15 (79)
	Não	4 (18)	2 (9)	4 (21)
Blefarite	Sim	4 (18)	4 (18)	2 (11)
	Não	18 (82)	18 (82)	17 (89)
Triquíase	Sim	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Não	22 (100)	22 (100)	19 (100)
Tumor	Sim	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Não	22 (100)	22 (100)	19 (100)
Irregularidade	Sim	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Não	22 (100)	22 (100)	19 (100)
Filme lacrimal				
Muco	Sim	0 (0)	5 (23)	1 (5)
	Não	22 (100)	17 (77)	18 (95)
Oleosidade	Sim	3 (14)	8 (36)	5 (26)
	Não	19 (86)	14 (64)	14 (74)
Córnea				
Opacidade	Sim	0 (0)	0 (0)	1 (5)
	Não	22 (100)	22 (100)	18 (95)
Desepitelização	Sim	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Não	22 (100)	22 (100)	19 (100)
Afilamento	Sim	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Não	22 (100)	22 (100)	19 (100)
Úlcera	Sim	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Não	22 (100)	22 (100)	19 (100)
Infiltrados/depósitos	Sim	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Não	22 (100)	22 (100)	19 (100)
Conjuntiva				
Hiperemia	Sim	2 (9)	7 (32)	3 (16)
	Não	20 (91)	15 (68)	16 (84)
Pinguécua	Sim	14 (64)	14 (64)	13 (69)
	Não	8 (36)	8 (36)	6 (31)
Pterígio	Sim	6 (27)	6 (27)	3 (17)
	Não	16 (73)	16 (73)	16 (83)
Papilas	Sim	2 (9)	1 (5)	1 (5)
	Não	20 (91)	21 (95)	18 (95)
Concreções	Sim	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Não	22 (100)	22 (100)	19 (100)

Os valores representam n(%).

5.3.2.2 Aumento na frequência de muco e oleosidade no filme lacrimal dos cortadores durante a entressafra

A análise das alterações do filme lacrimal revelou a presença de muco e oleosidade. Detectou-se a presença de muco em 23% dos indivíduos do grupo CC durante a entressafra e não foi observada a presença de muco durante o período de queima. Apesar da tendência de aumento na frequência de muco durante a entressafra, a diferença entre os períodos não foi estatisticamente significativa ($p=0,063$).

Para o grupo Ctr analisados, durante a queima, somente 5% dos indivíduos apresentaram muco. Houve também um aumento na frequência de oleosidade no grupo CC durante a entressafra (36%) quando comparados com o período da queima (14%). Essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,125$). No grupo Ctr, 26% dos indivíduos apresentaram oleosidade no filme lacrimal, sendo que não houve diferenças estatisticamente significantes quando comparados com as frequências encontradas para ambos os períodos do grupo CC.

5.3.2.3 Os indivíduos não apresentaram alterações na córnea

Com exceção de um indivíduo do grupo Ctr que apresentou opacidade na córnea devido a um trauma físico ocular, não foram detectadas alterações na córnea no grupo CC em ambos os períodos e no grupo Ctr.

5.3.2.4 Aumento na frequência de hiperemia nos cortadores de cana durante a entressafra

Entre as alterações encontradas na conjuntiva, a hiperemia foi detectada com maior frequência no grupo CC durante a entressafra. A frequência de hiperemia no grupo CC durante a queima e entressafra foi de 9% e 32%, respectivamente. Embora tenha sido detectada uma tendência no aumento de hiperemia durante a entressafra, não houve diferença estatisticamente significativa quando comparada com a frequência do período de queima ($p=0,063$). A hiperemia no grupo Ctr foi detectada em 16% dos indivíduos. Não foram observadas diferenças entre as comparações das frequências dos períodos do grupo CC e do grupo Ctr.

Foram detectadas também a presença de pinguécula em 64% dos indivíduos do grupo CC em ambos os períodos e em 69% dos indivíduos do grupo Ctr.

O pterígio foi encontrado em 27% dos indivíduos do grupo CC em ambos os períodos e 16% dos indivíduos do grupo Ctr. Papilas foram encontradas em 9% e 5% dos indivíduos do grupo CC, respectivamente, e em 5% dos indivíduos do grupo Ctr. Concreções foram detectadas apenas em 9% dos cortadores durante a entressafra. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os períodos e grupos para as alterações da conjuntiva anteriormente descritas.

Quanto ao grau de severidade das alterações na conjuntiva, hiperemia e papilas alcançaram grau 1 no grupo CC em ambos períodos e no grupo Ctr durante a queima. O grau encontrado para o pterígio foi de no

máximo 2 para 14% e 18% dos indivíduos do grupo CC durante a queima e entresafra, respectivamente, e em 6% dos indivíduos do grupo Ctr. Não foram detectadas diferenças estatísticas entre os graus de pterígio para o grupo CC em ambos os períodos e para o grupo Ctr.

5.3.3 Não houve alterações na córnea e conjuntiva pela coloração por Rosa Bengala

Os valores medianos da avaliação da superfície ocular (córnea e conjuntiva) foram considerados dentro do padrão de normalidade segundo o critério de classificação de *van Bijsterveld* (1969).

Não se observou alterações significativas na córnea e conjuntiva nos indivíduos avaliados, com exceção de dois valores da entresafrá no grupo CC e em um indivíduo do grupo Ctr durante a queima, que apresentaram valores igual a 3 (Figura 5).

Não se constatou nenhuma associação da coloração da superfície ocular nos anos de trabalho no corte da cana queimada avaliados em ambos os períodos.

5.3.4 Não houve alteração da córnea pela coloração por fluoresceína para os grupos e períodos avaliados

Todos os indivíduos apresentaram valores de coloração por fluoresceína abaixo de 3 e foram considerados dentro do padrão de normalidade segundo o critério de classificação proposto por *van Bijsterveld* (1969).

Não foram encontradas diferenças entre os períodos do grupo CC e entre os valores do grupo CC e o grupo Ctr durante a queima.

Figura 5

Figura 5. Comparação entre os valores medianos de Rosa Bengala do grupo controle (Grupo Ctr) durante o período de queima e do grupo de cortadores de cana (Grupo CC) durante os períodos da queima e entressafra. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os períodos e grupos (teste de Mann-Whitney e Wilcoxon).

5.3.5 *corrência de instabilidade no filme lacrimal nos cortadores de cana durante o período da queima*

A figura 6 mostra os valores médios de TRFL para o grupo CC durante o período da queima e entresafra e para o grupo Ctr durante o período de queima. Os valores foram de 6 ± 3 ; 9 ± 6 e 9 ± 5 segundos, respectivamente. Os valores de TRFL foram considerados baixos de acordo com a classificação adotada.

Observou-se uma queda estatisticamente significativa na média do TRFL para o grupo CC durante o período de queima quando comparados com os valores médios desse mesmo grupo durante o período de entresafra ($p=0,025$).

A média do TRFL do grupo CC também foi menor do que a média do grupo Ctr, ambos avaliados durante o período de queima ($p=0,030$).

Não foram constatadas diferenças entre a média dos valores de TRFL do grupo CC durante o período de entresafra e a média do grupo Ctr durante o período da queima ($p=0,81$).

Figura 6

Figura 6. Comparação entre os valores médios do TRFL do grupo controle (Grupo Ctr) durante o período de queima e do grupo de cortadores de cana (Grupo CC) durante os períodos da queima e entressafra. Os símbolos marcados com asterisco representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p \leq 0,05$; teste t de Student). As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%.

5.3.6 *Exposição crônica às emissões dos poluentes gerados pela queima da cana tende a diminuir o TRFL*

A figura 7 e a tabela 8 mostram a relação entre as variáveis de TRFL durante a queima e entresafra nos anos de trabalho no corte da cana queimada.

Observou-se uma tendência à diminuição do TRFL no grupo CC com o decorrer dos anos de trabalho acumulados no corte da cana queimada durante o período da entresafra, entretanto não foi encontrada associação estatisticamente significativa ($p=0,29$).

Não foi observada correlação para os valores do período de queima.

Figura 7

Figura 7. Correlação entre os valores médios do TRFL distribuídos nas categorias C1, C2 e C3 durante os períodos de queima (barras azul-escuras) e entressafrá (barras azul-claras) do Grupo CC. Foram utilizados modelos de regressão não-lineares. Não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre as categorias. As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%.

Tabela 8. Distribuição dos valores médios das áreas PAS positivas, do TRFL e do teste de Schirmer I nas categorias C1, C2 e C3 durante os períodos de queima e entressafra.

Avaliações oculares	Periodo	C1 (n) média±DP	C2 (n) média±DP	C3 (n) média±DP	Coefficiente de determinação (R ²)	Valor-p
Áreas PAS positivas (%)	1	n=5 54,5±8,9	n=6 55,5±6,6	n=6 60,5±4	0,781	0,31
	2	n=5 58,6±11,5	n=6 65,4±10,7	n=6 67,9±13,8	0,99	0,015*
TRFL (segundos)	1	n=8 6,4±3,3	n=9 5,7±2,4	n=4 5,7±1,9	0,955	0,096
	2	n=8 10,1±5,2	n=9 9,8±6,4	n=4 5±3,0	0,619	0,29
Teste de Schirmer I (mm)	1	n=8 35	n=10 22	n=4 11,75	0,997	0,026*
	2	n=8 29,25	n=10 25	n=4 27,75	-0,082	0,081

1= queima, 2= entressafra

Valores representam o número de sujeitos (n) e média±DP ou mediana para cada avaliação ocular.

Correlações observadas usando modelos de regressão não-lineares

Teste de ANOVA - *P<0.05

5.3.7 Emissões geradas pela queima da cana não provocam alterações na quantidade de lágrimas

A figura 8 mostra os valores medianos do teste de Schirmer I para o grupo CC durante os períodos de queima e entressafra e para o grupo Ctr durante o período de queima. Os valores medianos foram de 22, 25,5 e 25,5mm, respectivamente. Os valores encontrados para o teste foram acima de 10 mm e, portanto, considerados dentro dos valores do padrão de normalidade.

Não foram encontradas diferenças entre os períodos de queima e entressafra para o grupo CC ($p=0,233$). As medianas do grupo CC e do grupo Ctr avaliadas durante o período de queima foram semelhantes.

Figura 8

Figura 8. Comparação entre os valores medianos do Teste de Schirmer I do grupo controle (Grupo Ctr) durante o período de queima e do grupo de cortadores de cana (Grupo CC) durante os períodos da queima e entressafra. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os períodos e grupos (teste de Mann-Whitney e Wilcoxon).

5.3.8 *Diminuição da quantidade de lágrima devido à exposição crônica às emissões dos poluentes gerados pela queima da cana*

A tabela 8 e figura 9 mostram a relação entre as variáveis de Schirmer I durante a queima e entressafra nos anos de trabalho no corte da cana queimada.

Ao contrário dos resultados das amostras de citologia de impressão, foi observada uma relação tempo-dependente entre a exposição crônica ao trabalho no corte da cana queimada e os valores medianos de Schirmer I avaliados durante o período da queima. Houve uma tendência à diminuição com o decorrer dos anos estatisticamente significativa ($R^2=0,99$ e $p=0,026$).

Não foi observada correlação para os valores do período de entressafra.

Figura 11

Figura 11. Correlação entre os valores médios das áreas PAS positivas distribuídos nas categorias C1, C2 e C3 durante os períodos de queima (barras azul-escuras) e entressafra (barras azul-claras) do Grupo CC. Foram utilizados modelos de regressão não-lineares. Os símbolos marcados com asterisco representam diferenças estatisticamente significantes entre as categorias ($p \leq 0,05$; teste ANOVA). As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%.

5.4 Citologia de Impressão

5.4.1 *Análise morfológica das células epiteliais não secretoras e quantificação de células caliciformes*

Todas as amostras de citologia de impressão do grupo CC nos períodos da queima e entressafra e do grupo Ctr no período da queima foram classificadas como grau zero pela graduação proposta por Nelson em 1988 (Tabela 3 descrita em Métodos).

As células epiteliais não secretoras da conjuntiva da região tarsal apresentaram núcleo grande, arredondado e basofílico, relação núcleo-citoplasmática 1:3, coloração citoplasmática eosinofílica, sem a presença de células inflamatórias. As células caliciformes foram abundantes com coloração positiva intensa para o PAS.

5.4.2 Diminuição das áreas PAS positivas nas amostras dos cortadores de cana durante o período da queima

A figura 10 representa os resultados obtidos para as áreas PAS positivas das amostras de citologia de impressão do grupo CC durante os períodos de queima e entressafra e do grupo Ctr durante o período da queima.

Observa-se uma diminuição significativa na média das áreas PAS positivas do grupo CC durante o período de queima ($57 \pm 7\%$) quando comparada com a média dos mesmos sujeitos avaliados durante o período da entressafra ($64 \pm 12\%$; $p=0,014$).

O grupo CC também apresentou uma média das áreas PAS positivas significativamente menor quando comparado com o grupo Ctr ($64 \pm 7\%$), ambos avaliados durante o período da queima ($p=0,009$).

Não foram encontradas diferenças entre os valores médios para as amostras do grupo CC durante o período da entressafra e o grupo Ctr durante o período da queima.

Figura 10

Figura 10. Comparação entre os valores médios da morfometria das áreas PAS positivas das amostras de citologia de impressão do grupo controle (Grupo Ctr) durante o período de queima e do grupo de cortadores de cana (Grupo CC) durante os períodos da queima e entressafra. Os símbolos marcados com asterisco representam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p \leq 0,01$). As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%. As fotos são representativas dos valores médios das áreas PAS positivas, sendo A para o grupo Ctr durante o período da queima; B e C para o grupo CC durante o período de queima e entressafra, respectivamente.

5.4.3 Exposição crônica às emissões dos poluentes gerados pela queima da cana aumenta a proporção de áreas PAS positivas

A tabela 8 e figura 11 mostram a relação entre a porcentagem de áreas PAS positivas durante a queima e entressafra nos anos de trabalho acumulados no corte da cana queimada.

Observa-se uma tendência no aumento da porcentagem das áreas PAS positivas conforme os anos de trabalho acumulados no corte da cana queimada distribuídos nas três categorias - C1, C2 e C3.

A comparação entre os valores médios das áreas PAS positivas nas três categorias revelou que esta associação foi estatisticamente significativa para o período da entressafra ($R^2=0,99$ e $p=0,015$).

Não foi observada correlação para os valores do período de queima.

Figura 11

Figura 11. Correlação entre os valores médios das áreas PAS positivas distribuídos nas categorias C1, C2 e C3 durante os períodos de queima (barras azul-escuras) e entressafra (barras azul-claras) do Grupo CC. Foram utilizados modelos de regressão não-lineares. Os símbolos marcados com asterisco representam diferenças estatisticamente significantes entre as categorias ($p \leq 0,05$; teste ANOVA). As barras de erro representam o intervalo de confiança de 95%.

6 DISCUSSÃO

A superfície ocular é um epitélio extremamente exposto às agressões e alterações do meio ambiente. Assim como outros agentes externos, os poluentes atmosféricos são capazes de provocar alterações sobre a superfície ocular, mesmo em concentrações ambientais ditas como “seguras” (Novaes et al., 2007). Dessa forma, sem dúvida é necessária a investigação de possíveis alterações que possam ocorrer sobre a superfície ocular e que afetam a qualidade de vida dos indivíduos expostos. Em longo prazo, essas alterações ainda podem desencadear ou agravar doenças oculares que resultariam na perda da visão.

Neste sentido, tem se buscado investigar os efeitos dos poluentes atmosféricos sobre a superfície ocular em diversas situações, no ambiente urbano (Mettier et al., 1962; Schuck et al., 1966; Partridge et al., 1966; Sapse et al., 1969; Basu & Doms, 1972; Altshuller 1977; Altshuller 1978;

Gupta et al., 2002; Saxena et al., 2003; Ansonye et al., 2004; Novaes et al., 2007) e nas atividades ocupacionais, como as relacionadas às emissões derivadas da queima da biomassa individuais (Ellegard 1997; Díaz et al., 2007; Díaz et al., 2008).

Apesar dos numerosos trabalhos clínicos e experimentais que investigam os efeitos do material particulado sobre o sistema respiratório mencionados anteriormente, ainda há poucos dados na literatura que esclareçam os efeitos fisiopatológicos sobre a superfície ocular.

Esses estudos têm-se voltado principalmente na investigação a partir de questionários e dos sintomas referidos pelos indivíduos expostos, entre eles, demonstrando uma grande presença de desconforto ocular (Ellegard 1997; Díaz et al., 2007; Díaz et al., 2008). Entretanto, o termo desconforto ocular é muito amplo e a investigação acerca dos mecanismos de atuação dos poluentes ainda é incipiente.

Dessa forma, o entendimento da ação dos poluentes sobre o epitélio ocular é de extrema importância e é uma informação essencial para o desenvolvimento de medidas de proteção e prevenção.

Até o presente momento, com exceção do estudo de Versura et al. (1999), nenhum outro grupo havia investigado mais profundamente as alterações dos poluentes atmosféricos sobre a superfície ocular.

Dessa maneira, nós buscamos investigar tanto os efeitos sazonais bem como os efeitos crônicos frente à exposição aos poluentes atmosféricos derivados das emissões das queimadas nas plantações de cana, que são

situações frequentemente observadas nos meses de abril a novembro nas regiões noroeste do Estado de São Paulo todos os anos.

Neste estudo, detectamos uma concentração de $PM_{2,5}$ em torno de 3,5 vezes maior do que o nível de $25 \mu g/m^3$ recomendado pela OMS (2007) durante a colheita da cana queimada. A média de $PM_{2,5}$ durante o período de queima nas plantações de cana foi de $90 \mu g/m^3$, porém esse nível foi ainda maior e alcançou o pico aproximado de $150 \mu g/m^3$. Esses resultados ambientais foram semelhantes aos encontrados por Ryu et al. (2004) durante a queima da palha da cevada. Esses autores encontraram níveis de $PM_{2,5}$ de $129,6 \mu g/m^3$, e em condições de estagnação atmosférica, o nível alcançou $157,8 \mu g/m^3$. Mascarenhas et al. (2008) detectaram pico de $450 \mu g/m^3$ de $PM_{2,5}$ em Rio Branco no mês de setembro, época em que ocorre frequentemente o *smog* fotoquímico nas regiões próximas aos incêndios ocorridos na Amazônia. Apesar da queima ser realizada durante o período noturno, a fumaça gerada pela combustão da palha permanece principalmente durante o período matutino, quando há ainda restos de palha de cana em processo de combustão e quando há indivíduos iniciando a colheita da cana queimada.

Níveis de $PM_{2,5}$ foram menores mas ainda estiveram elevados durante a entressafra, nas atividades de preparo do solo, seguida do corte de cana crua, provavelmente pelo revolvimento do solo, em que está presente ainda o material particulado que sofreu processos de deposição seca e úmida após o período de queimada.

Como eram esperados, os níveis encontrados nas cidades foram bem menores do que os níveis ambientais encontrados nas plantações após a queima da cana. Na cidade de Tatuí, encontramos níveis médios de $PM_{2,5}$ de $35 \mu g/m^3$, um pouco mais elevados, porém próximos dos níveis detectados anteriormente por Cançado et al. (2006) em Piracicaba ($22,8 \mu g/m^3$) durante o período de queima. Esses níveis detectados em Tatuí podem ser em parte, causados pelo transporte das partículas de poluição das plantações até o local da cidade. Apesar deste estudo não ter medidas de avaliação ambiental durante o período da entressafra na cidade, no estudo de Cançado et al.(2006) os autores demonstraram níveis médios de $PM_{2,5}$ de $10 \mu g/m^3$ na cidade, bem menores do que os detectados durante o período de queima.

Em relação à temperatura e umidade, pouco podemos inferir sobre as diferenças encontradas nas plantações e nas cidades. Como a temperatura e a precipitação interferem no nível de $PM_{2,5}$, a exposição foi baseada nos níveis de material particulado.

Concomitantemente às avaliações ambientais, detectamos alterações significativas na mucosa conjuntival de cortadores de cana envolvidos no trabalho de corte da cana queimada durante o período da queima. A alteração na mucosa ocular traduziu-se por uma diminuição significativa na densidade de muco produzido quando comparada com a densidade observada fora do período de queima. Este decréscimo na densidade de muco pode ser sugestivo de citotoxicidade. Uma hipótese é que as células

caliciformes não são capazes de multiplicar-se ou diferenciar-se devido aos elevados níveis de poluentes atmosféricos que acometem o epitélio ocular.

É possível que, em níveis elevados de poluição, as células caliciformes, antes atuantes, não sejam capazes de aumentar a produção de muco. Situações desse tipo, em que há diminuição de densidade de muco são observadas em algumas doenças da superfície ocular. No olho seco, por exemplo, níveis menos severos desta doença apresentam perda de células caliciformes, que se agrava para uma ausência total dessas células secretoras em níveis mais severos. Metaplasia das células epiteliais que formam a camada de proteção do tecido também pode ser observada em níveis severos desta doença. Neste processo, essas células perdem a principal característica que compõe o tecido epitelial, que é o mecanismo de adesão célula-célula fortemente observado em situações não-patológicas (Rivas et al., 2002; Murube & Rivas, 2003). Outras doenças e complicações oculares, como a ceratoconjuntivite primaveril (Camargo et al., 2004), uso de lentes de contato (Simon et al., 2002) também estão associadas com a perda de células caliciformes.

Apesar dos níveis de $PM_{2.5}$ nas atividades do cultivo da cana, como preparo do solo ($62,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$) e corte da cana crua ($41,9 \mu\text{g}/\text{m}^3$) durante o período de entressafra, serem ainda superiores ao recomendados pelas agências de monitoramento, a densidade de muco parece retornar aos níveis basais nos cortadores de cana avaliados neste período. Além disso, observamos um aumento de muco no filme lacrimal, acompanhado por uma

hiperemia neste período. Apesar da avaliação desses dois critérios serem baseados somente na observação do avaliador, esses dois fatores podem ser indicativos de extrusão de muco para o filme lacrimal, de modo a compensar e promover a homeostase ocular frente à agressão ocorrida anteriormente durante o período da queima. A hiperemia pode ser indicativa de um processo de irrigação e vascularização, necessário para a nutrição das células que estão em processo de grande produção protéica e síntese de macromoléculas, no caso, de uma grande quantidade de mucinas. As mucinas são os principais constituintes do muco, especificamente a mucina secretada do tipo 5AC (MUC5AC). O papel das mucinas na superfície ocular envolve a lubrificação dos olhos, por reter a água proveniente da secreção lacrimal; a remoção mecânica e limpeza de agentes externos, como partículas e microorganismos indesejáveis e o mecanismo de defesa por se aderirem aos microorganismos através de suas cadeias dissacarídicas, para posteriormente, executar a remoção dos mesmos (Watanabe 2002; Dartt 2004). Além disso, essas células são tidas como a linha de frente na defesa dos epitélios, isto é, as células caliciformes tendem a uma resposta rápida para defender o epitélio contra agressões externas (Rogers 1994; Rogers 2003; Novaes et al., 2007), produzindo mais muco e proporcionando a remoção dos agentes estranhos antes que os poluentes possam afetar as células epiteliais não-secretoras que formam a capa protetora da superfície ocular.

Entretanto, para confirmar os resultados acima descritos, estudos adicionais envolvendo técnicas quantitativas dos níveis de MUC5AC, bem como marcadores de proliferação e diferenciação das células produtoras de muco são necessários.

Ao contrário do efeito sazonal, o efeito crônico da poluição derivada da queima da cana resultou em uma elevação na densidade de muco produzido em cortadores de cana expostos, às emissões sazonais e constantes, acumulados pelos anos no trabalho da cana colhida após a queimada. Além disso, a densidade de muco foi ainda mais elevada em cortadores de cana que desempenhavam esta atividade há mais tempo. Este processo é indicativo de uma resposta adaptativa da mucosa ocular frente à exposição crônica aos poluentes atmosféricos observados em estudo anterior (Novaes et al., 2007). Provavelmente, as células caliciformes tendem a produzir mais muco conforme os anos, de modo a minimizar a perda de densidade de muco durante o período da queima.

Para reforçar a hipótese de alterações sobre a mucosa conjuntival, outro estudo foi conduzido na cidade de Buenos Aires, onde uma forte correlação foi encontrada entre o aumento dos níveis de NO₂ com o decorrer dos anos e a hiperplasia de células caliciformes nos indivíduos residentes nesta cidade. O aumento dos níveis de NO₂, um parâmetro de poluição veicular, foi devido provavelmente a um aumento na urbanização e no tráfego de veículos (Berra et al., 2008).

Corroborando com os achados clínicos, o estudo experimental do nosso grupo também detectou, em camundongos expostos por 2 e 4 meses nas câmaras com ar limpo e ar poluído da cidade de São Paulo, uma tendência a um aumento de células caliciformes na superfície ocular devido à exposição crônica (Santo et al., 2007).

Posteriormente, o estudo clínico da superfície ocular nos indivíduos dessa mesma região (Novaes et al., 2008) mostraram uma tendência à instabilidade do filme lacrimal e uma maior frequência de meibomite em níveis elevados de NO₂ (>35 µg/m³).

De forma semelhante, observamos uma forte presença de meibomite em todos os grupos, independentemente do período avaliado, o que indicaria uma exposição crônica não apenas nos trabalhadores envolvidos no corte da cana, mas também nos indivíduos da cidade residentes próximos às queimadas.

Esses dados nos levam a supor que os efeitos referentes à exposição crônica estão sendo em parte esclarecidos por estudos do nosso grupo, no entanto, os efeitos desses poluentes no surgimento e/ou desencadeamento de doenças oculares ainda não foram elucidados.

É possível que a exposição às emissões derivadas da queima da biomassa possa desencadear doenças oculares no futuro, como por

exemplo, o surgimento de catarata. O desenvolvimento da catarata é parte do processo natural de envelhecimento, porém pode ser acelerada devido a diversas razões, tais como medicamentos, exposição à radiação solar excessiva e à fumaça. Além disso, catarata é ainda responsável por cerca de 80% dos casos de cegueira na Índia.

Mohan et al. (1989), Zodpey et al. (1999) e Pokhrel et al. (2005) demonstraram associação entre a alta prevalência de catarata e o uso de biomassa em ambientes internos. Em adição, Pokhrel ainda detectou um risco de catarata de 2,38 vezes maior em ambientes sem ventilação. As mulheres e crianças são particularmente as mais vulneráveis, uma vez que elas são as mais expostas às emissões da biomassa nesses ambientes. Porém os níveis médios de $PM_{2,5}$ nos ambientes internos parecem ser maiores do que os níveis encontrados na queima da palha da cana de açúcar e incêndios florestais. Jiang & Bell (2008) detectaram níveis médios de $PM_{2,5}$ de $487,9 \mu\text{g}/\text{m}^3$ nas casas que utilizam madeira como biocombustível, quando comparados com $90,1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ nas casas urbanas que usavam gás natural. Siddiqui et al. (2009) revelaram níveis ainda maiores, de cerca de $2,74 \text{ mg}/\text{m}^3$ no uso da madeira em relação aos $0,38 \text{ mg}/\text{m}^3$ no uso de gás natural ($p < 0,001$). Em contrapartida, Park & Lee (2003) detectaram níveis médios diários de $44 \mu\text{g}/\text{m}^3$, apesar de apresentarem picos variando de 310 a $8170 \mu\text{g}/\text{m}^3$ no uso de madeira nas casas rurais.

Desse modo, o estudo dos efeitos dos poluentes derivados da queima da biomassa sobre a superfície ocular é de extrema importância. Os níveis de poluentes atmosféricos que podem causar doenças oculares e até cegueira em longo prazo ainda não estão esclarecidos. A situação parece ser agravada pelo tempo diário (em média 5 horas) e de exposição ao longo da vida (em média 36 anos) em que as mulheres e crianças despendem nesse ambiente, o tipo de combustível utilizado, além das condições de pouca ventilação existente nas casas (Engle et al., 1998; Thompson et al., 2004).

Além disso, detectamos uma forte presença de pinguécua em todos os grupos, independentemente do período avaliado. Entretanto, o pterígeo foi um pouco mais freqüente nos cortadores de cana, em ambos os períodos, do que nos indivíduos da cidade.

A pinguécua e o pterígeo são degenerações benignas na córnea e na conjuntiva, caracterizadas por remodelamento do tecido, que envolve processos de proliferação celular, semelhantes aos ocorridos em tumores oculares, assim como angiogênese e inflamação (Karahan et al., 2008). Podem ser desencadeados por exposição excessiva à radiação solar, por irritação crônica e exposição à poeira em indivíduos susceptíveis.

Nakaishi et al. 1997 observaram maior prevalência de pinguécua em policiais de motocicletas, expostos continuamente ao vento, poeira e radiação solar durante o trabalho, quando comparados aos indivíduos que trabalhavam em escritório ($P<0,01$). Ukponmwan et al. (2007) também

encontraram uma maior frequência dessas alterações em motociclistas da Nigéria comparados com o grupo com atividades ocupacionais em escritórios. É possível também que a exposição à substâncias tóxicas sejam capazes de induzir a formação de pterígio. Neste sentido, um estudo recente analisou trabalhadores de petroquímica, onde foi detectada uma maior incidência de pterígeo nos indivíduos envolvidos diretamente no trabalho técnico (Omoti et al., 2008).

Com base nos estudos acima, pode-se inferir que a presença de pinguecula, tanto nos cortadores de cana quanto nos indivíduos de Tatuí, pode estar associado a uma exposição à radiação solar nessas áreas, uma vez que a presença de pinguecula é freqüente em países tropicais, principalmente em áreas com intensa radiação solar. Entretanto, não é descartada a possibilidade de que poluentes atmosféricos derivados das queimadas seja um fator agravante para esta alteração. Quanto ao pterígio, embora não tenha havido diferenças significativas entre os cortadores em ambos os períodos e os voluntários de Tatuí, é possível que a maior presença em cortadores esteja relacionada ao fator agravante das emissões da queima e da exposição à poeira e material particulado presente durante as atividades de ressuspensão e manejo do solo para plantio.

Adicionalmente, o pterígio está associado a uma inflamação crônica do tecido, o que poderia ser indicativo de um processo inflamatório na superfície ocular, assim como bem descrito para o sistema respiratório. Além disso, os estudos demonstram que esta alteração, juntamente com a

pinguécua, pode estar associada com a incidência de catarata e tumores oculares. Pham et al. (2005a) detectaram maior risco no desenvolvimento de catarata cortical após 5 anos em indivíduos que apresentaram pinguécua em avaliação prévia. Entretanto, não encontraram esta correlação com a presença de pterígio, porém ele foi associado à maior risco no desenvolvimento de maculopatia, uma das grandes causas de cegueira (Pham et al., 2005b). No entanto, em contrapartida, Perkins (1985) não encontraram nenhuma associação entre incidência de pinguécua e catarata.

Associação entre pterígio e tumor ocular pôde ser observada no estudo de Perra et al. (2006). Esses autores reportaram a presença de lesões melanocíticas em alguns casos de pterígio. Achados de pterígio e pinguécua ainda podem mascarar tumores como carcinoma invasivo (Mirza et al., 2008), neoplasia intraepitelial da conjuntiva (Degrassi & Nucci, 1993) e melanoma (Suresh & Doctor, 2007).

Como discutido anteriormente, doenças como a catarata está correlacionada com a queima da biomassa por longos períodos de exposição. Uma hipótese é que o pterígio e a pinguécua sejam sinais evidentes de alteração do tecido fibrovascular, podendo progredir para doenças como a catarata e tumores oculares. Os poluentes poderiam promover o agravamento ou antecipação dessas doenças em indivíduos susceptíveis.

Quanto às secreções reflexa e basal, não detectamos diferenças nos cortadores de cana entre as atividades de corte da cana queimada, preparo

do solo e corte da cana crua, e nos voluntários da cidade durante o período da queima. Todos os indivíduos apresentaram secreção lacrimal acima de 10mm, valores considerados adequados para uma boa lubrificação ocular. No entanto, os estudos demonstram que esse teste clínico não é específico e sensível para a detecção de alterações na secreção das glândulas lacrimais em indivíduos saudáveis, sendo um bom teste usado para verificar alterações em indivíduos com infiltração de células T, que desencadeia a atrofia das células secretoras e, conseqüentemente, altera tanto a quantidade como a qualidade da lágrima, como observado na doença de olho seco. Dessa maneira, os poluentes parecem não afetar células secretoras presentes nas glândulas lacrimais. Contudo, em longo prazo parece haver uma diminuição da secreção lacrimal em cortadores de cana, avaliados durante o período de queima. Talvez, agravado pelas altas concentrações de poluentes tóxicos durante o período de queima, alterações mínimas na secreção lacrimal podem ser observadas pelo teste de Schirmer I.

Em relação aos sintomas oculares, pouco podemos inferir a partir dos resultados obtidos neste estudo devido à limitação do tamanho da nossa amostra. Os estudos com queima da biomassa mostraram que os sintomas mais comumente referidos envolvem queixa de lacrimejamento e irritação ocular. Ellegard (1997) detectaram maior frequência de lacrimejamento em pessoas que utilizavam combustíveis derivados da biomassa e carvão, cujos níveis de material particulado durante o cozimento foram mais elevados.

Díaz et al. (2007) também reportaram maior prevalência de lacrimejamento em mulheres que usavam o sistema de cozimento sem uso de fornos de proteção. Nesses locais, onde há níveis elevados de $MP_{2,5}$ de cerca de 600 a $1000 \mu g/m^3$ (Bruce et al., 2004), a inserção de um sistema de calefação diminuiu significativamente a frequência de lacrimejamento e irritação ocular.

Assim como Versura et al. (1999), detectamos também que todos os indivíduos declararam queixa dos sintomas analisados, embora não tenha havido diferenças entre os grupos expostos a diferentes níveis de poluição provenientes da queima. Contudo, uma limitação do nosso estudo é o número de sujeitos avaliados. Nos estudos epidemiológicos envolvendo a aplicação de questionários e a detecção dos sintomas oculares, o número de indivíduos avaliados é bem maior. Neste estudo, dada a complexidade na obtenção de permissão da usina para a avaliação ocular nos cortadores de cana, não foi possível a avaliação de um número maior de indivíduos.

Dessa forma, sugerimos a utilização de testes, como a citologia de impressão, que parece ser um excelente biomarcador na avaliação dos efeitos dos poluentes atmosféricos sobre as células epiteliais não-secretoras e caliciformes. Levando em consideração os estudos do nosso grupo, a citologia de impressão é um teste sensível para verificar alterações, mesmo em um número menor de indivíduos. Além disso, ele é simples e pouco invasivo, capaz de detectar alterações na densidade de muco em indivíduos sem alterações sub-clínicas evidentes, o que corrobora o estudo de Versura

et al. (1999). Alguns indivíduos podem apresentar alterações na superfície ocular sem referir sintomas oculares.

Neste estudo, não pudemos analisar a correlação entre os testes de citologia de impressão, TRFL e as avaliações da biomicroscopia, uma vez que não pudemos realizar o pareamento das amostras devido às perdas durante o processamento das amostras de citologias de impressão.

Em suma, com base nos resultados obtidos podemos inferir que elevados níveis de poluentes atmosféricos durante o período da queima da cana em trabalhadores expostos às emissões nas plantações são capazes de promover um efeito citotóxico sobre as células secretoras da mucosa conjuntival, seguida de instabilidade do filme lacrimal, o que pode proporcionar uma susceptibilidade maior do epitélio ocular durante este período. Todavia, o efeito crônico causado pela exposição durante os anos de trabalho acumulados nesta atividade, parece induzir uma resposta adaptativa do epitélio frente à agressão constante dos poluentes atmosféricos presentes na queimada. Paralelamente, parece haver uma piora na estabilidade do filme lacrimal ao longo dos anos, o que sugere que, apesar de aparentar uma resposta adaptativa, a superfície ocular desses indivíduos estão mais susceptíveis às agressões do meio ambiente, o que poderia desencadear no futuro, o surgimento de doenças oculares, como catarata, tumores e olho seco.

Esses resultados corroboram para reforçar a importância de futuros estudos para elucidar os mecanismos do efeito dose-resposta dos poluentes

atmosféricos e suas conseqüências sobre a superfície ocular, de modo a contribuir e reforçar os achados que demonstram a importância de uso de medidas preventivas e protetoras nos trabalhadores envolvidos no corte da cana durante o período da queima.

Esperamos também que este estudo contribua para reforçar a importância no desenvolvimento de políticas públicas para minimizar e erradicar o processo de colheita manual da cana queimada.

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que:

- níveis elevados de poluentes atmosféricos gerados durante a queima da cana são capazes de diminuir a densidade de muco produzido no epitélio ocular;
- há uma instabilidade do filme lacrimal na presença de elevados níveis de poluentes atmosféricos gerados durante a queima da cana;
- os anos de trabalho no corte da cana queimada é capaz de aumentar a densidade de muco produzido e interferir na secreção lacrimal;

ANEXOS

ANEXO A – Termo de consentimento informado.

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº SEXO : M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP: TELEFONE: DDD(.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ☐ F ☐ DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA

Estudo dos efeitos da poluição gerada pela queima da cana-de-açúcar na superfície ocular de cortadores do Estado de São Paulo.

2. PESQUISADOR: Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva.

CARGO/FUNÇÃO: Professor Titular INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 31825

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental do Depto. de Patologia.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO ☐ X RISCO MÍNIMO RISCO MÉDIO ☐
RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR ☐

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

4. DURAÇÃO DA PESQUISA:10 meses.....

ANEXO A – Termo de consentimento informado (continuação).

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE
SÃO PAULO-HCFMUSP**

1 - JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DO ESTUDO

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa para avaliar o efeito da queima da cana-de-açúcar nos olhos de indivíduos que trabalham no corte de cana-de-açúcar e indivíduos das cidades vizinhas próximas à região das queimadas. Leia cuidadosamente este termo de consentimento livre e esclarecido e faça todas as perguntas que quiser antes de decidir se quer participar do estudo. Sua decisão de consentir em participar deste estudo é voluntária e você pode sair do estudo a qualquer momento. Se decidir não participar ou retirar-se do estudo, você não perderá os benefícios a que teria direito de outra forma.

O objetivo desta pesquisa é investigar as alterações que podem ocorrer na superfície dos seus olhos por causa da poluição do ar devido à fuligem gerada pela queima da cana-de-açúcar. Queremos verificar se durante o período da queima (entre julho e novembro) há uma maior inflamação nos olhos que pode afetar a qualidade da sua visão. Isto é importante para detectar situações como olho seco e alergia nos olhos. Você responderá um questionário para verificar quais os sintomas que podem ocorrer neste período e fará alguns exames clínicos e laboratoriais. Vamos comparar os exames dos olhos com os níveis de poluição do ar encontrados nos períodos de queima e entressafra (sem queima) da cana-de-açúcar.

2- PROCEDIMENTOS QUE SERÃO UTILIZADOS E PROPÓSITOS, INCLUINDO A IDENTIFICAÇÃO DOS PROCEDIMENTOS QUE SÃO EXPERIMENTAIS

Os exames a serem realizados são testes clínicos e laboratoriais que são comuns na prática oftalmológica.

Serão:

- Questionário de Sintomas: serão feitas algumas perguntas sobre a presença de sintomas relacionados aos olhos, como ardência, vermelhidão, coceira, entre outras.
- Teste de Schirmer: para avaliar a quantidade de lágrima produzida pelo olho, serão colocadas duas fitinhas na lateral da pálpebra inferior dos olhos por 5 min.
- Biomicroscopia: é a avaliação com um microscópio especial que se chama lâmpada de fenda na parte da frente dos olhos.
- Coloração com Fluoresceína e Rosa Bengala: dois colírios com corante especial serão pingados nos dois olhos para detectar áreas com células em sofrimento e alterações na lágrima. É também realizado na lâmpada de fenda.
- Tempo de Ruptura do Filme Lacrimal. Avalia se a lágrima está se espalhando normalmente na superfície do olho ou não. Também pinga-se o mesmo colírio de fluoresceína.
- Citologia de impressão. Este exame serve para saber se existe alteração das camadas mais superficiais da membrana que recobre a parte interna das pálpebras dos olhos. Isto é feito encostando um pequeno pedacinho de papel na parte interna da pálpebra inferior dos olhos já anestesiado com colírio próprio para isso.

ANEXO A – Termo de consentimento informado (continuação).

3- DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS

Não existem riscos esperados neste estudo. Todos os exames a serem realizados já fazem parte da prática oftalmológica no Brasil. Alguns exames envolvem o toque de pequenos pedaços de papel especial nos olhos, e pode ser esperado algum desconforto, sensação de irritação ou de areia nos olhos, vermelhidão e lacrimejamento. Para minimizar esse inconveniente os procedimentos serão padronizados. Os colírios a serem utilizados podem causar um leve ardor.

4- BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS

Não há benefício direto ou compensação financeira aos participantes do estudo. Esse estudo poderá ajudar na detecção de alterações que sejam ocasionadas pela contaminação do ar ambiente devido à queima da cana-de-açúcar, e com isso indicar a necessidade de tratamento das pessoas afetadas e do desenvolvimento de políticas de saúde que ajudem a melhorar as condições do ambiente e de trabalho dos cortadores de cana e da população da região.

5- PROCEDIMENTOS ALTERNATIVOS QUE POSSAM SER VANTAJOSOS PARA O INDIVÍDUO

Não se aplica.

6- ACESSO, A QUALQUER TEMPO, ÀS INFORMAÇÕES SOBRE PROCEDIMENTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS RELACIONADOS À PESQUISA, INCLUSIVE PARA DIRIMIR EVENTUAIS DÚVIDAS.

Você poderá ter acesso a qualquer informação e esclarecer qualquer dúvida sobre seu caso e de todos os exames que estão sendo realizados, em qualquer etapa do estudo, através dos profissionais responsáveis pela pesquisa. O principal investigador é o DR. PAULO HILÁRIO NASCIMENTO SALDIVA, que pode ser encontrado no endereço Av. Dr. Arnaldo, 455 - 1º andar - Faculdade de Medicina da USP - Lab. Poluição Atmosférica Experimental - Depto. Patologia - tel 3061-7254 e as pesquisadoras executantes são: Monique Matsuda e Dra. Priscila Novaes, que podem ser encontradas no endereço Av. Dr. Arnaldo, 455 - 5º andar - Faculdade de Medicina da USP - Lab. de Investigação em Oftalmologia - - tel 3061-7688 ou cel. 9234-6185.

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: 3069-6442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX: 3069-6442 ramal 26 – E-mail: cappesq@hcnet.usp.br

7- LIBERDADE DE RETIRAR SEU CONSENTIMENTO A QUALQUER MOMENTO E DE DEIXAR DE PARTICIPAR DO ESTUDO, SEM QUE ISTO TRAGA PREJUÍZO À CONTINUIDADE DA ASSISTÊNCIA.

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Você não perderá benefícios de tratamento de saúde que de outra forma teria se decidir não participar ou se desistir de participar do estudo a qualquer momento.

ANEXO A – Termo de consentimento informado (continuação).

8- SALVAGUARDA DA CONFIDENCIALIDADE, SIGILO E PRIVACIDADE.

Qualquer informação coletada é estritamente confidencial. Seu nome nunca será revelado nos relatórios do estudo e sua identidade não será comunicada a terceiros, podendo ser fornecido apenas aos médicos envolvidos nesta pesquisa.

Os pesquisadores envolvidos neste estudo se comprometem a utilizar os dados obtidos na pesquisa somente para fins científicos, podendo ser utilizados para futuras publicações, respeitando-se a confidencialidade de cada paciente.

9- DISPONIBILIDADE DE ASSISTÊNCIA NO HCFMUSP, POR EVENTUAIS DANOS À SAÚDE, DECORRENTES DA PESQUISA.

Qualquer dano a sua saúde decorrente da pesquisa terá assistência neste Hospital sem custo algum. Considera-se um problema de saúde relacionado à pesquisa quando o mesmo tenha sido ocasionado pelos procedimentos exigidos pela pesquisa.

10- DIREITO DE SER MANTIDO ATUALIZADO SOBRE OS RESULTADOS PARCIAIS DAS PESQUISAS

Você será mantido atualizado quanto ao andamento da pesquisa e seus resultados parciais dos exames e testes que foram feitos. Você não terá acesso aos resultados dos outros voluntários que participaram do estudo, respeitando o direito de confidencialidade de cada participante.

CONSENTIMIENTO PÓS-ESCLARECIDO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo intitulado **"Estudo dos efeitos da poluição gerada pela queima da cana-de-açúcar na superfície ocular de cortadores do Estado de São Paulo."**

Eu discuti com o **Dr. PAULO HILÁRIO NASCIMENTO SALDIVA, MONIQUE MATSUDA e Dra. PRISCILA NOVAES** sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data / /

Assinatura da testemunha _____ Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

ANEXO A – Termo de consentimento informado (continuação).

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____ / ____ / ____

ANEXO B – Questionário de sintomas e exames clínicos oculares

CLÍNICA
OFTALMOLÓGICA

HOSPITAL DAS CLÍNICAS - FMUSP

**Avaliação de Superfície Ocular
Protocolo Cortadores de Cana – Incor**

Data: ____/____/20__

Nome _____ Número _____

O senhor sente (responda sim ou não):

Em caso afirmativo: A) Desde quando? B) Quantas vezes por dia? C) Essa sensação é leve, mais ou menos ou forte?

	A	B	C
() 1. Sensação de areia/ cisco nos olhos?	_____	_____	_____
() 2. Olhos irritados	_____	_____	_____
() 3. Olhos secos	_____	_____	_____
() 4. Peso e cansaço nos olhos	_____	_____	_____
() 5. Ardor	_____	_____	_____
() 6. Sensibilidade à luz	_____	_____	_____
() 7. Lacrimejamento	_____	_____	_____
() 8. Olhos vermelhos	_____	_____	_____
() 9. Coceira nos olhos	_____	_____	_____

ANTECEDENTES OFTALMOLÓGICOS

Tem algum problema nos olhos?

() Sim () Não () não sabe Se sim, qual? _____

Já fez alguma cirurgia nos olhos? () Sim () Não

Se sim, qual? _____ Há quanto tempo? _____

Usa alguma medicação no olho? () Sim () Não

Se sim, qual? _____

ANEXO B – Termo de consentimento informado (continuação).

EXAME OFTALMOLÓGICO

AV (com correção) OD: _____ OE: _____

BIOMICROSCOPIA:

Pálpebras

OD OE

☐	☐	Sem alterações
☐	☐	Meibomite (1 2 3 4)
☐	☐	Blefarite (1 2 3 4)
☐	☐	Triquíase
☐	☐	Tumor
☐	☐	Irregularidade (desenhar)

Córnea

OD OE

☐	☐	Sem alterações
☐	☐	Opacidade
☐	☐	Desepitelização
☐	☐	Afilamento
☐	☐	Úlcera
☐	☐	Infiltrados
☐	☐	Depósitos
☐	☐	Outros _____

Conjuntiva

OD OE

☐	☐	Sem alterações
☐	☐	Hiperemia (1 2 3 4)
☐	☐	Pinguécula
☐	☐	Pterígeo OD G(I II III IV)
☐	☐	Pterígeo OE G(I II III IV)
☐	☐	Papilas (1 2 3 4)
☐	☐	Folículos (1 2 3 4)
☐	☐	Outros _____

Filme Lacrimal

OD OE

☐	☐	Normal
☐	☐	Oleosidade
☐	☐	Muco
☐	☐	Outros _____

OBS: _____

Corantes:

A Rosa Bengala

Score OD: _____ OE: _____

Pontuação com Rosa Bengala
Pontuação máxima total = 9

Pontuação com Rosa Bengala
Pontuação máxima total = 9

B Fluoresceína

Score OD: _____ OE: _____

Pontuação com Fluoresceína
Pontuação máxima total = 9

Pontuação com Fluoresceína
Pontuação máxima total = 9

Teste de Schirmer (sem anest. Olho fechado)

OD _____mm OE _____mm

BUT (TRFL)

OD: _____seg OE: _____seg

ANEXO C – Imagem digitalizada do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq).

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 19/11/2008, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0856/08**, intitulado: **"ESTUDO DOS EFEITOS DA POLUIÇÃO GERADA PELA QUEIMA DA CANA-DE-AÇÚCAR NA SUPERFÍCIE OCULAR DE CORTADORES DO ESTADO DE SÃO PAULO"** apresentado pelo Departamento de **PATOLOGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Paulo Hilário Nascimento Saldiva**

Pesquisador (a) Executante: **Monique Matsuda**

CAPPesq, 19 de Novembro de 2008

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

Julio Cesar

ANEXO D – Imagem digitalizada do parecer do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq) do projeto principal.

SDC 3261/09/012

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 15/04/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0282/09**, intitulado: "**AVALIAÇÃO DOS IMPACTOS DA EXPANSÃO SUCROALCOOLEIRA NA SAÚDE DOS TRABALHADORES E DA POPULAÇÃO AFETADA.**" apresentado pela **COMISSÃO CIENTÍFICA DO INCOR**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Ubiratan de Paula Santos**

CAPPesq, 16 de Abril de 2009

Prof. Dr. Eduardo Massad
Presidente da Comissão de
Ética para Análise de Projetos
de Pesquisa

COMISSÃO CIENTÍFICA
RECEBIDO
11/04/09
Eduine

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br

REFERÊNCIAS

1. Adams GG, Dilly PN, Kirkness CM. Monitoring ocular disease by impression cytology. *Eye* 1988;2 (Pt 5):506-16.
2. Aditama TY. Impact of haze from forest fire to respiratory health: Indonesian experience. *Respirology* 2000;5(2):169-74.
3. Alessi NP, Navarro VL. [Health and work in rural areas: sugar cane plantation workers in Ribeirao Preto, Sao Paulo, Brazil]. *Cad Saude Publica* 1997;13 Suppl 2:111-121.
4. Allen AG, Cardoso AA, Rocha GO. Influence of sugar cane burning on aerosol soluble ion composition in Southeastern Brazil. *Atmospheric Environment* 2004;38:5025-38.
5. Altshuller AP. Assessment of the contribution of chemical species to the eye irritation potential of photochemical smog. *J Air Pollut Control Assoc* 1978;28(6):594-8.
6. Altshuller AP. Eye irritation as an effect of photochemical air pollution. *J Air Pollut Control Assoc.* 1977;27(11):1125-6.
7. Amre DK, Infante-Rivard C, Dufresne A, Durgawale PM, Ernst P. Case-control study of lung cancer among sugar cane farmers in India. *Occup Environ Med* 1999;56(8):548-52 .
8. Arbex MA, Bohm GM, Saldiva PH, Conceicao GM, Pope AC, 3rd, Braga AL. Assessment of the effects of sugar cane plantation burning on daily counts of inhalation therapy. *J Air Waste Manag Assoc* 2000;50(10):1745-9.
9. Arbex MA, Cancado JE, Pereira LA, Braga AL, Saldiva PH. Queima da biomassa e efeitos sobre a saúde. *J Bras Pneumol* 2004;30(2):158-175.
10. Arbex MA, de Souza Conceicao GM, Cendon SP, Arbex FF, Lopes AC, Moyses EP, et al. Urban air pollution and chronic obstructive pulmonary disease-related emergency department visits. *J Epidemiol Community Health* 2009;63(10):777-83.
11. Arbex MA, Martins LC, de Oliveira RC, Pereira LA, Arbex FF, Cancado JE, et al. Air pollution from biomass burning and asthma hospital admissions in a sugar cane plantation area in Brazil. *J Epidemiol Community Health* 2007;61(5):395-400.
12. Asonye CC, Bello ER. The blight of pollution keratoconjunctivitis among children in oil-producing industrial areas of Delta State, Nigeria. *Ecotoxicol Environ Saf* 2004;59(2):244-8.
13. Baccarelli A, Martinelli I, Pegoraro V, Melly S, Grillo P, Zanobetti A, et al. Living near major traffic roads and risk of deep vein thrombosis. *Circulation* 2009;119(24):3118-24.
14. Bakonyi SM, Danni-Oliveira IM, Martins LC, Braga AL. [Air pollution and respiratory diseases among children in the city of Curitiba, Brazil]. *Rev Saude Publica* 2004;38(5):695-700.

15. Baldasano JM, Valera E, Jiménez P. Air quality data from large cities. *Sci Total Environ* 2003;307(1-3):141-65.
16. Basu PK. Air pollution and the eye. *Surv Ophthalmol* 1972;17(2):78-93.
17. Bernard SM, Samet JM, Grambsch A, Ebi KL, Romieu I. The potential impacts of climate variability and change on air pollution-related health effects in the United States. *Environ Health Perspect* 2001;109 Suppl 2:199-209.
18. Berra I, Dawidowski L, Novaes P, D' Angiola A, Kara-Jose N, Saldiva PH, Berra A. Correlation Between the Levels of Air Pollution With the Hyperplasia of Goblet Cells in Human Conjunctiva During the Last 7 Years in the Metropolitan Area of Buenos Aires, Argentina. In: ARVO 2008 Annual Meeting; 2008; Fort Lauderdale, Flórida; 2008.
19. Betchley C, Koenig JQ, van Belle G, Checkoway H, Reinhardt T. Pulmonary function and respiratory symptoms in forest firefighters. *Am J Ind Med* 1997;31(5):503-9.
20. BJ Finlayson-Pitts, JN Pitts Jr . Tropospheric Air Pollution: Ozone, Airborne Toxics, Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, and Particles. *Science* 1997;276(5315):1045-51.
21. Botter, D., B. Jørgensen, and A. Peres, A longitudinal study of mortality and air pollution for São Paulo, Brazil. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2002;12(5):335-43.
22. Bourcier T, Viboud C, Cohen JC, Thomas F, Bury T, Cadiot L, Mestre O, Flahault A, Borderie V, Laroche L. Effects of air pollution and climatic conditions on the frequency of ophthalmological emergency examinations. *Br J Ophthalmol* 2003;87(7):809-11.
23. Braga AL, Saldiva PH, Pereira LA, Menezes JJ, Conceicao GM, Lin CA, et al. Health effects of air pollution exposure on children and adolescents in Sao Paulo, Brazil. *Pediatr Pulmonol* 2001;31(2):106-13.
24. Brasil. Portaria Ministerial n.231 de 27 de abril de 1976. Estabelece padrões de qualidade do ar. *Diário Oficial da União*, Brasília (DF). 1976.
25. Brasil. Resolução CONAMA n.003 de 28 de junho de 1990. Estabelece padrões de qualidade do ar, previstas no PRONAR - Programa Nacional de Controle da Qualidade do Ar. *Diário Oficial da União*, Brasília (DF). 1990 22 ago; Seção 1:15937.
26. Brasil. Resolução n.44 de 16 de junho de 2009. Dispõe sobre os procedimentos relativos à suspensão da queima da palha de cana-deaçúcar ditados pela Lei Estadual nº 11.241-2003 e Decreto Estadual nº 47.700-2003. *Diário Oficial da União*, Brasília (DF). 2009 17 jun; Seção 1:39.
27. Bruce N, McCracken J, Albalak R, Schei MA, Smith KR, Lopez V, West C. Impact of improved stoves, house construction and child location on levels of indoor air pollution exposure in young Guatemalan children. *J Expo Anal Environ Epidemiol* 2004;14 Suppl 1:S26-33.

28. Bruce N, Perez-Padilla R, Albalak R. Indoor air pollution in developing countries: a major environmental and public health challenge. *Bull World Health Organ* 2000;78(9):1078-92.
29. Calonge M, Diebold Y, Sáez V, Enríquez de Salamanca A, García-Vázquez C, Corrales RM, Herreras JM. Impression cytology of the ocular surface: a review. *Exp Eye Res* 2004;78(3):457-72.
30. Camargo GB, Nishiwaki-Dantas MC, Barros JN, Lake JC. Citologia de impressão na ceratoconjuntivite primaveril. *Arq Bras Oftalmol* 2004;67(6):877-81.
31. Camargo Pires-Neto R, Júlia Lichtenfels A, Regina Soares S, Macchione M, Hilário Nascimento Saldiva P, Dolhnikoff M. Effects of São Paulo air pollution on the upper airways of mice. *Environ Res* 2006;101(3):356-61.
32. Cancado JE, Saldiva PH, Pereira LA, Lara LB, Artaxo P, Martinelli LA, et al. The impact of sugar cane-burning emissions on the respiratory system of children and the elderly. *Environ Health Perspect* 2006;114(5):725-9.
33. Cendon S, Pereira LA, Braga AL, Conceicao GM, Cury Junior A, Romaldini H, et al. Air pollution effects on myocardial infarction. *Rev Saude Publica* 2006;40(3):414-9.
34. Chen B, Kan H. Air pollution and population health: a global challenge. *Environ Health Prev Med* 2008;13(2):94-101.
35. Chen LC, Lippmann M. Effects of metals within ambient air particulate matter (PM) on human health. *Inhal Toxicol* 2009;21(1):1-31.
36. Ciencewicki J, Trivedi S, Kleeberger SR. Oxidants and the pathogenesis of lung diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2008;122(3):456-68.
37. Clifford P. Carcinogens in the nose and throat. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 1972;65:682-686.
38. Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Relatório de Qualidade do Ar no Estado de São Paulo 2008. São Paulo: CETESB; 2009.
39. Conceicao GM, Miraglia SG, Kishi HS, Saldiva PH, Singer JM. Air pollution and child mortality: a time-series study in Sao Paulo, Brazil. *Environ Health Perspect* 2001;109 Suppl 3:347-50.
40. CYM dos Santos, DA Azevedo, FR de Aquino. Selected organic compounds from biomass burning found in atmospheric particulate matter over sugarcane. *Atmospheric Environment* 2002;36:3009-19.
41. Dartt DA. Control of mucin production by ocular surface epithelial cells. *Exp Eye Res* 2004;78(2):173-85.
42. de Medeiros AP, Gouveia N, Machado RP, de Souza MR, Alencar GP, Novaes HM, et al. Traffic-related air pollution and perinatal mortality: a case-control study. *Environ Health Perspect* 2009;117(1):127-32.
43. de Paula Santos U, Braga AL, Giorgi DM, Pereira LA, Grupi CJ, Lin CA, et al. Effects of air pollution on blood pressure and heart rate variability: a

- panel study of vehicular traffic controllers in the city of Sao Paulo, Brazil. *Eur Heart J* 2005;26(2):193-200.
44. Degrassi M, Piantanida A, Nucci P. Unexpected histological findings in pterygium. *Optom Vis Sci* 1993;70(12):1058-60.
45. Devalia JL, Rusznak C, Herdman MJ, Trigg CJ, Tarraf H, Davies RJ. Effect of nitrogen dioxide and sulphur dioxide on airway response of mild asthmatic patients to allergen inhalation. *Lancet* 1994;344(8938):1668-71.
46. Diaz E, Bruce N, Pope D, Diaz A, Smith KR, Smith-Sivertsen T. Self-rated health among Mayan women participating in a randomised intervention trial reducing indoor air pollution in Guatemala. *BMC Int Health Hum Rights* 2008;8:7.
47. Diaz E, Smith-Sivertsen T, Pope D, Lie RT, Diaz A, McCracken J, et al. Eye discomfort, headache and back pain among Mayan Guatemalan women taking part in a randomised stove intervention trial. *J Epidemiol Community Health* 2007;61(1):74-9.
48. Duclos P, Sanderson LM, Lipsett M. The 1987 forest fire disaster in California: assessment of emergency room visits. *Arch Environ Health* 1990;45(1):53-8 .
49. Ellegard A. Tears while cooking: an indicator of indoor air pollution and related health effects in developing countries. *Environ Res* 1997;75(1):12-22.
50. Emmanuel SC. Impact to lung health of haze from forest fires: the Singapore experience. *Respirology* 2000;5(2):175-82.
51. Farhat SC, Paulo RL, Shimoda TM, Conceicao GM, Lin CA, Braga AL, et al. Effect of air pollution on pediatric respiratory emergency room visits and hospital admissions. *Braz J Med Biol Res* 2005;38(2):227-35.
52. Freitas C, Bremner SA, Gouveia N, Pereira LA, Saldiva PH. [Hospital admissions and mortality: association with air pollution in Sao Paulo, Brazil, 1993 to 1997]. *Rev Saude Publica* 2004;38(6):751-7.
53. Freitas SR, Longo KM, Silva Dias MAF, Silva Dias PL. Emissões de queimadas em ecossistemas da América do Sul. *Estudos Avançados* 2005;19(53):167-85.
54. Garrett MH, Hooper MA, Hooper BM, Abramson MJ. Respiratory symptoms in children and indoor exposure to nitrogen dioxide and gas stoves. *Am J Respir Crit Care Med* 1998;158(3):891-5.
55. Gauderman WJ, McConnell R, Gilliland F, London S, Thomas D, Avol E, Vora H, Berhane K, Rappaport EB, Lurmann F, Margolis HG, Peters J. Association between air pollution and lung function growth in southern California children. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162(4 Pt 1):1383-90.
56. Gouveia N, Bremner SA, Novaes HM. Association between ambient air pollution and birth weight in Sao Paulo, Brazil. *J Epidemiol Community Health* 2004;58(1):11-7.
57. Gouveia N, de Freitas CU, Martins LC, Marcilio IO. [Respiratory and cardiovascular hospitalizations associated with air pollution in the city of Sao Paulo, Brazil]. *Cad Saude Publica* 2006;22(12):2669-77.

58. Gouveia, N. and T. Fletcher, Time series analysis of air pollution and mortality: effects by cause, age and socioeconomic status. *J Epidemiol Community Health* 2000;54(10):750-5.
59. Gu J, Chen L, Shatos MA, Rios JD, Gulati A, Hodges RR, Dartt DA. Presence of EGF growth factor ligands and their effects on cultured rat conjunctival goblet cell proliferation. *Exp Eye Res* 2008; 86(2):322-34.
60. Guimaraes ET, Domingos M, Alves ES, Caldini N, Lobo DJ, Lichtenfels AJ, et al. Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of Sao Paulo (Brazil) with the Tradescantia-micronucleus (Trad-MCN) assay. *Environ Exp Bot* 2000;44(1):1-8.
61. Guimaraes ET, Macchione M, Lobo DJ, Domingos M, Saldiva PH. Evaluation of the mutagenic potential of urban air pollution in Sao Paulo, Southeastern Brazil, using the Tradescantia stamen-hair assay. *Environ Toxicol* 2004;19(6):578-84.
62. Gupta SK, Gupta V, Joshi S, Tandon R. Subclinically dry eyes in urban Delhi: an impact of air pollution? *Ophthalmologica* 2002;216(5):368-71.
63. Haller-Schober EM, Schwantzer G, Berghold A, Fischl M, Theisl A, Horwath-Winter J. Evaluating an impression cytology grading system (IC score) in patients with dry eye syndrome. *Eye* 2006;20(8):927-33.
64. Helfand WH, Lazarus J, Theerman P. Donora, Pennsylvania: an environmental disaster of the 20th century. *Am J Public Health* 2001;91(4):553.
65. Hewson CA, Edbrooke MR, Johnston SL. PMA induces the MUC5AC respiratory mucin in human bronchial epithelial cells, via PKC, EGF/TGF- α , Ras/Raf, MEK, ERK and Sp1-dependent mechanisms. *J Mol Biol* 2004; 344(3):683-95.
66. Höppe P, Peters A, Rabe G, Praml G, Lindner J, Jakobi G, Fruhmenn G, Nowak D. Environmental ozone effects in different population subgroups. *Int J Hyg Environ Health* 2003;206(6):505-16.
67. Horikawa Y, Shatos MA, Hodges RR, Zoukhri D, Rios JD, Chang EL, Bernardino CR, Rubin PA, Dartt DA. Activation of mitogen-activated protein kinase by cholinergic agonists and EGF in human compared with rat cultured conjunctival goblet cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44(6):2535-44.
68. Ito K, Thurston GD, Silverman RA. Characterization of PM_{2.5}, gaseous pollutants, and meteorological interactions in the context of time-series health effects models. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2007;17 Suppl 2:S45-60.
69. Jiang R, Bell ML. A comparison of particulate matter from biomass-burning rural and non-biomass-burning urban households in northeastern China. *Environ Health Perspect* 2008;116(7):907-14.
70. Kanno H, Horikawa Y, Hodges RR, Zoukhri D, Shatos MA, Rios JD, Dartt DA. Cholinergic agonists transactivate EGFR and stimulate MAPK to induce goblet cell secretion. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284(4):C988-98.

71. Karahan N, Baspinar S, Ciris M, Baydar CL, Kapucuoglu N. Cyclooxygenase-2 expression in primary and recurrent pterygium. *Indian J Ophthalmol* 2008;56(4):279-83.
72. Katsouyanni, K : Touloumi, G : Spix, C : Schwartz, J : Balducci, F : Medina, S : Rossi, G : Wojtyniak, B : Sunyer, J : Bacharova, L : Schouten, J P : Ponka, A : Anderson, H R. Short term effects of ambient sulphur dioxide and particulate matter on mortality in 12 European cities: results from time series data from the APHEA Project. *BMJ* 1997;314(7095): 1658-63.
73. Kjaergaard S. Assessment of eye irritation in humans. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 641:187-98.
74. Künzli N, Avol E, Wu J, Gauderman WJ, Rappaport E, Millstein J, Bennion J, McConnell R, Gilliland FD, Berhane K, Lurmann F, Winer A, Peters JM. Health effects of the 2003 Southern California wildfires on children. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174(11):1221-8.
75. Kunii O, Kanagawa S, Yajima I, Hisamatsu Y, Yamamura S, Amagai T, Ismail IT. The 1997 haze disaster in Indonesia: its air quality and health effects. *Arch Environ Health* 2002;57(1):16-22.
76. Kunzli N, Avol E, Wu J, Gauderman WJ, Rappaport E, Millstein J, et al. Health effects of the 2003 Southern California wildfires on children. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174(11):1221-8.
77. Lambiase A, Micera A, Pellegrini G, Merlo D, Rama P, De Luca M, Bonini S, Bonini S. In vitro evidence of nerve growth factor effects on human conjunctival epithelial cell differentiation and mucin gene expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50(10):4622-30.
78. Lee LY, Widdicombe JG. Modulation of airway sensitivity to inhaled irritants: role of inflammatory mediators. *Environ Health Perspect* 2001;109 Suppl 4:585-9.
79. Lemieux PM, Lutes CC, Santoianni DA. Emissions of organic air toxics from open burning: a comprehensive review. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2004;30:1-32.
80. Li N, Xia T, Nel AE. The role of oxidative stress in ambient particulate matter-induced lung diseases and its implications in the toxicity of engineered nanoparticles. *Free Radic Biol Med* 2008;44(9):1689-99.
81. Lin CA, Amador Pereira LA, de Souza Conceicao GM, Kishi HS, Milani R, Jr., Ferreira Braga AL, et al. Association between air pollution and ischemic cardiovascular emergency room visits. *Environ Res* 2003;92(1):57-63.
82. Lin CA, Martins MA, Farhat SC, Pope CA, 3rd, Conceicao GM, Anastacio VM, et al. Air pollution and respiratory illness of children in Sao Paulo, Brazil. *Paediatr Perinat Epidemiol* 1999;13(4):475-88.
83. Lin CA, Pereira LA, Nishioka DC, Conceicao GM, Braga AL, Saldiva PH. Air pollution and neonatal deaths in Sao Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2004;37(5):765-70.

84. Lopes FS, Ribeiro H. Mapeamento de internações hospitalares por problemas respiratórios e possíveis associações à exposição humana aos produtos da queima da palha de cana-de-açúcar no estado de São Paulo. *Rev Bras Epidemiol* 2006;9(2):215-25.
85. López-García JS, Rivas L, García-Lozano I. Corneal epithelium squamous metaplasia determination as diagnostic factor in limbal deficiency. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2006;81(5):281-8.
86. Machado CM, Cardoso AA, Allen AG. Atmospheric emission of reactive nitrogen during biofuel ethanol production. *Environ Sci Technol* 2008;42(2):381-5.
87. Magalhaes D, Bruns RE, Vasconcellos PC. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos como traçadores da queima de cana-de-açúcar: uma abordagem estatística. *Quím. Nova* 2007;30(3):577-81.
88. Martins LC, Latorre Mdo R, Cardoso MR, Goncalves FL, Saldiva PH, Braga AL. [Air pollution and emergency room visits due to pneumonia and influenza in Sao Paulo, Brazil]. *Rev Saude Publica* 2002;36(1):88-94.
89. 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 Sao Paulo, Brazil. *J Occup Environ Med* 2002;44(7):622-7.
90. Mascarenhas MD, Vieira LC, Lanzieri TM, Leal AP, Duarte AF, Hatch DL. [Anthropogenic air pollution and respiratory disease-related emergency room visits in Rio Branco, Brazil--September, 2005]. *J Bras Pneumol* 2008;34(1):42-6.
91. Mazzoli-Rocha F, Magalhaes 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.
92. Medeiros A, Gouveia N. [Relationship between low birthweight and air pollution in the city of Sao Paulo, Brazil]. *Rev Saude Publica* 2005;39(6):965-72.
93. Mettier SR Jr, Boyer HK, McEwen WK, Ivanhoe F, Meyers FH, Hine CH. Effects of air pollutant mixtures on the eye. *Arch Environ Health* 1962;4:103-7.
94. Mirza E, Gumus K, Evereklioglu C, Arda H, Oner A, Canoz O, Karakucuk S. Invasive squamous cell carcinoma of the conjunctiva first misdiagnosed as a pterygium: a clinicopathologic case report. *Eye Contact Lens* 2008;34(3):188-90.
95. Mishra VK, Retherford RD, Smith KR. Cooking with Biomass Fuels Increases the Risk of Blindness. *National Family Health Survey Bulletin* 1999(14):1-4.
96. Mohan M, Sperduto RD, Angra SK, Milton RC, Mathur RL, Underwood BA, et al. India-US case-control study of age-related cataracts. India-US Case-Control Study Group. *Arch Ophthalmol* 1989;107(5):670-6.

97. Molina, M.J. and L.T. Molina, Megacities and atmospheric pollution. *Journal of the Air & Waste Management Association*, 2004. 54(6):644-80.
98. Morgenstern V, Zutavern A, Cyrys J, Brockow I, Koletzko S, Kramer U, et al. Atopic diseases, allergic sensitization, and exposure to traffic-related air pollution in children. *Am J Respir Crit Care Med* 2008;177(12):1331-7.
99. Mott JA, Meyer P, Mannino D, Redd SC, Smith EM, Gotway-Crawford C, et al. Wildland forest fire smoke: health effects and intervention evaluation, Hoopa, California, 1999. *West J Med* 2002;176(3):157-62.
100. Moura M, Junger WL, Mendonca GA, De Leon AP. [Air quality and acute respiratory disorders in children]. *Rev Saude Publica* 2008;42(3):503-11.
101. Murube J, Rivas L. Impression cytology on conjunctiva and cornea in dry eye patients establishes a correlation between squamous metaplasia and dry eye clinical severity. *Eur J Ophthalmol* 2003;13(2):115-27.
102. Nadel JA, Burgel PR. The role of epidermal growth factor in mucus production. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1(3):254-8.
103. Nakaishi H, Yamamoto M, Ishida M, Someya I, Yamada Y. Pingueculae and pterygia in motorcycle policemen. *Ind Health* 1997;35(3):325-9.
104. Nascimento LF, Pereira LA, Braga AL, Modolo MC, Carvalho JA, Jr. [Effects of air pollution on children's health in a city in Southeastern Brazil]. *Rev Saude Publica* 2006;40(1):77-82.
105. Nelson JD. Impression cytology. *Cornea* 1988;7(1):71-81.
106. Nemery B, Hoet PH, Nemmar A. The Meuse Valley fog of 1930: an air pollution disaster. *Lancet* 2001;357(9257):704-8.
107. Nolan GR, Hirst LW. Impression cytology in the diagnosis of ocular surface squamous neoplasia. *Br J Ophthalmol* 2001;85(7):888.
108. Novaes P, do Nascimento Saldiva PH, Kara-Jose N, Macchione M, Matsuda M, Racca L, et al. Ambient levels of air pollution induce goblet-cell hyperplasia in human conjunctival epithelium. *Environ Health Perspect* 2007;115(12):1753-6.
109. Novaes P, Kara-José N, Macchione M, Matsuda M, Pereira LAA, Lichtenfels AJ, et al. Chronic Urban Conjunctivitis by Air Pollution: Individual Measures of Air Pollution, Measures of Ocular Discomfort and Clinical Tests. In: ARVO 2008 Annual Meeting; 2008; Fort Lauderdale, Flórida; 2008.
110. Omoti AE, Waziri-Erameh JM, Enock ME. Ocular disorders in a petroleum industry in Nigeria. *Eye* 2008;22(7):925-9.
111. Oppenheimer C, Tsanev IV, Allen AG, McGonigle AJS, Cardoso AA, Wiatr A, Paterlini W, Dias CM. NO₂ Emissions from Agricultural Burning in São Paulo, Brazil. *Environ. Sci. Technol* 2004;38(17):4557-61.
112. Organização Mundial de Saúde (OMS). Trabalhando juntos pela saúde. Brasília:Ministério da Saúde; 2007.
113. Park E, Lee K. Particulate exposure and size distribution from wood burning stoves in Costa Rica. *Indoor Air* 2003;13(3):253-9.

114. Partridge RA, Stebbings JH Jr, Elsea WR, Winkelstein W Jr. Outbreak of acute eye irritation associated with air pollution. *Public Health Rep* 1966; 81(2):153-8.
115. Paschides CA, Stefaniotou M, Papageorgiou J, Skourtis P, Psilas K. Ocular surface and environmental changes. *Acta Ophthalmol Scand* 1998;76(1):74-7.
116. Peden DB. Pollutants and asthma: role of air toxics. *Environ Health Perspect* 2002;110 Suppl 4:565-8.
117. Peden, DB. Pollutants and Asthma: Role of Air Toxics. *Environ Health Perspect* 2002;110 Suppl 4:565-8.
118. Pereira Filho MA, Pereira LA, Arbex FF, Arbex M, Conceicao GM, Santos UP, et al. Effect of air pollution on diabetes and cardiovascular diseases in Sao Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res* 2008;41(6):526-32.
119. Perkins ES. The association between pinguecula, sunlight and cataract. *Ophthalmic Res* 1985;17(6):325-30.
120. Perra MT, Colombari R, Maxia C, Zucca I, Piras F, Corbu A, Bravo S, Scarpa A, Sirigu P. Finding of conjunctival melanocytic pigmented lesions within pterygium. *Histopathology* 2006;48(4):387-93.
121. Pham TQ, Wang JJ, Rochtchina E, Mitchell P. Pterygium, pinguecula, and 5-year incidence of cataract. *Am J Ophthalmol* 2005;139(6):1126-8.
122. Pham TQ, Wang JJ, Rochtchina E, Mitchell P. Pterygium/pinguecula and the five-year incidence of age-related maculopathy. *Am J Ophthalmol* 2005;139(3):536-7.
123. Pokhrel AK, Smith KR, Khalakdina A, Deuja A, Bates MN. Case-control study of indoor cooking smoke exposure and cataract in Nepal and India. *Int J Epidemiol* 2005;34(3):702-8.
124. Polichetti G, Cocco S, Spinali A, Trimarco V, Nunziata A. Effects of particulate matter (PM(10), PM(2.5) and PM(1)) on the cardiovascular system. *Toxicology* 2009;261(1-2):1-8.
125. Regalado J, Perez-Padilla R, Sansores R, Paramo Ramirez JI, Brauer M, Pare P, et al. The effect of biomass burning on respiratory symptoms and lung function in rural Mexican women. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;174(8):901-5.
126. Reiss R, Anderson EL, Cross CE, Hidy G, Hoel D, McClellan R, et al. Evidence of health impacts of sulfate-and nitrate-containing particles in ambient air. *Inhal Toxicol* 2007;19(5):419-49.
127. Ribeiro H, Assunção JV. Efeitos das queimadas na saúde humana. *Estudos Avançados* 2002;16(44):125-48.
128. Ribeiro H. [Sugar cane burning in Brazil: respiratory health effects]. *Rev Saude Publica* 2008;42(2):370-6.
129. Rivas L, Murube J, Shalaby O, Oroza MA, Sanz AI. [Impression cytology contribution to differential diagnosis of Sjögren syndrome in the ophthalmological clinic]. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2002;77(2):63-72.

130. Rogers DF. Airway goblet cells: responsive and adaptable front-line defenders. *Eur Respir J* 1994;7(9):1690-706.
131. Rogers DF. The airway goblet cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35(1):1-6.
132. Romieu I, Riojas-Rodriguez H, Marron-Mares AT, Schilman A, Perez-Padilla R, Masera O. Improved biomass stove intervention in rural Mexico: impact on the respiratory health of women. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180(7):649-56.
133. Rothschild H, Mulvey JJ. An increased risk for lung cancer mortality associated with sugarcane farming. *J Natl Cancer Inst* 1982;68(5):755-60.
134. Ryu SY, Kim JE, Zhuanshi H, Kim YJ, Kang GU. Chemical composition of post-harvest biomass burning aerosols in Gwangju, Korea. *J Air Waste Manag Assoc* 2004;54(9):1124-37.
135. Saha A, Kulkarni PK, Shah A, Patel M, Saiyed HN. Ocular morbidity and fuel use: an experience from India. *Occup Environ Med* 2005;62(1):66-9.
136. Saldiva PH, King M, Delmonte VL, Macchione M, Parada MA, Daliberto ML, Sakae RS, Criado PM, Silveira PL, Zin WA, et al. Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats. *Environ Res* 1992;57(1):19-33.
137. Saldiva PH, Lichtenfels AJ, Paiva PS, Barone IA, Martins MA, Massad E, et al. Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in Sao Paulo, Brazil: a preliminary report. *Environ Res* 1994;65(2):218-25.
138. Saldiva PH, Pope CA, 3rd, Schwartz J, Dockery DW, Lichtenfels AJ, Salge JM, et al. Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in Sao Paulo, Brazil. *Arch Environ Health* 1995;50(2):159-63.
139. Saldiva, P., et al., Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in Sao Paulo, Brazil. *Arch Environ Health* 1995;50(2):159-63.
140. Saldiva, P., et al., Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in São Paulo, Brazil: a preliminary report. *Environ Res* 1994;65(2):218-25.
141. Sánchez-Carrillo CI, Cerón-Mireles P, Rojas-Martínez MR, Mendoza-Alvarado L, Olaiz-Fernández G, Borja-Aburto VH. Surveillance of acute health effects of air pollution in Mexico City. *Epidemiology* 2003;14(5):536-44.
142. SANTO, R. M. ; KARA-JOSE, N. ; NOVAES, P. ; MATSUDA, M ; SALDIVA, PHN ; BERRA, A. . Effects of São Paulo Air Pollution on the Mice Conjunctiva.. In: Annual Meeting ARVO, 2007, Fort Lauderdale. In: ARVO 2007 Annual Meeting; 2007; Fort Lauderdale, Flórida; 2007.
143. Sapse AT, Bonavida B, Kadin M, Stone W Jr, Sercarz EE. Smog eye irritation: effect of air pollution on the tear protein pattern. *Ophthalmologica* 1969;58 Suppl:421-7.
144. Savoia EJ, Domingos M, Guimaraes ET, Brumati F, Saldiva PH. Biomonitoring genotoxic risks under the urban weather conditions and

- polluted atmosphere in Santo Andre, SP, Brazil, through Trad-MCN bioassay. *Ecotoxicol Environ Saf* 2009;72(1):255-60.
145. Saxena R, Srivastava S, Trivedi D, Anand E, Joshi S, Gupta SK. Impact of environmental pollution on the eye. *Acta Ophthalmol Scand* 2003;81(5):491-4.
 146. Schlesinger RB. The health impact of common inorganic components of fine particulate matter (PM_{2.5}) in ambient air: a critical review. *Inhal Toxicol* 2007;19(10):811-32.
 147. Schuck EA, Stephens ER, Middleton JT. Eye irritation response at low concentrations of irritants. *Arch Environ Health* 1966;13(5):570-5.
 148. Schwarze PE, Ovrevik J, Lag M, Refsnes M, Nafstad P, Hetland RB, et al. Particulate matter properties and health effects: consistency of epidemiological and toxicological studies. *Hum Exp Toxicol* 2006;25(10):559-79.
 149. Semple JL, Moore GW, Tong DQ, Yu S, Kan H, Jerrett M, Ito K, Burnett RT. Ozone Exposure and Mortality. *N Engl J Med* 2009;360:2786-2789.
 150. Siddiqui AR, Lee K, Bennett D, Yang X, Brown KH, Bhutta ZA, Gold EB. Indoor carbon monoxide and PM_{2.5} concentrations by cooking fuels in Pakistan. *Indoor Air* 2009;19(1):75-82.
 151. Sillanpaa M, Saarikoski S, Hillamo R, Pennanen A, Makkonen U, Spolnik Z, et al. Chemical composition, mass size distribution and source analysis of long-range transported wildfire smokes in Helsinki. *Sci Total Environ* 2005;350(1-3):119-35.
 152. Simon P, Jaison SG, Chopra SK, Jacob S. Conjunctival impression cytology in contact lens wearers. *Indian J Ophthalmol* 2002;50(4):301-6.
 153. Simoneit BR, Elias VO. Detecting organic tracers from biomass burning in the atmosphere. *Mar Pollut Bull* 2001;42(10):805-10.
 154. Singh R, Joseph A, Umapathy T, Tint NL, Dua HS. Impression cytology of the ocular surface. *Br J Ophthalmol* 2005;89(12):1655-9.
 155. Soares SR, Bueno-Guimaraes HM, Ferreira CM, Rivero DH, De Castro I, Garcia ML, et al. Urban air pollution induces micronuclei in peripheral erythrocytes of mice in vivo. *Environ Res* 2003;92(3):191-6.
 156. Sousa SJF, Romano AC, Espana E, Yoo SH, Tseng SCG, Gomes JAP. Anatomia funcional da superfície ocular. In: Gomes JAP, Alves MR. Superfície ocular. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2006.3-13.
 157. Souza MB, Saldiva PH, Pope CA 3rd, Capelozzi VL. Respiratory changes due to long-term exposure to urban levels of air pollution: a histopathologic study in humans. *Chest* 1998;113(5):1312-8.
 158. Sreenivas V, Prabhakar AK, Badrinath SS, Fernandez T, Roy IS, Sharma T, et al. A rural population based case-control study of senile cataract in India. *J Epidemiol* 1999;9(5):327-36.
 159. Suresh K, Doctor P. Pinguecula masquerading as conjunctival melanoma. *Indian J Ophthalmol* 2007;55(1):83-4.

160. Tagaris E, Liao KJ, Delucia AJ, Deck L, Amar P, Russell AG. Potential impact of climate change on air pollution-related human health effects. *Environ Sci Technol* 2009;43(13):4979-88.
161. Tamagawa E, Bai N, Morimoto K, Gray C, Mui T, Yatera K, et al. Particulate matter exposure induces persistent lung inflammation and endothelial dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008;295(1):L79-85.
162. Tananuvat N, Lertprasertsuk N, Mahanupap P, Noppanakeepong P. Role of impression cytology in diagnosis of ocular surface neoplasia. *Cornea* 2008;27(3):269-74.
163. Thiel MA, Bossart W, Bernauer W. Improved impression cytology techniques for the immunopathological diagnosis of superficial viral infections. *Br J Ophthalmol* 1997;81(11):984-8.
164. Tielsch JM, Katz J, Thulasiraj RD, Coles CL, Sheeladevi S, Yanik EL, Rahmathullah L. Exposure to indoor biomass fuel and tobacco smoke and risk of adverse reproductive outcomes, mortality, respiratory morbidity and growth among newborn infants in south India. *Int J Epidemiol* 2009;38(5):1351-63.
165. Tole DM, McKelvie PA, Daniell M. Reliability of impression cytology for the diagnosis of ocular surface squamous neoplasia employing the Biopore membrane. *Br J Ophthalmol* 2001;85(2):154-8.
166. Tseng SC. Staging of conjunctival squamous metaplasia by impression cytology. *Ophthalmology* 1985;92(6):728-33.
167. Ukponmwan CU, Dawodu OA, Edema OF, Okojie O. Prevalence of pterygium and pingueculum among motorcyclists in Nigeria. *East Afr Med J* 2007;84(11):516-21.
168. UNICA - União da Indústria de Cana-de-Açúcar. Ranking da produção de cana, açúcar e etanol das unidades da Região Centro-Sul. 2009 [citado 26 out 2009]. Disponível em: <http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica>.
169. V Srebot, EAL Gianicolo, G Rainaldi, Trivella MG, Sicari R. Ozone and cardiovascular injury. *Cardiovascular Ultrasound* 2009;7(30):1-8.
170. van Bijsterveld OP. Diagnostic tests in the Sicca syndrome. *Arch Ophthalmol* 1969; 82(1):10-4.
171. Vedal S, Brauer M, White R, Petkau J. Air pollution and daily mortality in a city with low levels of pollution. *Environ Health Perspect* 2003;111(1):45-52.
172. Waller RE, Brooks AG, Adler MW. The 1952 fog cohort study. *Br J Prev Soc Med* 1973;27(1):68-9.
173. Wang T, Moreno-Vinasco L, Huang Y, Lang GD, Linares JD, Goonewardena SN, et al. Murine lung responses to ambient particulate matter: genomic analysis and influence on airway hyperresponsiveness. *Environ Health Perspect* 2008;116(11):1500-8.

174. Wang T, Moreno-Vinasco L, Huang Y, Lang GD, Linares JD, Goonewardena SN, Grabavoy A, Samet JM, Geyh AS, Breysse PN, Lussier YA, Natarajan V, Garcia JG. Murine lung responses to ambient particulate matter: genomic analysis and influence on airway hyperresponsiveness. *Environ Health Perspect* 2008;116(11):1500-8.
175. Watanabe H. Significance of mucin on the ocular surface. *Cornea* 2002;21(2 Suppl 1):S17-22.
176. Wegesser TC, Pinkerton KE, Last JA. California wildfires of 2008: coarse and fine particulate matter toxicity. *Environ Health Perspect* 2009;117(6):893-7.
177. Yu MC et al. Epidemiology of nasopharyngeal carcinoma in Malaysia and Hong Kong. *National Cancer Institute Monographs* 1985;69: 203–207.
178. Zanobetti A, Schwartz J. The effect of fine and coarse particulate air pollution on mortality: a national analysis. *Environ Health Perspect* 2009;117(6):898-903.
179. Zodpey SP, Ughade SN. Exposure to cheaper cooking fuels and risk of age - related cataract in women. *Indian Journal of Occupational and Environmental Medicine* 1999;3(4):159-161.
180. Zou LY, Zhang W, Atkiston S. The characterisation of polycyclic aromatic hydrocarbons emissions from burning of different firewood species in Australia. *Environ Pollut* 2003;124(2):283-9.