MARCO ANTONIO GARCIA MARTINS

**Variação da composição e toxicidade do material particulado
ao longo do dia na cidade de São Paulo**

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

Departamento de: Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Mitiko Saiki

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Martins, Marco Antonio Garcia

Variação da composição e toxicidade do material particulado ao longo do dia na cidade de São Paulo / Marco Antonio Garcia Martins. -- São Paulo, 2010.

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

Orientadora: Mitiko Saiki.

Descritores: 1.Poluição do ar 2.Material particulado/análise 3.Material particulado/toxicidade 4.Metais/toxicidade 5.Monitoramento ambiental/instrumentação 6.Monitoramento ambiental/métodos

USP/FM/DBD-233/10

*À minha Mãe Neise pela paciência e amor incondicional;
À meu pai Antonio pelo exemplo de perseverança;
À Ana Paula, minha irmã, por sua constante companhia
e pelo incansável incentivo.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Mitiko Saiki, por sua orientação, confiança, amizade e ajuda em todas as horas.

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, pela oportunidade de crescimento, aprendizado, inspiração e força em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Petros Koutrakis e ao grupo de pesquisa da Escola de Saúde Pública da Universidade de Harvard / Departamento de Saúde Ambiental, pela oportunidade de aprendizado e apoio, essenciais para minha formação e realização deste trabalho.

Ao Dr. Mauro Antonio Moraes Victor, pelos ensinamentos, amizade, companheirismo e ajuda em diferentes fases da vida.

Ao Dr. Paulo Afonso de André pela ajuda na montagem e no preparo do concentrador e dos equipamentos necessários para realização deste estudo.

À Dra. Mariana Matera Veras e a todos os colegas e funcionários do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - LPAE/USP.

À Dra. Mônica Valeria Marquezini por sua ajuda e sugestões essenciais para finalização deste trabalho.

À pesquisadora Dra. Regina Maura de Miranda e aos funcionários do Laboratório de Análises dos Processos Atmosféricos do Instituto de Astronomia e Geofísica – USP (LAPAt-IAAG) pelo apoio no preparo e análise das amostras.

À Liduvina, à Márcia e à Dalva, profissionais do departamento de Patologia da FMUSP por toda ajuda e disponibilidade sempre que precisei.

Aos colegas e funcionários dos Laboratórios do Centro do Reator de Pesquisas do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CRPq – IPEN).

Aos professores que contribuíram para a minha formação acadêmica.

*“Todos pensam em mudar o mundo, mas
ninguém pensa em mudar a si mesmo ”*

Leo Tolstoy

SUMÁRIO

SUMÁRIO	vii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
Martins, M.A.G. Variação da composição e toxicidade do material particulado ao longo do dia na cidade de São Paulo. [tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Brasil; 2010.	xi
Martins, M.A.G. Composition and toxicology variations of particle matter during the day in São Paulo City [thesis]. São Paulo: School of Medicine, University of São Paulo, SP (Brazil); 2010.....	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Implementação do uso do Concentrador de Partículas Finas Ambientais de Harvard (CPFAH) para as condições ambientais brasileiras	2
1.2 Revisão da Bibliografia	5
1.2.1 Poluição	5
1.2.2 Poluição do ar	6
1.2.3 Material particulado	8
1.2.4 Efeitos da poluição aérea à saúde humana	11
1.2.5 Estudos Toxicológicos	13
2. OBJETIVOS	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Utilização do Concentrador de Partículas Finas Ambientais de Harvard (CPFAH)	16
3.2 Metodologias de análise das amostras coletadas no CPFAH.....	18
3.2.1 Gravimetria	19
3.2.2 Reflectância Óptica	21
3.2.3 Espectrometria de fluorescência de Raios-X por dispersão de energia (EDXRF)	22
3.2.4 Avaliação toxicológica	23
3.3 Análises estatísticas.....	26

4. RESULTADOS.....	27
4.1 O CPFAH, na cidade de São Paulo, concentra em média 15 vezes	27
4.2 A composição química das partículas finas ambientais concentradas na cidade de São Paulo são diferentes entre as estações do ano.....	29
4.2.1 O $PM_{2,5}$ encontrado na cidade de São Paulo apresenta maiores concentrações médias à noite – Experimento 1.....	29
4.2.2 Na primavera, as concentrações de $PM_{2,5}$ da cidade de São Paulo não mostram variações entre os períodos – Experimento 2.....	34
4.3 Testes Toxicológicos – As células meristemáticas das raízes de <i>Allium cepa</i> mostraram toxicidade quando encubadas com $PM_{2,5}$	35
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÕES.....	43
7. PROPOSIÇÕES	44
8. REFERÊNCIAS	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de funcionamento do impactador virtual.....	3
Figura 2 - Esquema do Concentrador de Partículas Finas Atmosféricas de Harvard (CPFAH)	4
Figura 3 - Principais fontes de aerossóis (Adaptado de Kemp, 1994)	7
Figura 4 - Foto via satélite (Google) da localização	16
Figura 5 - Vista externa do container onde está o CPFAH.....	17
Figura 6 - A imagem (A) mostra os três estágios do CPFAH. Vemos a localização da entrada de ar (1), o primeiro estágio (2), o segundo estágio (3), o terceiro estágio (4) e as câmaras de exposição (5). A imagem (B) também mostra os três estágios em uma visão oposta a imagem (A)	17
Figura 7 - A, B e C ilustração detalhada dos estágios 1 e 3 do CPFAH e das câmaras de exposição	18
Figura 8 - Balança (A) e material particulado amostrado em filtros antes e depois da concentração (B)	20
Figura 9 - Fotografia do refletômetro da EEL Smokestain, modelo M43D	21
Figura 10 - Fotografia do Espectrômetro de Fluorescência de Raios-X (A) e do carrossel porta-amostras (B)	23
Figura 11 - Razão entre as concentrações médias dos parâmetros determinados em amostras coletadas antes e depois do CPFAH.....	29
Figura 12 - Concentração média de PM _{2,5} , BC, Br, Cl, Cu, Fe, K, S, V e Zn obtidos em material particulado coletado em diferentes períodos durante o Experimento 1	31
Figura 13 - Média das concentrações de Al, Ca, Cr, Mg, Mn, Ni, P, Pb, Si e Ti em material particulado coletado em diferentes períodos durante o Experimento 1	31
Figura 14 - Apresenta a distribuição dos coeficientes de regressão para cada fator nos diferentes períodos estudados	34
Figura 15 - Frequência de formação de micronúcleos em células meristemáticas de Allium cepa expostas ao PM _{2,5} durante 48 horas	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Métodos de análises das amostras coletadas.....	19
Tabela 2 - Análise das amostras de PM _{2,5} coletados antes (ambiente) e depois (concentrado) do CPFAH.....	28
Tabela 3 - Análise das amostras de PM _{2,5} coletadas após o CPFAH em diferentes períodos durante o Experimento 1	30
Tabela 4 - Análise das amostras de PM _{2,5} coletadas após o CPFAH nos períodos Dia e Noite durante o Experimento 1	32
Tabela 5 - Fatores obtidos na análise de componentes principais	33
Tabela 6 - Análise das amostras de PM _{2,5} coletadas após o CPFAH nos períodos Manhã e Noite durante o Experimento 2.....	35
Tabela 7 - Resultados da frequência de micronúcleos das células meristemáticas após incubação com PM _{2,5} por 48 horas	36

Martins, M.A.G. Variação da composição e toxicidade do material particulado ao longo do dia na cidade de São Paulo. [tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Brasil; 2010.

Este estudo avalia os efeitos adversos na saúde causados pelas variações na composição do material particulado em curtos períodos de tempo. Para tanto, foram determinados Black Carbon (BC), massa e composição elementar do PM_{2.5} coletado em dois diferentes períodos, Dia e Noite, na cidade de São Paulo. Além das análises químicas, gravimetria, análise de reflectância e espectrometria por fluorescência de Raios-X, foram realizados testes toxicológicos de contagem de micronúcleos utilizando ressuspensão do PM_{2.5} em raízes de *Allium cepa* (cebola). O PM_{2.5} foi amostrado na saída do Concentrador de Partículas Finas Ambientais de Harvard (CPFAH) e as amostras foram coletadas diariamente por quinze dias, entre Maio e Junho (Experimento 1) e entre Outubro e Novembro (Experimento 2) de 2009, durante o Dia (8:00h – 11:00h e 14:00h – 17:00h) e a Noite (20:00h – 23:00h). A variabilidade na composição do PM_{2.5} foi analisada utilizando o método de componentes principais, por meio da qual foram identificados três fatores significantes: Fator 1, onde encontramos BC e os elementos Ca, Fe, K, Si, Zn e Ti que podem ser característicos da emissão do tráfego veicular em geral; Fator 2 onde encontramos Ni e Cr que podem ser interpretados como resultado das emissões industriais; e o Fator 3 é formado pelos elementos V e S que podem ser característicos das emissões das queimas de diesel e óleo combustível. A análise univariada da contagem dos três fatores mostrou uma diferença significativa somente para o Fator 3 ($p=0,022$) entre os dois períodos, fazendo-se mais presente no período noturno. A frequência do número de micronúcleos das células de raízes de cebola foi maior para período noturno. Os resultados indicam que existem diferenças na composição e toxicidade do PM_{2.5} coletado em diferentes períodos na cidade de São Paulo. Os dados sugerem que a toxicidade do PM_{2.5} pode ser influenciada pelas mudanças nos padrões de tráfego e processos fotoquímicos da atmosfera.

Descritores: Poluição do ar; Material particulado/análise; Material particulado/toxicidade; Metais/toxicidade; Monitoramento ambiental/instrumentação; Monitoramento ambiental/métodos

Martins, M.A.G. Composition and toxicology variations of particle matter during the day in São Paulo City [thesis]. São Paulo: School of Medicine, University of São Paulo, SP (Brazil); 2010.

The objective of this study was to evaluate the adverse health effects of short-term variations in particle composition. For this purpose, black carbon, particle mass and elemental composition of PM_{2.5} collected along the two different periods in São Paulo city were determined. In addition to the chemical measurements, toxicological evaluation was performed using the *Allium cepa* micronuclei assay test and particle suspensions of PM_{2.5} as test substrate. PM_{2.5} was sampled at the output of the Harvard Ambient Fine Particle Concentrator (HAFPC). The samples were collected daily from May 19th to June 4th (period 1) of 2009, during the morning (from 8 AM to 11 AM), afternoon (from 2 PM to 5 PM), and evening (from 8 PM to 11 PM), and from November 11th (period 2) of 2009, during the morning (from 8 AM to 11 AM), and evening (from 8 PM to 11 PM). Samples collected during the morning and afternoon were called Day and those collected during the evening, EVENING. Concentrations of PM_{2.5} mass (gravimetric method), black carbon (reflectance analysis) and trace elementals (X-ray fluorescence spectrometry) were determined. Variability in PM_{2.5} composition measured was analyzed using Principal Components Analysis in which 3 significant factors were identified. Results of black carbon (BC) and of elements Ca, Fe, K, Si, Zn and Ti were grouped in Factor 1, that can be characteristic of general traffic emission; In Factor 2, Ni and Cr were included and it can be interpreted as a result of industry emissions; and Factor 3 is formed by V and S what characterizes diesel/oil combustion emissions. Univariate Analysis of factor scores indicated a significant difference between the periods scores of factor 3 (p=0.022). The frequency of number of micronuclei obtained was also higher in samples collected at the EVENING than those of DAY. In conclusion, our results indicate that there are differences in the composition and toxicity of PM_{2.5} collected in different periods of the day. These findings suggest that particle toxicity may be influenced by changes in traffic patterns and photochemical processes.

Descriptors: Air pollution; Particulate matter/analysis; Particulate matter /toxicity; Metals/toxicity; Environmental monitoring/instrumentation; Environmental monitoring/methods.

1. INTRODUÇÃO

A literatura tem enfatizado a importância dos estudos sobre os efeitos agudos e crônicos do material particulado ambiental à saúde respiratória humana. Sabe-se que as partículas ambientais são constituídas por materiais naturais, como pólen, e materiais antrópicos, como os aerossóis. Essas partículas podem ser emitidas por fontes diretas (aerossol primário) ou formadas por reações na atmosfera (aerossol secundário) (Sioutas *et al.*, 1995). Dessa maneira, muitos experimentos têm sido realizados para investigar os efeitos agudos da poluição, porém com limitações inerentes aos modelos experimentais utilizados.

Com o propósito de minimizar as limitações metodológicas impactantes sobre os estudos referentes à poluição ambiental e saúde humana, o Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental (LPAE) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FM-USP) iniciou a utilização de modelos de inalação que simulam condições reais da atmosfera local por meio do uso do Concentrador de Partículas Finas Ambientais de Harvard (CPFAH).

Os relatos científicos sobre o uso de partículas artificiais mostram que elas não representam a complexidade do meio atmosférico, assim como os ensaios utilizando a recuperação de partículas ambientais, a partir da sua coleta em filtros, indicam alterações nas propriedades químicas e físicas dessas partículas, como o diâmetro (Sioutas *et al.*, 1995).

Esses dados apontam para a conveniência do uso de um sistema, como o CPFAH, que não interfira na composição química e/ou nas propriedades

aerodinâmicas das partículas. Sendo assim, o uso do CPFAH permite que os experimentos sejam realizados com os animais respirando espontaneamente, minimizando as limitações dos ensaios, causadas pelos métodos de sedação, intubação traqueal e preparo de resuspensões do material particulado.

1.1 Implementação do uso do Concentrador de Partículas Finas Ambientais de Harvard (CPFAH) para as condições ambientais brasileiras

O CPFAH foi desenvolvido pela Escola de Saúde Pública da Universidade de Harvard – EUA em 1995, utilizando a tecnologia de impactadores virtuais, com o propósito de aumentar em até 30 vezes a concentração das partículas ambientais, iguais e inferiores a $2,5\mu\text{m}$ de diâmetro aerodinâmico, em suspensão presentes na atmosfera, alimentando uma câmara de exposição para ensaios toxicológicos (Sioutas *et al.*, 1995, 1997).

O LPAE adquiriu o CPFAH com o auxílio dado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), em 2005, iniciando sua montagem. A partir de 2009, o CPFAH começou a ser utilizado em ensaios toxicológicos com modelos de inalação que simulam condições reais da atmosfera local.

O CPFAH é formado por um conjunto de impactadores virtuais montados em série, que consistem em um acelerador de fluxo de ar que o dirige para uma passagem estreita e previamente calibrada, enquanto é aplicado perpendicularmente um vácuo de alta intensidade ao fluxo de ar. Dessa maneira, uma porção gasosa do fluxo de ar e parte das partículas ultrafinas de baixa densidade são removidas, e o material particulado fino inalável passa

pelo sistema de concentração e segue rumo a câmara de exposição (Sioutas *et al.*, 1995), conforme esquema da Figura 1.

Figura 1 - Esquema de funcionamento do impactador virtual

Os três conjuntos de impactadores virtuais em série formam o concentrador de partículas, cuja vazão inicial de ar captada, de 5.000 L min^{-1} (litros por minuto), é reduzida a aproximadamente 40 L min^{-1} . Todo este processo ocorre em fração de segundos, sem qualquer contato do ar com peças móveis, de maneira que não há tempo para alterações das características físicas e da composição química do material particulado. A Figura 2 mostra o esquema do concentrador de partículas.

Figura 2 - Esquema do Concentrador de Partículas Finas Atmosféricas de Harvard (CPFAH)

O CPFAH montado pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), utilizado neste trabalho, apresenta algumas modificações em relação ao projeto original do Concentrador. A equipe do LPAE desenvolveu um sistema que permite a pré-filtragem de parte do ar que entra no sistema de impactadores virtuais, tornando-o capaz de fracionar o nível de concentração do material particulado. Esse fracionamento permite estabelecer protocolos de exposição de animais a diferentes e controladas dosagens de material particulado. O ajuste do nível de concentração é obtido pelo uso de uma válvula manual que desvia parte do fluxo de ar para um sistema de filtro mecânico (Saldiva, 2008).

A unidade do CPFAH da FMUSP está montada em um container marítimo de 40 pés (12 m de comprimento), possibilitando seu transporte a diferentes localidades onde a avaliação da poluição atmosférica seja de interesse para pesquisa e avaliação de risco (Saldiva, 2008).

1.2 Revisão da Bibliografia

1.2.1 Poluição

Poluição, de um modo geral, pode ser definida como a introdução de contaminantes no ambiente, causando instabilidade, desordem, perigo ou desconforto ao ecossistema. A poluição é um conjunto de substâncias químicas ou energia como barulho, calor ou luz. Seus elementos, poluentes, provêm de fontes externas e somente são consideradas contaminantes quando excedem os níveis aceitáveis (CETESB, 2005).

As mais antigas obras que descrevem a poluição são os Tratados Médicos Árabes escritos entre os séculos IX e XIII, por médicos como Al-Kindi (Alkindus), Qusta Ibn Luqa (Costa ben Luca), Muhammad Ibn Zakarīya Rāzi (Rhazes), Ibn Al-Jazzar, Al-Tamimi, Al-Masihi, Ibn Sina (Avicenna), Ali Ibn Ridwan, Ibn Jumay, Isaac Israeli Ben Solomon, Abd-El-Latif, Ibn Al-Quff, e Ibn Al-Nafis. Essas obras abordam diversos temas relacionados à poluição, tais como a contaminação do ar, da água, do solo, bem como a má gestão de resíduos sólidos (Gari, 2002).

Dentre os diferentes compartimentos do meio ambiente, o ar é o mais agredido pelo homem com a introdução de diversos contaminantes. O ar é indispensável para a vida, uma vez que não se pode deixar de respirar. Entretanto, o problema da poluição aérea não tem recebido muita atenção pelo fato do ar ser abundante, invisível e inodoro (Braga *et al.*, 2002).

1.2.2 Poluição do ar

O rápido desenvolvimento tecnológico do mundo moderno tem ocasionado um aumento na quantidade e na variedade de poluentes emitidos para a atmosfera, prejudicando de maneira muito séria a qualidade de vida em nosso planeta (Castro *et al.*, 2003).

O homem primitivo, vivendo em pequenos grupos, extraía materiais da natureza como meio de subsistência não visando acumulação de riquezas. Porém, com o crescimento da população mundial, seu desenvolvimento e mercantilização da sociedade, houve gradativo e exponencial aumento do impacto negativo das atividades humanas ao meio ambiente.

Até meados do século XVIII, os prejuízos da poluição aconteciam em nível local ou regional. Com o maior desenvolvimento tecnológico, o aumento da população e a revolução industrial a situação agravou-se. Nas décadas de 60 e início de 70, os principais problemas associados ao meio ambiente foram a poluição do ar, dos rios e lagos. Nessa época, a poluição do ar era um problema somente nas grandes cidades. Mais tarde foram criadas leis de controle do nível de poluição e o problema começou a ser estudado. Nos últimos anos, o conhecimento sobre impacto social da degradação do meio ambiente e as tecnologias para estudos sobre agressões aos ecossistemas tem crescido bastante. Os grandes temas que chamaram a atenção foram o efeito estufa, a chuva ácida e o buraco na camada de ozônio (Kemp, 1994).

Nos grandes centros urbanos, a poluição aérea é mais aparente com o crescente aumento populacional, veicular e de áreas industriais ao seu redor, gerando problemas relacionados à dispersão de poluentes.

Esses poluentes atmosféricos podem ser divididos em duas categorias: gases e partículas, que apresentam características físicas, químicas e dispersivas diferentes. A Figura 3 mostra as principais fontes de aerossóis, gases e partículas, na atmosfera.

Figura 3 - Principais fontes de aerossóis (Adaptado de Kemp, 1994)

A fração gasosa é formada por diversos compostos químicos, tais como os óxidos de enxofre (SO_x), monóxido e dióxido de carbono (CO, CO₂), ozônio (O₃), óxidos de nitrogênio (NO_x), compostos orgânicos voláteis (COVs) e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). Atualmente, os HPAs são os mais estudados em decorrência da sua relação com o efeito estufa, o aquecimento global e a saúde humana.

Os compostos orgânicos voláteis (COVs) são poluentes que contém carbono, facilmente vaporizados em condições de temperatura, pressão ambiente e que, por meio de reações químicas, atuam como precursores do “smog”

fotoquímico, levando à formação do ozônio troposférico. Os COVs têm um grande impacto sobre a saúde humana em função da sua alta toxicidade e efeito cancerígeno (Albuquerque, 2007).

Já os HPAs são definidos como compostos orgânicos com dois ou mais anéis aromáticos condensados, e que estão presentes tanto no material particulado em suspensão quanto em outras matrizes ambientais. No meio ambiente, os HPAs sofrem reações químicas, originando produtos que podem ser prejudiciais à saúde humana (por suas propriedades mutagênicas e carcinogênicas). As fontes naturais de emissão de HPAs são as erupções vulcânicas e queimadas florestais espontâneas, mas as principais fontes de HPAs são as de origem antrópica, principalmente aquelas advindas da exaustão de motores a diesel e a gasolina de processos industriais e da fumaça de cigarros (Cordeiro, 2006).

As partículas sólidas ou líquidas encontradas na atmosfera são denominadas material particulado (MP). A composição do material particulado pode incluir vários elementos químicos, especialmente metais e compostos de carbono (Bergamaschi *et al.*, 2007).

1.2.3 Material particulado

O material particulado (PM) total em suspensão é caracterizado por partículas iguais e/ou inferiores a 100 µm de diâmetro aerodinâmico, denominadas Partículas Totais em Suspensão (PTS). As partículas com diâmetro aerodinâmico menor ou igual a 10 µm são chamadas de partículas inaláveis

(PM₁₀) e são classificadas em grossas (PM_{10-2,5} = 2,5 µm a 10 µm), finas (PM_{2,5} = ≤2,5 µm) e ultrafinas (PM_{0,1} = ≤0,1 µm) (Baird, 2002).

A fração grossa (PM_{10-2,5}) pode estar presente naturalmente na atmosfera ou ser gerada a partir do solo e outros materiais da crosta terrestre. Nas cidades com alta densidade de tráfego, uma fração significativa da fração grossa é produzida pela fricção dos pneus dos veículos com o asfalto das ruas e contém elementos do pavimento e da borracha pneumática.

Partículas finas (PM_{2,5}) são derivadas, de maneira geral, de processos de combustão de automotores, indústrias ou usinas termoeletricas. O PM_{2,5} contém partículas primárias, produzidas diretamente pelas fontes emissoras, bem como partículas secundárias, principalmente sulfatos e nitratos, geradas do processo de conversão de gás-partículas, partindo de óxidos de enxofre e de óxidos de nitrogênio. Também fazem parte do PM_{2,5} partículas de carvão, produzido pela queima de combustíveis fósseis que apresentam na sua superfície diferentes elementos e compostos, tais como metais pesados e hidrocarbonetos adsorvidos.

As partículas ultrafinas (PM_{0,1}) têm um tempo de residência na atmosfera relativamente curto, pois se agregam progressivamente para formar partículas finas (PM_{2,5}) (Pope, 2000a).

Muitos estudos já demonstraram que as partículas finas e ultrafinas são as mais perigosas para o ser humano, pois podem penetrar nos alvéolos pulmonares e causar doenças cardiovasculares e respiratórias (Kampa e Castanas, 2008).

A composição do PM_{2,5} pode variar de acordo com as fontes existentes, sendo, em sua maioria formada por metais, água e compostos orgânicos adsorvidos.

Os metais são componentes naturais da crosta terrestre, mas também são lançados no meio ambiente por meio da queima de combustíveis e atividades industriais. Esses elementos podem ser transportados pelo ar, contaminando os alimentos, a água e os seres vivos (Kampa e Castanas, 2008). Alguns metais são comumente chamados de “elementos-traço”, por ocorrerem em concentrações da ordem de parte por milhão (ppm) ou parte por bilhão (ppb).

Embora alguns metais sejam essenciais ao organismo humano, quando ingeridos ou inalados em concentrações acima do necessário tornam-se tóxicos (Jarup, 2003).

Atualmente, sabe-se que os veículos automotivos não emitem apenas poluentes gasosos, mas também partículas metálicas oriundas das partes internas do motor, dos combustíveis, óleos lubrificantes e aditivos. Entretanto, não há padrões nacionais estabelecidos sobre as concentrações de metais no ar, e as informações sobre os teores de metais provenientes de emissões veiculares são limitadas (Silva, 2007).

Os metais pesados estão entre os poluentes mais perigosos de origem antrópica, devido a sua toxicidade e permanência no meio ambiente. Assim, avaliar os níveis de deposição dos metais presentes na atmosfera é essencial à saúde do ser humano (Carreras *et al.*, 2009).

1.2.4 Efeitos da poluição aérea à saúde humana

Um dos primeiros estudos sobre a correlação existente entre os efeitos da poluição atmosférica à saúde foi estabelecido a partir de episódios agudos de contaminação do ar com a ocorrência de milhares de mortes registradas em Londres, em 1948. No Brasil, jornais das décadas de 60 e, especialmente de 70, notificaram registros de episódios agudos de poluição do ar, decorrentes do excesso de poluentes lançados pelas indústrias na atmosfera, causando mal-estar e lotando os serviços médicos de emergência (CETESB, 2005).

Desde então, muitos estudos têm demonstrado que a poluição atmosférica prejudica a saúde da população exposta, causando doenças respiratórias e aumentando o risco de doenças cardiovasculares e até mesmo alguns tipos de câncer (Samet *et al.*, 2000; Pope *et al.*, 2002; Pope *et al.*, 2009; Polichetti *et al.*, 2009).

Sabe-se que pessoas que passam longos períodos nas ruas, muitas vezes presas nos congestionamentos, são submetidas a doses maiores de poluentes e ficam mais tempo expostas aos mesmos, tornando-se mais vulneráveis aos seus efeitos adversos (Saldiva, 2006).

Segundo Kampa e Castanas (2008), todos os tipos de poluentes atmosféricos em altas concentrações são prejudiciais à saúde. Porém, um longo tempo de exposição a concentrações baixas de poluentes também pode causar o mesmo dano.

A extensão da ação dos poluentes e os seus mecanismos de atuação no organismo humano são alguns dos principais temas que ainda exigem da comunidade científica um grande esforço para elucidação.

Os diferentes componentes da poluição atmosférica, a dose, o tempo de exposição, podem levar a diversos impactos na saúde humana. Os efeitos à saúde dependem do tipo de poluente, sua concentração, tempo de exposição e suscetibilidade individual (Kampa e Castanas, 2008).

A definição mais amplamente adotada para caracterizar um efeito adverso à saúde tem sido a preconizada pela American Thoracic Society (2000), que define o agravo à saúde “como um evento médico significativo, caracterizado por um ou mais dos seguintes fatores: 1) interferência na atividade normal dos indivíduos afetados; 2) doença respiratória episódica; 3) doença incapacitante; 4) doença respiratória permanente; 5) disfunção respiratória progressiva”.

No início deste milênio, à luz dos novos conhecimentos científicos, a Sociedade Americana de Doenças Torácicas expandiu o escopo de sua definição anterior, incorporando os seguintes eventos: biomarcadores, qualidade de vida, alterações fisiológicas, sintomas, aumento da demanda por atendimento médico e, finalmente, mortalidade.

Em 2004, a Sociedade Americana de Cardiologia mostrou que a poluição atmosférica é reconhecida como um fator de risco para o agravamento de doenças cardiovasculares, notadamente infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva e desenvolvimento de arritmias (Brook *et al.*, 2004).

Além disso, a literatura também relata que alterações reprodutivas, como baixo peso ao nascer, abortos e relação macho-fêmea (ao nascimento) também foram incorporadas ao conjunto de indicadores de efeitos nocivos da poluição do ar (Saldiva, 2006).

Convém ainda salientar que a definição de efeito adverso à saúde deve ser necessariamente acompanhada da caracterização dos grupos populacionais mais suscetíveis. O aumento da suscetibilidade aos poluentes é dependente de fatores individuais, de moradia e nível sócio-econômico. Entre os fatores de natureza individual, os mais importantes são a idade, morbidades associadas e características genéticas. Os extremos da pirâmide etária, abaixo de cinco e acima de 65 anos de idade, têm sido consistentemente apontados como alvos preferenciais das ações adversas dos poluentes atmosféricos (Saldiva, 2006).

Devido aos fatores citados acima, nos últimos anos, órgãos governamentais de muitos países têm monitorado os materiais particulados (PM), principalmente o PM₁₀. Ou seja, a concentração total das partículas inaláveis com diâmetro aerodinâmico menores que 10 µm.

1.2.5 Estudos Toxicológicos

O estudo sobre “venenos” foi o tema de interesse de muitas culturas antigas. Por exemplo, para os egípcios o estudo dos glicosídeos cardíacos; para os chineses, os alcalóides do ópio; para os incas, os alcalóides da coca e da estricnina; para os gregos, a cicuta. Nessa época, a toxicologia era tratada de maneira descritiva e empírica. Em contraste, a toxicologia moderna está focada

nos mecanismos de ação e toxicocinética dos compostos, fundamentalmente, uma ciência nova que influencia no campo da medicina (Fernícola, 2002).

Para fins práticos e didáticos, a toxicologia pode ser dividida em cinco áreas de interesse: de alimentos, ambiental, de medicamentos, ocupacional e social considerando três aspectos: analítico, legal e de pesquisa (Moraes, 1978).

Diversas investigações sobre a toxicologia dos poluentes atmosféricos vêm sendo realizadas mundialmente, em especial sobre o PM_{2,5} (Arantes-Costa *et al.*, 2008; Padhi e Padhy, 2008; Simkhovich *et al.*, 2008; Akinaga *et al.*, 2009; Campbell *et al.*, 2009; Clougherty e Kubzansky, 2009; Kouassi *et al.* 2009; Noyes *et al.*, 2009).

Nos estudos toxicológicos, as plantas vêm sendo utilizadas por seu baixo custo da análise e rapidez na obtenção dos resultados (Carvalho-Oliveira *et al.*, 2005; Mariani *et al.*, 2009). Nestes estudos, a contagem de formação de micronúcleos é uma metodologia amplamente aplicada, por caracterizar as mutações ocorridas nas células expostas aos poluentes.

2. OBJETIVOS

- Implementar a metodologia de utilização do Concentrador de Partículas Finas Ambientais de Harvard (CPFAH) para protocolos de exposições toxicológicas para as condições locais;
- Caracterizar os componentes químicos e físicos do material particulado fino concentrado da cidade de São Paulo obtido em diferentes períodos (Dia e Noite);
- Avaliar a toxicidade nas células de raízes de *Allium cepa* (cebola) após a sua exposição ao material particulado fino concentrado coletado nos diferentes períodos estudados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Utilização do Concentrador de Partículas Finas Ambientais de Harvard (CPFAH)

Durante o desenvolvimento deste projeto, o container com o CPFAH ficou estacionado no pátio externo ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP), localizado na Cidade Universitária, SP, Brasil (Figura 4).

Figura 4 - Foto via satélite (Google) da localização

A Figura 5 ilustra o exterior do container onde está montado o CPFAH.

Figura 5 - Vista externa do container onde está o CPFAH

A Figura 6 ilustra o interior do container, com detalhe da disposição do CPFAH.

Figura 6 - A imagem (A) mostra os três estágios do CPFAH. Vemos a localização da entrada de ar (1), o primeiro estágio (2), o segundo estágio (3), o terceiro estágio (4) e as câmaras de exposição (5). A imagem (B) também mostra os três estágios em uma visão oposta a imagem (A)

A Figura 7 ilustra os detalhes dos estágios 1 e 3 do CPFAH. A Figura 7A mostra os impactadores virtuais, do primeiro estágio, dispostos em paralelo. A Figura 7B apresenta detalhes do terceiro estágio, com um impactador virtual de menor capacidade, e a Figura 7C ilustra as câmaras para exposição de animais que são utilizadas para os experimentos toxicológicos.

Figura 7 - A, B e C ilustração detalhada dos estágios 1 e 3 do CPFAH e das câmaras de exposição

3.2 Metodologias de análise das amostras coletadas no CPFAH

Para avaliar a eficiência do CPFAH e caracterizar o material particulado (PM) presente em diferentes períodos foram realizadas amostragens simultâneas sobre filtros de polycarbonato (Millipore®), com 47mm de diâmetro e vazão de 30 L min^{-1} , nos pontos localizados antes da entrada do ar no CPFAH (ambiente) e após sua passagem pelo concentrador (concentrado). Essas coletas foram realizadas em três períodos do dia, pela manhã entre 8:00h e 11:00h, à tarde entre 14:00h e 17:00h e à noite entre 20:00h e 23:00h.

As coletas foram realizadas diariamente entre os dias 19 de Maio e 4 de Junho (Experimento 1) e entre 29 de Outubro e 11 de Novembro (Experimento 2) de 2009. Os filtros coletados em dias de chuva foram descartados por não apresentarem massa suficiente para análise.

A Tabela 1 apresenta as metodologias analíticas aplicadas nas análises das amostras de PM coletadas nos filtros de polycarbonato.

Tabela 1 - Métodos de análises das amostras coletadas		
Métodos de amostragem	Parâmetros avaliados	Metodologia utilizada
	Massa do PM	Gravimetria
Impactação em Filtros	"Black Carbon"	Reflectância Óptica
	Elementos maiores e traço	Espectrometria por Fluorescência de raios X
Ressuspensão do PM	Toxicologia em material vegetal	Análise de formação de micronúcleos

3.2.1 Gravimetria

A concentração do material particulado, ou seja, a massa total do material retido no filtro por volume de ar succionado, foi obtida pelo método gravimétrico. Para isso, foram realizadas pesagens dos filtros antes e depois da exposição utilizando uma balança analítica de alta sensibilidade da marca Mettler Toledo, modelo MX5, com precisão de 1µg. Na Figura 8 (A e B) são apresentadas a balança e os filtros amostrados.

Figura 8 - Balança (A) e material particulado amostrado em filtros antes e depois da concentração (B)

Os filtros foram acondicionados individualmente em placas de Petri (Figura 10A) e deixados para equalização em uma sala com temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e umidade relativa ($\text{UR } 40 \pm 3 \%$) controladas por um período de 24 horas antes de cada pesagem. Foram realizadas três pesagens, não sucessivas, para cada filtro e utilizada a média aritmética destas pesagens.

A massa dos filtros foi pesada antes e depois da amostragem, sendo a diferença das duas pesagens considerada a massa do material particulado depositado. Conhecendo a vazão da bomba e o tempo de exposição, obteve-se o volume do ar succionado. Dividindo-se a massa do PM obtida pelo volume total de ar succionado, foi obtida a concentração de $\text{PM}_{2,5}$ do ar em $\mu\text{g m}^{-3}$.

modelo M43D (Diffusion Systems Ltd., London, UK) (Figura 9) conforme protocolo determinado por EC Directive 80/799/EEC (ABNT, 1989).

Figura 9 - Fotografia do refletômetro da EEL Smokestain, modelo M43D

Foram realizadas duas medições da reflectância de cada filtro amostrado e a média das leituras foram usadas para mensurar o Black Carbon.

No quadro abaixo descrevemos a fórmula para o cálculo do Black Carbon

$$\text{Black carbon } [\mu\text{g m}^{-3}] = \left((x - (y * \log(R))) + z * (\log(R))^2 * A \right) / (V)$$

onde:

x , y e z são coeficientes da curva obtida empiricamente

R : média da refletância [%]

A : área do filtro [cm^2]

V : volume de ar amostrado [m^3]

3.2.3 Espectrometria de fluorescência de Raios-X por dispersão de energia (EDXRF)

A espectrometria de fluorescência de Raios-X consiste na medida das intensidades do mesmo emitido pelos elementos químicos da amostra. Para provocar a emissão dos Raios-X característicos de cada elemento a excitação pode ser de várias maneiras, tais como: de elétrons, de prótons, de partículas β e recentemente por Raios-X gerados em tubos. Um fóton de Raios-X interagindo com um elétron de um átomo do elemento da amostra, resulta na ejeção deste elétron. A energia deste fóton deve ser maior que a energia de ligação do elétron, em determinada camada do átomo, para que ocorram as transições eletrônicas. Assim, haverá emissões de radiações fluorescentes de energia características de cada elemento bem definidas. Logo, os átomos dos elementos da amostra emitindo Raios-X, com linhas espectrais de energias características, permitem a identificação desses elementos e suas intensidades. As concentrações dos elementos da amostra são proporcionais a intensidade dos Raios-X emitidos (Kellner *et al.*, 1998).

No sistema de fluorescência de Raios-X por dispersão de energia (EDXRF), os raios característicos dos elementos incidem em um detector eletrônico de estado sólido produzindo pulsos elétricos, com a amplitude proporcional à energia da radiação incidente, e um software processa esses pulsos em função da energia liberada. Esta técnica tem sido amplamente utilizada na análise de amostras de plantas e materiais particulados (Stephens e Calder, 2004; Chu *et al.* 2003; Richardson *et al.*, 1995) e também foi a técnica utilizada neste estudo.

O espectrômetro de Fluorescência de raios X utilizado foi da marca SHIMADZU Co., modelo EDX-700HS, ilustrado na Figura 10.

Figura 10 - Fotografia do Espectrômetro de Fluorescência de Raios-X (A) e do carrossel porta-amostras (B)

A determinação das concentrações dos elementos foi calculada pelo método de curva de calibração, utilizando material de referência. Os elementos analisados foram Al, Br, Ca, Cl, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, P, Pb, S, Se, Si, Ti, V, e Zn.

3.2.4 Avaliação toxicológica

Para realizar os testes de toxicidade do PM_{2,5} foram utilizados somente os filtros com o material concentrado. Os filtros foram separados por períodos (Manhã e Noite) e acondicionados, individualmente em frascos aos quais foram adicionados 20 mL de água destilada e incubados, em banho de ultrassom, por 100 minutos.

Após sonicados, os filtros foram colocados individualmente, em placas de Petri, e incubados a 40°C por 12 horas para secagem. Posteriormente, seguidos os procedimentos de gravimetria para nova pesagem.

Os extratos das amostras dos dois períodos distintos, Manhã e Noite, contendo o PM_{2,5}, foram juntados (pool de amostras) e armazenados em geladeira para posteriores análises toxicológicas.

A massa de PM_{2,5} existente na solução foi obtida pelo resultado do peso dos filtros, depois de amostrados, subtraindo o valor do peso dos mesmos após a extração do PM_{2,5}.

Através do volume utilizado na extração do PM_{2,5} foi possível calcular a concentração, em $\mu\text{g mL}^{-1}$, de material particulado de cada pool de amostras (Manhã e Noite), possibilitando a sua utilização para os testes toxicológicos.

O estudo toxicológico foi realizado pela análise do número de mutagêneses encontradas em raízes jovens de *Allium cepa* (cebola comum). Foram escolhidas cebolas orgânicas, ao invés das produzidas com produtos químicos, por não utilizarem inibidores de enraizamento, o que dificultaria a realização do experimento.

Para iniciar o enraizamento, foram colocadas 24 cebolas sobre frascos escuros (tubos de filme fotográfico comum) com a parte inferior imersa em água comum por quatro dias.

Em seguida, as cebolas foram separadas aleatoriamente em grupos de três, para realização do experimento em triplicata. Suas raízes foram imersas por 48

horas nas soluções teste (manhã, noite, controle positivo e negativo) preparadas previamente nas seguintes concentrações: 1:1; 1:10 e 1:30. Foram também preparadas soluções controles com água destilada, como controle negativo, e formaldeído 1:1000, como controle positivo.

Após o período de 48 horas de incubação, as raízes foram cortadas e colocadas em uma solução fixadora de ácido acético e etanol, na proporção 1:3, por 24 horas. Em seguida, lavadas em água corrente por cinco minutos, hidrolizadas com solução de ácido clorídrico (HCl) 1N a $80\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 8 minutos e lavadas novamente em água corrente por 5 minutos.

Para montagem das lâminas foram cortadas as raízes, a partir do ápice, excluindo as coifas, estrutura protetora do ápice, e esmagadas em uma lâmina para liberação das células. Após, adicionou-se uma gota de carmim acético, retirou-se o material fibroso e o líquido remanescente foi coberto com uma lamínula.

Utilizando um microscópio óptico com aumento de 1000 vezes, foram contadas a frequência de mutações (micronúcleos) em 500 células por lâmina.

As lâminas foram codificadas para que a contagem fosse aleatória, sendo os códigos revelados somente ao final do experimento.

3.3 Análises estatísticas

Os dados brutos do estudo dos filtros expostos antes e depois do CPFAH após ensaios gravimétricos, de reflectância, de fluorescência de Raios-X e Toxicológicos, foram analisados utilizando o modelo paramétrico, após transformação logarítmica, por análise de variância (ANOVA).

Para avaliação da participação de componentes principais na composição elementar do material coletado nos filtros foi aplicada a análise de fatores (Varimax).

As frequências dos micronúcleos foram comparadas entre os grupos pelas médias das análises da variância dos ranques, seguida pela análise de Student-Newman-Keuls post hoc.

A comparação entre as frequências dos micronúcleos induzidos pelo PM_{2,5} nos períodos Manhã e Noite foram realizadas utilizando o teste Mann-Whitney U.

Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa SPSS (SPSS Incorporation, Chigago, Il., EUA), versão 8. O nível de significância adotado foi de 0,05.

4. RESULTADOS

4.1 O CPFAH, na cidade de São Paulo, concentra em média 15 vezes

A implementação do CPFAH na cidade de São Paulo concentra 15 vezes o $PM_{2,5}$ existente no ambiente. Esse fator de concentração pôde ser mensurado a partir da constatação da eficiência do CPFAH por meio das análises de todas as amostras de filtros coletados nos diferentes períodos (manhã, tarde e noite) e datas (de Maio à Junho e de Outubro à Novembro). Para confirmação dessa eficiência, as amostras foram analisadas por gravimetria, reflectância e fluorescência de Raios-X. Os dados obtidos foram comparados entre as amostras coletadas antes (denominadas de ambiente) e depois (denominadas de concentrado) do CPFAH. Esses resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 - Análise das amostras de PM_{2,5} coletados antes (ambiente) e depois (concentrado) do CPFAH

Parâmetros	Ambiente			Concentrado			Razão de concentração
	N	média	DP	N	média	DP	
PM _{2,5}	51	16,34	12,16	53	211,08	119,83	13
Black Carbon	51	2,50	2,32	53	19,99	18,36	8
Mg	51	0,033	0,069	53	0,140	0,594	4
Al	51	0,113	0,223	53	2,330	3,593	21
Si	51	0,248	0,254	53	3,086	3,254	12
P	51	0,034	0,038	53	0,422	1,296	12
S	51	0,516	0,649	53	6,274	5,269	12
Cl	51	0,047	0,191	53	2,321	6,087	49
K	51	0,179	0,155	53	2,469	2,915	14
Ca	51	0,131	0,108	53	1,096	0,948	8
Ti	51	0,014	0,013	53	0,187	0,191	13
V	51	0,001	0,002	53	0,011	0,010	10
Cr	51	0,001	0,002	53	0,016	0,025	13
Mn	51	0,005	0,006	53	0,260	0,821	50
Fe	51	0,205	0,162	53	2,324	2,218	11
Ni	51	0,001	0,003	53	0,012	0,022	11
Cu	51	0,007	0,015	53	0,135	0,321	19
Zn	51	0,024	0,030	53	0,293	0,271	12
Se	51	0,001	0,001	53	0,005	0,009	7
Br	51	0,004	0,006	53	0,045	0,065	13
Pb	51	0,004	0,009	53	0,019	0,031	5

N= número de amostras, DP= desvio padrão, Média e DP em $\mu\text{g m}^{-3}$

Observa-se na Tabela 2 que as médias das concentrações encontradas no PM_{2,5} concentrado é maior do que as encontradas no PM_{2,5} ambiente. Para melhor visualização dos resultados, os valores calculados para a razão de concentração da Tabela 2 foram plotados no gráfico mostrado na Figura 11, no qual são apresentados somente as razões entre as concentrações médias encontradas nos filtros, amostrados antes e depois do CPFAH, para cada fator analisado.

Figura 11 - Razão entre as concentrações médias dos parâmetros determinados em amostras coletadas antes e depois do CPFAH

Na Figura 11 pode-se observar que os parâmetros estudados apresentam diferentes valores de razão entre as concentrações, principalmente, dos elementos Cl e Mn.

4.2 A composição química das partículas finas ambientais concentradas na cidade de São Paulo são diferentes entre as estações do ano

4.2.1 O PM_{2,5} encontrado na cidade de São Paulo apresenta maiores concentrações médias à noite – Experimento 1

Na Tabela 3 são exibidos os resultados das médias e desvios padrão correspondentes das concentrações de PM_{2,5}, Black Carbon (BC) e da composição elementar do PM_{2,5} coletados durante o experimento 1.

Tabela 3 - Análise das amostras de PM_{2,5} coletadas após o CPFAD em diferentes períodos durante o Experimento 1

Fatores	Períodos do Dia								
	Manhã			Tarde			Noite		
	N	média	DP	N	média	DP	N	média	DP
PM _{2,5}	11	148,41	131,19	11	180,75	66,28	11	255,75	179,35
Black Carbon	11	17,16	13,88	11	19,79	8,30	11	36,90	30,11
Mg	11	0,164	0,477	11	0,393	1,116	11	0,018	0,039
Al	11	0,872	1,172	11	3,406	2,208	11	2,476	3,314
Si	11	1,554	1,684	11	4,921	3,267	11	3,747	4,368
P	11	0,393	1,031	11	0,814	2,295	11	0,077	0,071
S	11	5,661	5,983	11	5,513	4,864	11	8,129	5,028
Cl	11	1,935	3,905	11	0,950	1,862	11	6,010	11,231
K	11	1,413	1,382	11	2,549	1,693	11	4,206	5,115
Ca	11	0,740	0,495	11	1,531	0,713	11	1,221	1,402
Ti	11	0,098	0,095	11	0,278	0,171	11	0,253	0,280
V	11	0,007	0,007	11	0,011	0,009	11	0,016	0,012
Cr	11	0,018	0,021	11	0,028	0,039	11	0,012	0,012
Mn	11	0,227	0,580	11	0,502	1,415	11	0,072	0,063
Fe	11	1,381	1,069	11	2,974	1,725	11	3,532	3,526
Ni	11	0,015	0,023	11	0,019	0,035	11	0,010	0,014
Cu	11	0,085	0,121	11	0,117	0,179	11	0,294	0,612
Zn	11	0,286	0,265	11	0,283	0,239	11	0,396	0,374
Se	11	0,010	0,014	11	0,005	0,009	11	0,002	0,004
Br	11	0,053	0,105	11	0,037	0,032	11	0,072	0,072
Pb	11	0,017	0,030	11	0,031	0,043	11	0,011	0,024

N = número de amostras, DP = desvio padrão, Média e DP em $\mu\text{g m}^{-3}$

Os dados da Tabela 3 foram plotados nos gráficos representados nas Figuras 12 e 13.

Figura 12 - Concentração média de PM_{2,5}, BC, Br, Cl, Cu, Fe, K, S, V e Zn obtidos em material particulado coletado em diferentes períodos durante o Experimento 1

Uma análise preliminar mostra que as mais altas concentrações médias de PM_{2,5}, BC e dos elementos Br, Cl, Cu, Fe, K, S, V e Zn são observadas nas amostras da Noite (Figura 12), enquanto nos elementos Al, Ca, Cr, Mg, Mn, Ni, P, Pb e Ti as mais altas concentrações médias foram observadas durante o período vespertino (Figura 13).

Figura 13 - Média das concentrações de Al, Ca, Cr, Mg, Mn, Ni, P, Pb, Si e Ti em material particulado coletado em diferentes períodos durante o Experimento 1

Por outro lado, análises estatísticas demonstraram que não há diferença significativa entre os resultados obtidos para amostras dos períodos Manhã e

Tarde. Por este motivo, as amostras dos períodos Manhã e Tarde foram consideradas como uma única amostra e designadas de Dia.

Na Tabela 4 são mostradas as médias das concentrações ($\mu\text{g m}^{-3}$) e desvios padrão correspondentes de $\text{PM}_{2,5}$, BC, e da composição elementar do $\text{PM}_{2,5}$ dos filtros coletados após o CPFAH nos períodos Dia e Noite durante o experimento 1.

Tabela 4 - Análise das amostras de $\text{PM}_{2,5}$ coletadas após o CPFAH nos períodos Dia e Noite durante o Experimento 1

Parâmetros	Períodos					
	Dia			Noite		
	N	média	DP	N	média	DP
$\text{PM}_{2,5}$	22	164,58	102,77	11	255,75	179,35
Black Carbon	22	18,47	11,24	11	36,90	30,11
Mg	22	0,279	0,846	11	0,018	0,039
Al	22	2,139	2,158	11	2,476	3,314
Si	22	3,238	3,066	11	3,747	4,368
P	22	0,604	1,749	11	0,077	0,071
S	22	5,587	5,321	11	8,129	5,028
Cl	22	1,442	3,027	11	6,010	11,231
K	22	1,981	1,617	11	4,206	5,115
Ca	22	1,135	0,723	11	1,221	1,402
Ti	22	0,188	0,163	11	0,253	0,280
V	22	0,009	0,008	11	0,016	0,012
Cr	22	0,023	0,031	11	0,012	0,012
Mn	22	0,364	1,064	11	0,072	0,063
Fe	22	2,177	1,620	11	3,532	3,526
Ni	22	0,017	0,029	11	0,010	0,014
Cu	22	0,101	0,150	11	0,294	0,612
Zn	22	0,284	0,246	11	0,396	0,374
Se	22	0,008	0,012	11	0,002	0,004
Br	22	0,045	0,076	11	0,072	0,072
Pb	22	0,024	0,037	11	0,011	0,024

N = número de amostras, DP = desvio padrão, Média e DP em $\mu\text{g m}^{-3}$

Para avaliar a correlação existente entre as concentrações dos elementos encontrados nas análises e suas possíveis fontes emissoras, foi realizada uma Análise de Componentes Principais (ACP) que permitiu agrupar os elementos em três fatores distintos, que explicam 86% da variabilidade dos dados do Experimento 1. A Tabela 5 mostra os três fatores determinados pela análise de componentes principais.

Tabela 5 - Fatores obtidos na análise de componentes principais

Parâmetros	Fatores		
	1	2	3
Black Carbon	0,789	0,360	0,342
Si	0,931	-0,058	-0,119
S	-0,040	-0,231	0,898
K	0,807	0,064	0,171
Ca	0,917	0,026	-0,069
Ti	0,979	-0,021	-0,019
V	0,289	0,513	0,667
Cr	0,136	0,930	-0,079
Fe	0,981	-0,022	0,127
Ni	-0,183	0,945	-0,020
Zn	0,715	0,003	0,381

Os componentes do Fator 1 são BC, Ca, Fe, K, Si, Ti e Zn, que podem ser considerados parâmetros característicos de emissões de tráfego em geral e da ressuspensão de solo. No Fator 2 estão os elementos Cr e Ni que podem ser característicos de emissões industriais, e no Fator 3 estão inclusos V e S que podem ser considerados elementos característicos da emissão de motores a diesel.

Para verificar as participações de cada um dos fatores dentro dos dois períodos estudados (Dia e Noite), foi construído um gráfico de barras para

representação dos erros dos coeficientes de regressão em relação aos períodos estudados (Figura 14).

Figura 14 - Apresenta a distribuição dos coeficientes de regressão para cada fator nos diferentes períodos estudados

Os dados apresentados identificam uma presença menor do Fator 2 e maior do Fator 3 no período noturno quando comparado os mesmos fatores com o período diurno. O Fator 1 tem presença similar em ambos períodos.

A análise univariada da variância corrigida para os 3 fatores encontrados na análise de componentes principais mostrou diferença significativa entre períodos somente para o Fator 3 apresentando $p=0,022$.

4.2.2 Na primavera, as concentrações de $PM_{2,5}$ da cidade de São Paulo não mostram variações entre os períodos – Experimento 2

Os resultados das médias e desvios padrão correspondentes das concentrações de $PM_{2,5}$, Black Carbon (BC) e da composição elementar do $PM_{2,5}$ coletados no Experimento 2 estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Análise das amostras de PM_{2,5} coletadas após o CPFAH nos períodos Manhã e Noite durante o Experimento 2

Parâmetros	Períodos					
	Manhã			Noite		
	N	Mean	DP	N	Mean	DP
PM _{2,5}	9	74,41	60,54	9	116,87	52,09
Black Carbon	9	8,11	6,43	9	17,26	8,11
Mg	9	0,001	0,003	9	0,017	0,038
Al	9	0,352	0,358	9	1,743	2,123
Si	9	1,054	0,812	9	3,338	3,300
P	9	0,170	0,100	9	0,661	1,299
S	9	5,165	5,840	9	5,191	4,631
Cl	9	0,249	0,164	9	0,659	0,800
K	9	1,078	0,639	9	2,317	1,601
Ca	9	0,468	0,310	9	1,248	1,115
Ti	9	0,080	0,054	9	0,149	0,172
V	9	0,006	0,008	9	0,007	0,004
Cr	9	0,001	0,001	9	0,018	0,024
Mn	9	0,023	0,014	9	0,492	1,020
Fe	9	1,116	0,749	9	1,812	1,563
Ni	9	0,001	0,003	9	0,006	0,007
Cu	9	0,031	0,034	9	0,071	0,055
Zn	9	0,136	0,133	9	0,246	0,199
Se	9	0,002	0,003	9	0,006	0,009
Br	9	0,018	0,010	9	0,023	0,025
Pb	9	0,020	0,028	9	0,017	0,016

N = número de amostras, DP = desvio padrão, Média e DP em $\mu\text{g m}^{-3}$

Os resultados obtidos das amostras de PM_{2,5} demonstraram que, apesar das diferenças observadas entre as concentrações médias dos parâmetros, não há diferença significativa das concentrações entre os períodos estudados no Experimento 2.

4.3 Testes Toxicológicos – As células meristemáticas das raízes de *Allium cepa* mostraram toxicidade quando encubadas com PM_{2,5}

Os testes toxicológicos foram realizados com PM_{2,5} dos filtros coletados após o CPFAH durante o período do Experimento 1. A eficiência de extração do PM_{2,5}

dos filtros foi de 70%, com concentração média de $23,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ para cada “pool” de solução dos períodos Manhã e Noite.

Na Tabela 7 são apresentados os resultados da frequência de micronúcleos das células meristemáticas após encubação com $\text{PM}_{2,5}$ por 48 horas, onde vimos que há diferença significativa ($p < 0,001$) entre os períodos Manhã e Noite.

Tabela 7 - Resultados da frequência de micronúcleos das células meristemáticas após encubação com $\text{PM}_{2,5}$ por 48 horas

Tratamentos	N	Média de MN	% de MN
Contr. Negativo	10	5	0,09
Contr. Positivo	10	11	0,32
Manhã	10	1	0,01
Noite	10	32	0,75

N= Número de lâminas, MN= Micronúcleos

Os resultados dos testes toxicológicos são apresentados no gráfico da Figura 15, mostrando que a maior toxicidade encontrada foi no período noturno quando comparada ao controle negativo e ao período da Manhã.

Figura 15 - Frequência de formação de micronúcleos em células meristemáticas de *Allium cepa* expostas ao $PM_{2,5}$ durante 48 horas

Os dados toxicológicos obtidos com as amostras de $PM_{2,5}$ coletadas a noite e o controle positivo são similares porém, diferentes ao controle negativo (branco) e às amostras coletadas durante a manhã (teste student-newman-keuls post hoc).

5. DISCUSSÃO

Nos dias de hoje as grandes cidades sofrem com os efeitos da poluição ar devido ao desenvolvimento tecnológico, que leva ao aumento na quantidade e variedade de poluentes emitidos.

A poluição atmosférica da cidade de São Paulo é, predominantemente, devido às emissões veiculares (Castanho e Artaxo, 2001; CETESB, 2002 e Ynoue e Andrade, 2004).

O CPFAH, ponto de relevância do estrudo deste trabalho, ficou estacionado no campus da Cidade Universitária, que é ladeada por grandes marginais e avenidas em São Paulo.

As vantagens tecnológicas da implementação do CPFAH são as de realizar estudos toxicológicos em animais respirando espontaneamente e de reduzir o tempo de exposição devido a possibilidade de concentrar o $PM_{2,5}$.

Vimos que a eficiência de concentração do CPFAH pode variar dependendo das condições atmosféricas. Provavelmente, por ser o CPFAH um conjunto de impactadores virtuais, com aberturas muito estreitas, a alta umidade relativa do ar pode causar entupimentos e reduzir sua eficiência.

Conforme esperávamos, as concentrações médias de $PM_{2,5}$ são mais elevadas no material particulado coletado no ar concentrado quando comparado àquele coletado no ar ambiente. A checagem desta eficiência foi positiva quando detectamos cerca de 15 vezes mais a presença dos elementos químicos no $PM_{2,5}$ concentrado quando comparado com $PM_{2,5}$ ambiente.

Pôde-se notar também que as razões entre as concentrações variam de elemento para elemento. Entendemos que estas variações podem ocorrer por diversos motivos: a contaminação das amostras durante o processamento das análises; a coleta das amostras de maneira não fracionada, onde não é possível saber se a composição do material particulado está relacionado com o tamanho das partículas; e as limitações decorrentes do método analítico utilizado.

A literatura é ampla em estudos sobre emissões geradas por veículos automotivos em relação ao $PM_{2,5}$, porém estes estudos feitos em diferentes países mostram que a variabilidade das condições climáticas locais alteram a composição e quantidade das partículas suspensas.

As altas concentrações de $PM_{2,5}$ e BC encontradas no período noturno durante o Outono em São Paulo diferem dos dados encontrados por Sánchez-Ccoyllo *et al.* (2009) para $PM_{2,5}$ e BC. Os autores detectaram esses parâmetros nos túneis da cidade de São Paulo, onde verificaram uma alta concentração de $PM_{2,5}$ e BC durante o período da manhã.

A divergência de resultados pode estar relacionada ao acúmulo de partículas durante o dia e a formação de partículas secundárias decorrentes das reações químicas e físicas que ocorrem na atmosfera. Ressaltamos que existe um grande potencial de influência das partículas secundárias na saúde humana (Venkatachari *et al.*, 2005, 2007; Cho *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2008; Verma *et al.*, 2009).

Convém lembrar que na cidade de São Paulo o tráfego mais intenso de caminhões pesados ocorre no período noturno devido as recentes leis municipais que permitem a circulação desses veículos somente no período entre 21:00h e 5:00h.

Dentro desta linha de fatos relatados, os nossos dados nos permitiram separar os elementos encontrados em três grupos distintos, que nós os identificamos como Fatores 1, 2 e 3. Entendemos que o Fator 1 pode ser interpretado como representante do tráfego geral, pois, de acordo com Monaci *et al.* (2000) e Figueiredo *et al.* (2007) o Fe e o Ca são considerados elementos resultantes das emissões de veículos ou ressuspensão do solo devido ao tráfego. Essas constatações vão ao encontro dos resultados do presente estudo.

Outros autores também mencionam o tráfego veicular como sendo fonte emissora de Zn (Viard *et al.*, 2004; Wannaz and Pignata, 2006). Segundo Guiguer (1996), Fe e Zn são componentes da gasolina, enquanto Querol *et al.* (2002) afirma que Ca, K, e Ti são componentes da crosta terrestre e podem ser ressuspensos pelo tráfego.

Estudos sobre poluentes realizados nas cidades de São Paulo (Figueiredo *et al.*, 2007) e Córdoba, Argentina (Carreras *et al.*, 2009), identificaram Ni e Cr como uma fonte significativa das emissões industriais. Este fato corrobora nossas constatações referentes ao Fator 2, uma vez que encontramos a presença dos mesmos elementos.

O Fator 3 relatado nos nossos dados é composto por S e V e podem ser considerados característicos das emissões de óleo combustível ou diesel.

Esses resultados estão de acordo com o demonstrado em 1999 por Wang e colaboradores que apontaram o V como um elemento característico da emissão por queima de óleo combustível.

Observamos que o Fator 3 está mais presente no período noturno, provavelmente devido ao acúmulo das partículas, formação de sulfato como resultado das reações atmosféricas e ao fato de existir um aumento significativo do tráfego de caminhões pesados no período noturno devido a leis de restrição de horário de circulação desses veículos.

As nossas análises feitas durante a primavera não mostram variações significativas durante os dois períodos. Como já relatamos as condições climáticas são fatores determinantes para a estabilidade funcional do CPF_{AH}.

Os nossos experimentos foram realizados no ano de 2009. Durante a última primavera, na cidade de São Paulo, houve alto índice pluviométrico, acarretando em uma redução do número de amostras válidas para a análise, uma vez que em dias de chuvas não é possível a realização das amostragens. Esses fatos podem ter levado ao resultado não significativo do Experimento 2.

A literatura mostra trabalhos feitos durante o verão, por ser quente e úmido, e o inverno por ser frio e seco. De acordo com Miranda *et al.* (2002), a concentração de aerossol é maior durante o inverno.

Para análise dos testes toxicológicos optamos bioensaio vegetal com células meristemáticas de *Allium cepa* devido ao alto grau de sensibilidade aos contaminantes ambientais (Caritá e Marin-Morales, 2008; Carvalho-Oliveira *et al.*, 2005; Chandra *et al.*, 2005; Smaka-Kincl *et al.*, 1996).

Esta metodologia permite determinar rapidamente a presença ou não de micronúcleos nas células. Vale lembrar que as raízes de plantas destinam-se a repousar no solo, cenário que contém microorganismos, o que torna fácil o uso direto de partículas ressuspensas.

Nossos resultados mostram que a porcentagem de micronúcleos em raízes de *A. cepa* expostas à partículas coletadas a noite é superior às expostas a partículas coletadas durante a manhã. Isso sugere que a toxicidade de PM_{2,5} é dependente dos marcadores de tráfego e das reações atmosféricas secundárias.

Esses dados vão ao encontro dos estudos realizados por Verma *et al.* (2009), que verificaram que as partículas secundárias em Los Angeles apresentavam maior toxicidade do que as partículas primárias.

Os resultados obtidos no bioensaio de mutagênese em plantas também estão coerentes com os dados dos trabalhos anteriormente realizados com partículas urbanas no LPAE sobre o potencial mutagênico das partículas urbanas (Athanasίου *et al.*, 1986; Carvalho-Oliveira *et al.*, 2005; Krishna *et al.*, 1984).

A literatura mostra resultados convincentes indicando que as alterações nas concentrações de partículas ambientais, em curtos períodos de tempo, podem induzir efeitos nocivos a saúde (Rich *et al.*, 2005; McCreanor *et al.*, 2007).

Considerando a variação da toxicidade causada pelas partículas nos períodos diurno e noturno, evidenciadas neste estudo, sugerimos o controle do período em estudos que tenham foco nos efeitos agudos do PM_{2,5} sobre na saúde humana.

6. CONCLUSÕES

Os nossos resultados nos permitem concluir que:

- O CPFAH é um instrumento de trabalho que permite realizar experimentos com animais respirando espontaneamente;
- O tempo de exposição ao $PM_{2,5}$ no CPFAH é reduzido;
- Há diferenças na composição elementar e na toxicidade do $PM_{2,5}$ coletados em diferentes períodos do dia;
- O $PM_{2,5}$ noturno é mais tóxico que o $PM_{2,5}$ coletado durante o dia;
- É importante considerar as mudanças nos padrões de tráfego da cidade de São Paulo;
- As reações atmosféricas são determinantes da toxicidade das partículas.

7. PROPOSIÇÕES

- Aprimorar o planejamento urbano, principalmente no que se refere às obras de grande impacto ambiental, por meio do desenho e/ou redesenho das cidades para uma perspectiva de cidades limpas do futuro. Os projetos de cidades limpas primam pela qualidade de vida e saúde pública, levando a menores custos hospitalares, securitários, e outros.
- Formar cidadãos, com a compreensão dos fenômenos biofísicos e bioquímicos, com conceitos éticos da biosfera em relação ao homem, meio ambiente e saúde.
- Divulgar melhor as pesquisas nas áreas de saúde e meio ambiente, pois com informação é possível planejar melhor o futuro.

8. REFERÊNCIAS

ABNT- Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 12979 Determination of sulfur dioxide by hydrogen peroxide method with indicator end-point detection – Method of test. Rio de Janeiro, ABNT, 1989.

Akinaga LM, Lichtenfels AJ, Carvalho-Oliveira R, Caldini EG, Dolhnikoff M, Silva LF, Bueno HM, Pereira LA, Saldiva PH, Garcia ML. Effects of chronic exposure to air pollution from Sao Paulo city on coronary of Swiss mice from birth to adulthood. *Toxicologic Pathology* 2009; 37(3):306-314.

Albuquerque E. Compostos orgânicos voláteis na atmosfera urbana da região metropolitana de São Paulo [tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas; 2007.

American Thoracic Society. What constitutes and adverse health effect of air pollution? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 2000; 161: 665-673.

Arantes-Costa FM, Lopes FD, Toledo AC, Magliarelli-Filho PA, Moriya HT, Carvalho-Oliveira R, Mauad T, Saldiva PH, Martins MA. Effects of residual oil fly ash (ROFA) in mice with chronic allergic pulmonary inflammation. *Toxicologic Pathology* 2008; 36(5):680-686.

Athanasίου K, Viras LG, Siskos PA. Mutagenicity and polycyclic aromatic hydrocarbons analysis of ambient airborne particles collected in Athens, Greece. *Science of Total Environment* 1986; 52: 201–219

Baird C. A química e a poluição do ar na troposfera. In *Química Ambiental*, Porto Alegre: Bookman, 2ª Edição 2002; Cap. 3; 107-191.

Bergamaschi L, Rizzio E, Giaveri G, Loppi S, Gallorini M. Comparison between the accumulation capacity of four lichen species transplanted to a urban site. *Environmental Pollution* 2007; 148(2):468-476.

Braga A, Pereira LAA, Saldiva PHN. Poluição Atmosférica e seus Efeitos na Saúde Humana In: Simpósio "Sustentabilidade na Geração e Uso de Energia no Brasil: os Próximos Vinte Anos; 2002; Campinas, BR. Campina: UNICAMP. Disponível em: <http://libdigi.unicamp.br/document/?code=1039>

Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, Luepker R, Mittleman M, Samet J, Smith Jr SC, Tager I. Air pollution and cardiovascular disease – A statement for healthcare professionals from the expert panel on population and prevention science of the American Heart Association. *Circulation* 2004; 109: 2655-2671.

Campbell A, Araujo JA, Li H, Sioutas C, Kleinman M. Particulate matter induced enhancement of inflammatory markers in the brains of apolipoprotein E knockout mice. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 2009; 9(8):5099-5104.

Caritá R, Marin-Morales MA. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. *Chemosphere* 2008; 72(5): 722-725.

Carreras HA, Wannaz ED, Pignata ML. Assessment of human health risk related to metals by the use of biomonitors in the province of Córdoba, Argentina. *Environmental Pollution* 2009; 157(1):117-122.

Carvalho-Oliveira R, Pozo RM, Lobo DJ, Lichtenfels AJ, Martins-Junior HA, Bustilho JO, Saiki M, Sato IM, Saldiva PH. Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in São Paulo, Brazil. *Environmental Research* 2005; 98(1):1-7.

Castanho ADA, Artaxo P. Wintertime and summertime São Paulo aerosol source apportionment study. *Atmospheric Environment* 2001; 35: 4889–4902.

Castro HA, Golveia N, Escamilla-Cejudo JA. Questões metodológicas para a investigação dos efeitos da poluição do ar na saúde. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 2003; 6 (2).

CETESB. Modelo Receptor-Estudo de Caracterização de Aerossóis na Região Metropolitana de São Paulo-Cerqueira César. São Paulo: CETESB, 2002. [citado 03 jul 2009]. Disponível em: <http://www.cetesbsp.gov.br/Ar/relatoriosasp>

CETESB. Relatório Anual de Qualidade do Ar no Estado de São Paulo 2004; CETESB-Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental 2005.

Chandra S, Chauhan LK, Murthy RC, Saxena PN, Pande PN, Gupta SK. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using *Allium* test. *Science of Total Environment* 2005; 347(1-3):46-52.

Cho AK, Sioutas C, Miguel AH, Kumagai Y, Schmitz DA, Singh M, Eiguren-Fernandez A, Froines JR. Redox activity of airborne particulate matter at different sites in the Los Angeles Basin. *Environmental Research* 2005; 99: 40–47.

Chu AKM, Cheng HH, Kwork RCW, Kwok RCW, Yu KN. Study of air pollutants in Hong Kong using energy dispersive X-ray fluorescence. *Applied Radiation Isotopes* 2003; 58: 333-338.

Clougherty JE, Kubzansky LD. A framework for examining social stress and susceptibility to air pollution in respiratory health. *Environmental Health Perspectives* 2009; 117(9):1351-1358.

Cordeiro DS. Estudos de aspectos do comportamento fotoquímico e eletroquímico de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo – Instituto de Química; 2006.

Fernícola, NAGG. Toxicologia Ambiental – Passado, presente e futuro 3º encontro técnico anual da ASEC - Associação dos Engenheiros da CETESB . São Paulo: ASEC; 2002. 9p.

Figueiredo AM, Nogueira CA, Saiki M, Milian FM, Domingos M. Assessment of atmospheric metallic pollution in the metropolitan region of São Paulo, Brazil, employing *Tillandsia usneoides* L as biomonitor. *Environmental Pollution* 2007; 145(1): 279-292.

Gari L. Arabic treatises on environmental pollution up to the end of the thirteenth century. *Environment and History* 2002; 8 (4): 475-488.

Guiguer N. Poluição das Águas Subterrâneas e do Solo Causada por Vazamentos em Postos de Abastecimento e Serviços. Editor Waterloo Hydrogeologic inc., USA 1996; 356p.

Jarup L. Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin* 2003; 68: 167-182.

Kampa M, Castanhas E. Human health effects of air pollution. *Environmental Pollution* 2008; 151: 362-367.

Kellner R, Mermet JM, Otto M, Widmer HM. *Analytical Chemistry*, Wiley-VCH, Toronto 1998.

Kemp DD. *Global environmental issues - A climatological approach*. Routledge 1994; 224 pp.

Kouassi KS, Billet S, Garçon G, Verdin A, Diouf A, Cazier F, Djaman J, Courcot D, Shirali P. Oxidative damage induced in A549 cells by physically and chemically characterized air particulate matter (PM_{2.5}) collected in Abidjan Côte d'Ivoire. *J Appl Toxicol* 2009; Nov 27 [Epub ahead of print]

Krishna G, Nath J, Ong T. Correlative genotoxicity studies of airborne particles in *Salmonella typhimurium* and cultured human lymphocytes. *Environmental Mutagens* 1984; 6 (4); 585–592.

Mariani RL, Jorge MPM, Pereira SS, Melione LP, Carvalho-Oliveira R, Ma TH, Saldiva PHN. Association between micronuclei frequency in pollen mother cells of *Tradescantia* and mortality due to cancer and cardiovascular diseases: A preliminary study in Sao José dos Campos, Brazil. *Environmental Pollution* 2009; 157(6):1767-1770.

McCreanor J, Cullinan P, Nieuwenhuijsen MJ, Stewart-Evans J, Malliarou E, Jarup L, Harrington R, Svartengren M, Han IK, Ohman-Strickland P, Chung KF, Zhang J. Respiratory effects of exposure to diesel traffic in persons with asthma. *New England Journal of Medicine* 2007; 357(23): 2395-2397.

Miranda RM, Andrade MF, Worobiec A, Grieken RV. Characterisation of aerosol particles in the São Paulo Metropolitan Area. *Atmospheric Environment* 2002; 36: 345–352

Monaci F, Moni F, Lanciotti E, Grechi D, Bargagli R. Biomonitoring of airborne metals in urban environments: new tracers of vehicle emission in place of lead. *Environmental Pollution* 2000; 107(3): 321-327.

Moraes ECF. Toxicologia na atualidade Estudo de problemas brasileiros, São Paulo: Universidade de São Paulo, 1978.

Noyes PD, McElwee MK, Miller HD, Clark BW, Tiem LAV, Walcott KC, Erwin KN, Levin ED. The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world. *Environment International* 2009; 35 (6):971-986.

Padhi BK, Padhy PK. Assessment of intra-urban variability in outdoor air quality and its health risks. *Inhalation Toxicology* 2008; 20(11):973-979.

Polichetti G, Cocco S, Spinali A, Trimarco V, Nunziata A. Effects of particulate matter (PM₁₀ PM₂₅ and PM₁) on the cardiovascular system. *Toxicology*, 2009; 261(1-2):1-8.

Pope CA III. Epidemiological basis for particulate air pollution health standards [Review]. *Aerosol Science and Technology* 2000a; 32: 4-14.

Pope CA III. Epidemiology of Fine Particulate Air Pollution and Human Health: Biologic Mechanisms and Who's at Risk? *Environ Health Perspect* 2000b; 108 (4): 713-723.

Pope CA III, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, Thurston GD. Lung cancer, cardiopulmonary mortality and long-term exposure to fine particulate air pollution. *Journal of the American Medical Association* 2002; 9: 1132-114.1

Pope CA III, Ezzati M, Dockery DW. Fine-particulate air pollution and life expectancy in the United States. *New England Journal of Medicine* 2009; 360(4): 376-386.

Querol X, Alastuey A, Rosa J, Campa A, Plana F, Ruiz CR. Source apportionment analysis of atmospheric particulates in an industrialised urban site in southwestern Spain. *Atmospheric Environment* 2002; 36: 3113–3125.

Rich DQ, Schwartz J, Mittleman MA, Link M, Luttmann-Gibson H, Catalano J, Speizer FE, Dockery DW. Association of Short-term Ambient Air Pollution Concentrations and Ventricular Arrhythmias. *American Journal of Epidemiology* 2005; 161(12): 1123-1132.

Richardson DHS, Shore M, Richardson, RM. The use of x ray fluorescence spectrometry for the analysis of plants, especially lichens, employed in biological monitoring. *Science of the Total Environment* 1995; 175: 97-105.

Saldiva PHN. Análise dos efeitos do Programa de Controle de Emissões Veiculares – Proconve – sobre indicadores de mortalidade na Região Metropolitana de São Paulo 2006.

Saldiva PHN. Projeto submetido ao Conselho Científico e Tecnológico (CNPq) do Ministério da Ciência e Tecnologia (MCT) para desenvolvimento de Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia no processo aberto através do Edital Nº 15/2008 – MCT/CNPq/FNDCT/CAPES/FAPEMIG/FAPERJ/FAPESP; 2008.

Samet JM, Dominici F, Currier FC, Coursac I, Zeger SL. Fine particulate air pollution and mortality in 20 United States cities 1987-1994. *New England Journal of Medicine* 2000; 343(24):1742-1749.

Sánchez-Ccoyllo OR, Ynoue RY, Martins LD, Astolfo R, Miranda RM, Freitas ED, Borges AS, Fornaro A, Freitas H, Moreira A, Andrade MF. Vehicular particulate matter emissions in road tunnels in São Paulo Brazil. *Environmental Monitoring Assessment* 2009; 149:241–249.

Silva MF. Emissões de metais por veículos automotores e seus efeitos à saúde pública [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo 2007.

Simkhovich BZ, Kleinman MT, Kloner RA. Air Pollution and Cardiovascular Injury: Epidemiology, Toxicology, and Mechanisms. *Journal of the American College of Cardiology* 2008; 52 (9):719-726.

Sioutas C, Koutrakis P, Ferguson ST. Development and evaluation of a prototype ambient particle concentrator for inhalation exposure studies. *Inhalation Toxicology* 1995; 7: 633-644.

Sioutas C, Koutrakis P, Godleski JJ, Ferguson ST, Kim CS, Burton RM. Fine particles concentrators for inhalation exposures – Effect of particle size and composition. *Journal of Aerosol Science* 1997; 28: 1057-1071.

Smaka-Kincl V, Stegnar P, Lovka M, Toman MJ. The evaluation of waste, surface and ground water quality using the Allium test procedure. *Mutation Research* 1996; 368(3-4): 171-9.

Stephens WE, Calder A. Analysis of non-organic elements in plant foliage using polarised X-ray fluorescence spectrometry. *Analitica Chimica Acta* 2004; 527: 89-96.

Venkatachari P, Hopke PK, Brune WH, Ren X, Leshner R, Mao J, Mitchell M. Characterization of wintertime reactive oxygen species concentrations in flushing New York. *Aerosol Science Technology* 2007; 41: 179-201.

Venkatachari P, Hopke PK, Grover BD, Eatough DJ. Measurement of particle-bound reactive oxygen species in rubidoux aerosols. *Journal of Atmospheric Chemistry*, 2005; 50: 49-58.

Verma V, Ning Z, Cho AK, Schauer JJ, Shafer MM, Sioutas C. Redox activity of urban quasi-ultrafine particles from primary and secondary sources. *Atmospheric Environment* 2009; 43: 6360-6368.

Viard B, Pihan F, Promeyrat S, Pihan JC. Integrated assessment of heavy metal (Pb, Zn, Cd) highway pollution: bioaccumulation in soil, Gramineae and land snails. *Chemosphere* 2004; 10 (55): 1349-1359.

Wang CF, Chang CY, Chin CJ, Men LC. Determination of arsenic and vanadium in airborne related reference materials by inductively coupled plasma–mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 1999; 392 (2-3): 299-306.

Wannaz ED, Pignata ML. Calibration of Four Species of Tillandsia as Air Pollution Biomonitors. *Journal of Atmospheric Chemistry* 2006; 53(3): 185-209.

Ynoue RY, Andrade MF. Characteristics of Urban Aerosols: Size-resolved mass balance of aerosol particles over the São Paulo metropolitan area of Brazil. *Aerosol Science and Technology* 2004; 38: 52–62.

Zhang YX, Schauer JJ, Shafer MM, Hannigan MP, Dutton SJ. Source apportionment of in vitro reactive oxygen species bioassay activity from atmospheric particulate matter. *Environmental Science & Technology* 2008; 42 (19): 7502–7509.