JÔSE MÁRA DE BRITO

**Toxicidade cardiovascular e inflamatória aguda
induzida pela inalação de partículas dos
combustíveis diesel e biodiesel**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profa. Dra. Dolores Helena Rodriguez
Ferreira Rivero

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

Brito, Jôse Mára de

Toxicidade cardiovascular e inflamatória aguda induzida pela inalação de partículas dos combustíveis diesel e biodiesel / Jôse Mára de Brito. -- São Paulo, 2009.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental.

Orientadora: Dolores Helena Rodriguez Ferreira Rivero.

Descritores: 1.Diesel 2.Biodiesel 3.Emissões de veículos 4.Poluentes do ar 5.Inflamação 6.Sistema cardiovascular

USP/FM/SBD-478/09

Ora há diversidade de dons, mas o Espírito é o mesmo.

E há diversidade de ministérios, mas o Senhor é o mesmo.

E há diversidade de cooperações, mas é o mesmo Deus que opera tudo em todos.

Mas a manifestação do Espírito é dada a cada um, para o que for útil.

Porque a um pelo Espírito é dada a palavra da sabedoria; e a outro, pelo mesmo Espírito, a palavra da ciência;

E a outro, pelo mesmo Espírito, a fé; e a outro, pelo mesmo Espírito, os dons de curar;

E a outro a operação de maravilhas; e a outro a profecia; e a outro o dom de discernir os espíritos; e a outro a variedade de línguas; e a outro a interpretação das línguas.

Mas um só e o mesmo Espírito operam todas estas coisas, repartindo particularmente a cada um como quer.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora. Prof^a. Dr^a. Dolores Helena Rodriguez Ferreira Rivero, minha máxima gratidão por seu apoio incondicional, estímulo, paciência e, principalmente, pela amizade com que guiou este trabalho.

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva, por ter me proporcionado o desenvolvimento deste trabalho, deixo a minha profunda gratidão por sua generosidade, inteligência e criatividade sem os quais nada teria sido possível.

Ao Prof. Dr. Paulo Afonso de Andre, por seu empenho no planejamento e desenvolvimento da câmara de intoxicação, na qual, sem a sua ajuda não seria possível o desenvolvimento desse trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Mary Marchi, pelo seu auxílio na amostragem do MP, bem como, as análises dos HPAs que foram de extrema importância para a interpretação dos resultados desse trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Leila Antonangelo, por ter me aberto as portas do Laboratório de Hematologia e Citologia da Divisão do Laboratório Central, HC FMUSP, minha gratidão.

A Bióloga Dr^a. Ana Júlia de Faria Coimbra Lichtenselfs, por ter me auxiliado na montagem do sistema de intoxicação de partículas dos combustíveis diesel e biodiesel.

Ao grupo de colaboradores da técnica do Laboratório de Anatomia Patológica, pela confecção dos cortes e lâminas para o estudo anátomo-patológico.

Ao Dr. Afonso e a sua equipe (David, Ivandir) por terem auxiliado nos cuidados dos animais no biotério.

As secretárias do Departamento de Fisiopatologia Experimental, Sra Tânia e Sônia, pela amizade e ajuda com os processos burocráticos.

As secretárias do Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental, Sra. Márcia e Dalva, pela amizade e ajuda com os processos burocráticos.

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

A Kelly, Adair, Luciano, Mariana, amigos e irmãos adquiridos durante o desenvolvimento deste trabalho.

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de símbolos

Lista de quadros

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Poluição atmosférica, classificação e níveis recomendados na região metropolitana de São Paulo	3
1.2	Revisão dos poluentes atmosféricos	7
1.2.1	Material particulado	7
1.2.2	Monóxido de carbono	8
1.2.3	Óxidos de nitrogênio	9
1.2.4	Óxidos de enxofre	9
1.2.5	Ozônio	10
1.2.6	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	11
1.2.7	Compostos orgânicos voláteis	14
1.3	Combustíveis diesel e biodiesel	16
1.4	Considerações das emissões veiculares dos combustíveis diesel e biodiesel	19
1.5	Efeitos adversos causados pelos poluentes atmosféricos no sistema cardiopulmonar	23
2	OBJETIVO	31
2.1	Objetivos específicos	31
3	MÉTODOS	32
3.1	Combustíveis	32
3.2	Gerador de partículas finas dos combustíveis diesel e biodiesel	34
3.3	Caracterização do material particulado (MP _{2,5}): gravimetria, refletância e espectrometria de fluorescência de raio-X (FRX)	37
3.4	Análise dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	38

3.5	Análise dos Compostos Orgânicos Voláteis	40
3.6	Animais	42
3.7	Registro da frequência cardíaca, variabilidade da frequência cardíaca e pressão arterial	43
3.8	Coleta e análise laboratorial dos parâmetros hematológicos e dos fatores de coagulação	43
3.9	Coleta e análise do lavado broncoalveolar	44
3.10	Coleta e análise da medula óssea	46
3.11	Coleta e análise histológica pulmonar.....	47
3.12	Análise estatística.....	47
4	RESULTADOS.....	49
4.1	Análise dos parâmetros de exposição em tempo real	49
4.2	Análise dos filtros por gravimetria e refletância.....	50
4.3	Análise da composição elementar por fluorescência de raio-X (FRX) 52	
4.4	Análise dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos.....	54
4.5	Análise dos compostos orgânicos voláteis (COVs)	59
4.6	Análise da frequência cardíaca, variabilidade da frequência cardíaca, pressão arterial	65
4.7	Análise dos parâmetros hematológicos, fatores de coagulação e da medula óssea	71
4.8	Análise inflamatória pulmonar pelo lavado broncoalveolar e histologia pulmonar	76
5	DISCUSSÃO.....	81
6	CONCLUSÃO.....	94
7	REFERÊNCIAS.....	96

Apêndice

Lista de quadros

Quadro 1. Padrões nacionais de qualidade do ar.....	5
Quadro 2. Níveis máximos permitidos para os poluentes atmosféricos recomendados pela Organização Mundial de Saúde.....	6
Quadro 3. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos classificados de acordo com a sua estrutura e efeito.....	13
Quadro 4. Padrões de exposição ocupacional para os BTEX.....	15
Quadro 5. Fatores de emissão de motores para veículos pesados do ciclo Diesel.....	17
Quadro 6. Emissões de carbonilas nos combustíveis B2, B5, B10 e B20...	22
Quadro 7. Fator de equivalência tóxico e os modelos matemáticos de estimativa de risco.....	91

Lista de Figuras

Figura 1.	Emissões relativas de poluentes por fontes emissoras.	4
Figura 2.	Classificação dos compostos orgânicos voláteis.	14
Figura 3.	Processo de obtenção do Biodiesel.....	19
Figura 4.	Compostos presentes na queima de veículos a diesel na fase gás e sólida.	20
Figura 5.	Porcentagem de alteração nas emissões das diferentes concentrações de biodiesel.....	21
Figura 6.	Gerador de partículas do material da queima dos combustíveis diesel e biodiesel.....	35
Figura 7.	Câmara de Neubauer: locais de contagem dos leucócitos	45
Figura 8.	Média da concentração de fuligem e massa amostradas nos filtros com ar filtrado (controle), diesel, B50 e B100.....	51
Figura 9.	Média da concentração dos compostos elementares do MP _{2,5} amostrados nos filtros com ar filtrado (controle), diesel, B50 e B100	54
Figura 10.	Média das concentrações de HPAs totais amostrados nos filtros de ar filtrado (controle), diesel, B50 e B100	55
Figura 11.	Média das concentrações de FLR e FEN amostrados nos filtros de ar filtrado (controle), diesel, B50 e B100.	56
Figura 12.	Média das concentrações de BghiP, BeP, CRY e BaA amostrados nos filtros de ar filtrado (controle), diesel, B50 e B100	56
Figura 13.	Média das concentrações de DahA, PYR, NAF e BeACY amostrados nos filtros de ar filtrado (controle), diesel, B50 e B100	57
Figura 14.	Média das concentrações de ANT, BkF, BaP e ACE amostrados nos filtros de ar filtrado (controle), diesel, B50 e B100	57

Figura 15. Valores pontuais da concentração total dos COVs amostrados nos gases oriundos da emissão do ar filtrado (controle) e dos combustíveis diesel, B100 e B50	59
Figura 16. Concentração pontual dos COVs (aromáticos, alcanos, alcenos e alcadienos) amostrados nos gases oriundos do ar filtrado (controle) e da queima dos combustíveis diesel, B100 e B50	64
Figura 17. Erro padrão da média dos valores da variação de VFC (SDNN, RMSSD, BF, AF, BF/AF) e da FC em relação aos tempos 30 e 60 minutos para os grupos expostos na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100).....	70
Figura 18. Erro padrão da média dos parâmetros hematológicos para os grupos expostos na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100).....	72
Figura 19. Erro padrão da média dos parâmetros do mielograma para os grupos expostos na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100).....	73
Figura 20. Erro padrão da média dos parâmetros inflamatórios do LBA para os grupos expostos na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100).....	77
Figura 21. Erro padrão da média dos parâmetros inflamatórios mensurados no parênquima pulmonar para os grupos expostos na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100)	79
Figura 22. Efeitos gerados no sistema pulmonar e cardíaco dos camundongos Balb/c	84
Figura 23. Emissões médias dos combustíveis B50 e B100 comparadas ao combustível diesel	87

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Propriedades físicas do óleo vegetal éster etílico de soja degomado (biodiesel)	33
Tabela 2.	Propriedades físicas do óleo diesel	34
Tabela 3.	Programa de comprimento de onda para HPLC por detector de fluorescência para análise de HPAs	39
Tabela 4.	Valores descritivos dos parâmetros mensurados em tempo real (MP, CO, temperatura, umidade e ruído) de cada grupo exposto na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100). Os valores estão apresentados como média, desvio padrão, mínimo e máximo	50
Tabela 5.	Valores descritivos dos parâmetros mensurados nos filtros: massa e fuligem. Os valores estão apresentados como média, desvio padrão, mínimo e máximo	52
Tabela 6.	Valores descritivos da composição elementar dos componentes inorgânicos. Os valores estão apresentados como média e desvio padrão	53
Tabela 7.	Valores descritivos dos HPAs. Os valores estão apresentados como valores mínimos e máximos	58
Tabela 8.	Valores Pontuais dos COVs mensurados nas amostras dos gases oriundos da emissão do ar filtrado e dos combustíveis diesel, B50 e B100	60
Tabela 9.	Valores descritivos absolutos da VFC (SDNN, RMSSD, BF, AF, BF/AF), FC e PA de cada grupo exposto na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100). Os valores estão apresentados como média, desvio padrão, mínimo e máximo ..	66
Tabela 10.	Valores descritivos da variação de VFC, FC e PA em relação aos tempos 30 e 60 minutos para os grupos expostos na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100). Os valores estão apresentados como média, desvio padrão, mínimo e máximo.....	68

Tabela 11. Valores descritivos dos parâmetros de coagulação de cada grupo exposto na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100). Os valores estão apresentados como média, desvio padrão, mínimo e máximo	74
Tabela 12. Valores descritivos da série vermelha e branca do hemograma de cada grupo exposto na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100). Os valores estão apresentados como média, desvio padrão, mínimo e máximo ..	75
Tabela 13. Valores descritivos dos parâmetros do mielograma de cada grupo exposto na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100). Os valores estão apresentados como média, desvio padrão, mínimo e máximo	76
Tabela 14. Valores descritivos dos parâmetros inflamatórios do LBA para os grupos expostos na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100). Os valores estão apresentados como média, desvio padrão, mínimo e máximo	78
Tabela 15. Valores descritivos em Log10 dos parâmetros inflamatórios do LBA para os grupos expostos na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100). Os valores estão apresentados como média, desvio padrão, mínimo e máximo ..	78
Tabela 16. Valores descritivos dos parâmetros inflamatórios mensurados no parênquima pulmonar para os grupos expostos na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100). Os valores estão apresentados como média, desvio padrão, mínimo e máximo	80

Lista de Abreviaturas e Siglas

FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
LP AE	Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental
LQA	Laboratório de Química Atmosférica
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
PROCONVE	Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos automotores
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DENATRAN	Departamento Nacional de Trânsito
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
RMSP	Região metropolitana de São Paulo
OMS	Organização Mundial de Saúde
EPA	Agência de Proteção Ambiental
ANP	Agência Nacional do Petróleo
IARC	International Agency for Research on Cancer
IPCS	International Programme on Chemical Safety
FRX	Fluorescência de raio-x
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
PBS	Tampão fosfato-salino
B2	2% de biodiesel acrescido de 98% de diesel
B5	5% de biodiesel acrescido de 95% de diesel
B10	10% de biodiesel acrescido de 90% de diesel
B20	20% de biodiesel acrescido de 80% de diesel
B50	50% de biodiesel acrescido de 50% de diesel
B100	100% de biodiesel

PTS	Partículas totais em suspensão
MP	Material particulado
MP _{0,1}	Material particulado com diâmetro inferior a 0,1 µm
MP _{2,5}	Material particulado com diâmetro inferior a 2,5 µm
MP ₁₀	Material particulado com diâmetro inferior a 10 µm
CO	Monóxido de carbono
CO ₂	Dióxido de carbono
NO	Óxido nítrico
NO _x	Óxidos de nitrogênio
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
N ₂ O	Óxido nitroso
N ₂ O ₃	Trióxido de nitrogênio
N ₂ O ₄	Tetróxido de nitrogênio
N ₂ O ₅	Pentóxido de nitrogênio
HNO ₃	Ácido nítrico
SO _x	Óxidos de enxofre
SO ₂	Dióxido de enxofre
H ₂ SO ₃	Ácido sulfuroso
SO ₃	Trióxido de enxofre
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
O ₃	Ozônio
N ₂	Nitrogênio
O ₂	Oxigênio
OH	Radical hidroxila
HCL	Ácido clorídrico
NaOH	Hidróxido de sódio
HC	Hidrocarbonetos
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

COVs	Compostos orgânicos voláteis
HEX	n-hexano
ACT	Acetona
ACN	Acetonitrila
FEN	Fenantreno
ANT	Antraceno
FLR	Fluoranteno
PYR	Pireno
BaA	Benzo[a]antraceno
CRY	Criseno
BkF	Benzo[k]fluoranteno
BaP	Benzo[a]pireno
BeP	Benzo[e]pireno
DahA	Dibenzo[a,h]antraceno
BeAcf	Benzo[e]acefenantrileno
BghiP	Benzo[g,h,i]perileno
IND	Indeno[1,2,3-cd]pireno
BkF	Benzo[k]fluoranteno
BghiP	Benzo[g,h,i]perileno
Mg	Magnésio
Al	Alumínio
Si	Silício
P	Fósforo
S	Enxofre
Cl	Cloro
K	Potássio
Ca	Cálcio
Ti	Titânio

V	Vanádio
Cr	Cromo
Mn	Manganês
Fe	Ferro
Ni	Níquel
Cu	Cobre
Zn	Zinco
Se	Selênio
Br	Bromo
Pb	Chumbo
VFC	Variabilidade da frequência cardíaca
FC	Frequência cardíaca
PA	Pressão arterial
SDNN	Desvio padrão de todos os intervalos RR normais
SDNNi	Média dos desvios padrões dos intervalos RR normais calculados em intervalos de 5 minutos
RMSSD	Raiz quadrada da soma das diferenças sucessivas entre intervalos RR normais adjacentes ao quadrado
pNN50	Percentual dos intervalos RR normais que diferem mais que 50 milissegundos de seu adjacente
AF	Alta frequência
BF	Baixa frequência
BF/AF	Proporção da baixa frequência pela alta frequência
TP	Tempo de protrombina
TT	Tempo de trombina
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativada
COHb	Carboxihemoglobina
LBA	Lavado broncoalveolar

Lista de Símbolos

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

Resumo

Brito JM. *Toxicidade cardiovascular e inflamatória aguda induzida pela inalação de partículas dos combustíveis diesel e biodiesel* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 108p.

Introdução: A análise das emissões dos combustíveis é de crucial importância para o entendimento da patogênese da morbi-mortalidade ocasionada pela poluição do ar. **Objetivos:** Analisar as emissões do combustível diesel e biodiesel (B50 e B100) sobre a toxicidade cardiovascular. **Métodos:** Camundongos Balb/C foram expostos a queima do diesel e/ou biodiesel durante uma hora. Os registros da frequência cardíaca (FC), variabilidade da frequência cardíaca (VFC) e da pressão arterial (PA) foram obtidas no tempo pré, 30 e 60 minutos após a exposição. Após 24 horas foram coletados o LBA, o sangue e a medula óssea para avaliar a inflamação pulmonar e sistêmica. **Resultados:** A queima do B100 reduziu as emissões da massa, fuligem, metais, CO, HPAs comparado as emissões do diesel e B50; ECG: RMSSD aumentou no grupo diesel ($p < 0.05$) comparado ao grupo controle, a BF aumentou no grupo diesel ($p < 0.01$) e B100 ($p < 0.05$) comparado ao grupo controle, a FC aumentou no grupo B100 ($p < 0.05$) comparado ao controle; sangue: o VCM aumentou no grupo B100 comparado aos grupos diesel ($p < 0.01$), B50 e controle ($p < 0.001$), o CHCM diminuiu no grupo B100 comparado aos grupos B50 ($p < 0.001$) e controle ($p < 0.05$), leucócitos aumentaram no grupo B50 comparado ao grupo diesel ($p < 0.05$), as plaquetas aumentaram no grupo B100 comparado aos grupos diesel e controle ($p < 0.05$), os reticulócitos aumentaram no grupo B50 comparado aos grupos diesel, controle ($p < 0.01$) e B100 ($p < 0.05$); medula óssea: os metamielócitos aumentaram nos grupos B50 e B100 comparado ao grupo diesel ($p < 0.05$); BAL: os neutrófilos aumentaram no grupo diesel e B50 comparado ao grupo controle ($p < 0.05$), os macrófagos aumentaram no grupo diesel ($p < 0.01$), B50 e B100 ($p < 0.05$) comparado ao grupo controle. **Conclusão:** O combustível biodiesel demonstrou ser tão tóxico quanto o diesel, promovendo um desequilíbrio no sistema nervoso autônomo, inflamação pulmonar e sistêmica.

Descritores: 1.Diesel 2.Biodiesel 3.Emissões de veículos 4.Poluentes do ar 5.Sistema cardiovascular 6.Inflamação

Summary

Brito JM. *Acute cardiovascular and inflammatory toxicity induced by particles inhalation from diesel and biodiesel fuels* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009. 108p.

Background: Analysis of fuels emissions is crucial for understanding the pathogenesis of mortality due air pollution. Objectives: To assess cardiovascular toxicity of diesel and biodiesel (50 and 100%) particles. Methods: Mice were exposed to diesel or biodiesel during one hour, heart rate (HR), heart rate variability (HRV) and blood pressure (BP) were obtained immediately before, 30 and 60 minutes after exposure. After 24 hours: BAL, blood and bone marrow to evaluated inflammation were collected. Results: B100 decrease the emissions of mass, BC, inorganic, CO, PAHs and VOCs compared to B50 and diesel. ECG: RMSSD increased on diesel ($p < 0.05$) compared to control group; LF increased on diesel ($p < 0.01$) and B100 ($p < 0.05$) compared to control group; FC increased on B100 ($p < 0.05$) compared to control group. Blood: MCV increased on B100 compared to diesel ($p < 0.01$), B50 and control groups ($p < 0.001$), MCHC decreased on B100 compared to B50 ($p < 0.001$) and control groups ($p < 0.05$). Leucocytes increased on B50 compared to diesel group ($p < 0.05$); platelets increased on B100 compared to diesel and control groups ($p < 0.05$); reticulocytes increased on B50 compared to diesel, control ($p < 0.01$) and B100 groups ($p < 0.05$); Metamyelocytes increased on B50 and B100 compared to diesel group ($p < 0.05$); BAL: Neutrophils increased on diesel and B50 compared to control group ($p < 0.05$); macrophages increased on diesel ($p < 0.01$), B50 and B100 ($p < 0.05$) compared to control group. Conclusions: Biodiesel was more toxic than diesel because promoted pulmonary inflammation, bone marrow activation, increase of platelets and imbalance of the autonomic nervous system.

Descriptors: 1.Diesel 2.Biodiesel 3.Vehicle emissions 4.Air pollutants 5.Cardiovascular system 6.Inflammation

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a palavra meio ambiente tornou-se tema freqüente em revistas, noticiários, eventos artísticos, livros, filmes, documentários, etc. Porém, o interesse pelo assunto não se refere apenas a um novo nível de conscientização. A questão central é de que o planeta começou a apresentar inúmeros problemas em resposta às agressões que vem recebendo.

Os sinais de alerta tornam-se cada vez mais evidentes, como: o efeito estufa, o aquecimento global, a chuva ácida, o derretimento das geleiras, a crise de água, a destruição da biodiversidade, o consumo desequilibrado, a poluição do ar e o aumento da desertificação. Como consequência, os seres vivos estão susceptíveis a sofrer alterações nos sistemas biológicos (ex.: cardiovascular, pulmonar, reprodutivo, endócrino, etc.).

O Brasil é o 5º País do mundo com cerca de 193.733.795 milhões de habitantes, sendo o estado de São Paulo como a unidade de federação com o maior contingente populacional (41 milhões de habitantes) compreendido em uma área de 249.000 km² (2,9% do território nacional). Possui a maior frota automotiva, com aproximadamente 18,3 milhões de veículos automotores, nos quais, 13,7 milhões de veículos do ciclo Otto, 1,1 milhões veículos a diesel e 3,5 milhões motocicletas (CETESB, 2008).

A cidade de São Paulo compreende uma área de 1.523 km², possui um contingente populacional de 10.886.518,41 milhões de habitantes, e possui uma frota automotiva de 5.461.915 milhões de veículos (4.251.685 milhões de veículos do ciclo Otto, 531.897 mil veículos a diesel e 678.333 mil motos) (DENATRAN, 2008; IBGE, 2009). Por sua localização, a cidade de São Paulo sofre influência tanto da circulação terra-mar, quanto do aquecimento continental. A maior ocorrência de inversões térmicas, alta porcentagem de calmaria, ventos fracos e baixos índices pluviométricos ocorrem entre os meses de maio a setembro (outono e inverno) (CETESB, 2008; IBGE, 2009).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a poluição atmosférica tem sido associada como causadora de efeitos à saúde e estima-se a ocorrência de cerca de 2 milhões de mortes prematuras por ano, no mundo (OMS, 2005). Um dos grandes agentes contribuidores na emissão de poluentes atmosféricos, são os veículos automotores a diesel responsáveis em lançar na atmosfera substâncias tóxicas, carcinogênicas e mutagênicas (Bunger, 2007). Com o intuito de reduzir a emissão dos compostos que causam danos à saúde na atmosfera, vários estudos tem preconizado a substituição de combustíveis fósseis por fontes renováveis de energia, como os biocombustíveis.

1.1 Poluição atmosférica, classificação e níveis recomendados na região metropolitana de São Paulo

A poluição do ar consiste em uma mistura de partículas sólidas e líquidas suspensas no ar, que variam em forma, composição e origem. Com relação a sua origem, os poluentes do ar podem ser classificados como: primários (emitidos diretamente pelas fontes de emissão) e secundários (formados na atmosfera através da reação química entre poluentes e/ou constituintes naturais na atmosfera) (CETESB, 2008).

DENATRAN (1980) definiu a poluição atmosférica como:

“Mudança indesejável e muitas vezes irreversível nas características físicas, químicas ou biológicas do ar atmosférico, que pode afetar perniciosamente o equilíbrio do sistema ecológico com interferência na vida do homem, dos animais e dos vegetais; deterioração dos bens culturais e de lazer; inutilização ou depreciação dos recursos naturais”.

De acordo com as estimativas da CETESB (2008), a região metropolitana de São Paulo é responsável em emitir na atmosfera cerca de 1,56 milhões de t/ano de monóxido de carbono (CO), 387 mil t/ano de hidrocarbonetos (HC), 367 mil t/ano de óxidos de nitrogênio (NO_x), 62,3 mil t/ano de material particulado (MP) e 25,5 mil t/ano de óxidos de enxofre

(SO_x). A frota automotiva é um dos principais agentes poluidores, sendo responsáveis por 98% das emissões de CO, 97% de HC, 96% de NO, 40% de MP e 33% de SO_x (Figura 1).

Figura 1. Emissões relativas de poluentes por fontes emissoras. Fonte: CETESB, 2008

Através da Portaria Normativa nº 348 de 14/03/90, o IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis) estabeleceu os padrões nacionais de qualidade do ar primário e secundário que em seguida foram transformados na Resolução CONAMA nº 03/90 e os poluentes classificados de acordo com os padrões de qualidade do ar primário e secundário foram: partículas totais em suspensão (PTS), fumaça,

MP, CO, SO₂ (dióxido de enxofre), ozônio (O₃) e dióxido de nitrogênio (NO₂), como descrito no Quadro 1 (CONAMA, 1990).

Quadro 1. Padrões nacionais de qualidade do ar. Fonte: CONAMA, 1990

Poluente	Período de Tempo	Padrão Primário (µm/m³)	Padrão Secundário (µm/m³)
PTS	24 horas	240	150
	Média anual	80	60
MP	24 horas	150	150
	Média anual	50	50
Fumaça	24 horas	150	100
	Média anual	60	40
SO ₂	24 horas	365	100
	Média anual	80	40
NO ₂	1 hora	320	190
	Média anual	100	100
CO	1 hora	35 ppm	35 ppm
	8 horas	9 ppm	9 ppm
O ₃	1 hora	160	160

Em 2005, a OMS revisou os padrões de qualidade do ar dos poluentes atmosféricos (CO, SO₂, O₃, NO₂) e pela primeira vez definiu um valor máximo para o MP₁₀ (material particulado ≤ 10 µm) e MP_{2,5} (material particulado ≤ 2,5 µm) (Quadro 2).

Quadro 2. Níveis máximos permitidos para os poluentes atmosféricos recomendados pela Organização Mundial de Saúde. Fonte: OMS, 2005

Poluente	Período de Tempo	Concentração ($\mu\text{m}/\text{m}^3$)
SO ₂	24 horas	20
NO ₂	1 hora	200
	Média anual	40
CO	Média anual	10.000
O ₃	8 horas	100
MP _{2,5}	24 horas	25
	Média anual	10
MP ₁₀	24 horas	50
	Média anual	20

Alguns poluentes atmosféricos regulamentados vêm decrescendo ao longo dos anos na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), como descrito pela CETESB (2008), em uma revisão sistemática realizada durante o período de 1998 a 2008. Atualmente, os níveis de SO₂ encontram-se na faixa de 10 $\mu\text{m}/\text{m}^3$, valores abaixo do padrão anual secundário de qualidade do ar, de 40 $\mu\text{m}/\text{m}^3$. A média das concentrações máximas de CO em 8 horas vem se mantendo estável nos últimos quatro anos, com uma média de CO em 2 ppm, níveis abaixo das máximas anuais das médias móveis de 8 horas de CO do padrão primário e secundário de qualidade do ar, de 9 ppm. Houve uma redução de veículos a diesel desregulados, na ordem de 45% em 2005 para 7,7% em 2008, repercutindo diretamente na redução dos níveis de fuligem.

Provavelmente, o decréscimo na concentração de SO_2 , CO, fuligem se deve a um maior controle das emissões veiculares pelo PROCONVE (Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores) implantado pela Resolução CONAMA nº 18/86 (CONAMA, 1986). O PROCONVE impôs limites para emissão de poluentes veiculares, através da adoção de fases específicas para veículos pesados (ônibus e caminhões), resultando na adoção de melhorias tecnológicas, como veículos com injeção eletrônica e catalisadores para reduzir a emissão dos poluentes lançados na atmosfera.

1.2 Revisão dos poluentes atmosféricos

1.2.1 Material particulado

O MP é um poluente constituído de poeiras, fumaças e todo tipo de material sólido e líquido que se mantém suspenso na atmosfera; contém partículas primárias, produzidas diretamente pelas fontes emissoras, bem como partículas secundárias (principalmente sulfatos e nitratos), geradas pelo processo de conversão de gás a partículas a partir de SO_x , NO_x e compostos orgânicos voláteis (COVs). (CETESB, 2008).

A distribuição do MP pode ser classificada como trimodal, ou seja, frações grossas, finas e ultrafinas (Pope, 2000). A fração grossa ou MP_{10} são partículas com diâmetro aerodinâmico entre 2,5 a 10 μm provenientes

do solo, materiais da crosta, construções (ex.: escombros), estradas de rodagem (ex.: fricção dos pneus de veículos automotores com o solo); fração fina ou $MP_{2,5}$ são partículas com diâmetro aerodinâmico menor que $2,5\ \mu m$ provenientes da combustão incompleta de veículos automotores, indústrias, usinas termoelétricas; e fração ultrafina ou $MP_{0,1}$ são partículas com diâmetro aerodinâmico menor que $0,1\ \mu m$ provenientes da combustão incompleta de combustíveis fósseis. As partículas ultrafinas têm um tempo de residência na atmosfera relativamente curto, pois se agregam progressivamente para formar partículas maiores.

A exposição ao MP pode causar danos à saúde como: deficiência nas funções pulmonares, agravamento de doenças cardíacas e respiratórias, irritação dos olhos e pele, redução de visibilidade. Além de danos a saúde, polui o solo, a água, causam danos às propriedades, a paisagem e aos materiais (EPA 2006; OMS 2005).

1.2.2 Monóxido de carbono

O CO é um gás inodoro, incolor, gerado pela queima parcial de carbono nos combustíveis, sendo os veículos automotores os principais emissores.

A toxicidade do CO é devido a formação de carboxihemoglobina (COHb) no sangue, o que inibe o consumo de oxigênio. Em concentrações elevadas pode causar dores de cabeça, tontura, confusão, náusea, problemas de visão e coordenação e pode ser fatal em concentrações muito elevadas (EPA, 2000).

1.2.3 Óxidos de nitrogênio

Vários óxidos são estáveis a reações com o N_2 e O_2 . Eles incluem o óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N_2O), dióxido de nitrogênio (NO_2), trióxido de nitrogênio (N_2O_3), tetróxido de nitrogênio (N_2O_4), pentóxido de nitrogênio (N_2O_5) (IPCS, 1979).

Na atmosfera, o NO (gás não inflamável), é formado durante a reação entre o N e O_2 , porém, combina-se rapidamente com o O_2 para formar o NO_2 . O NO_2 reage com a água para formar o ácido nitroso (HNO_2) e o ácido nítrico (HNO_3). A forma mais importante de NO_x que causa danos a saúde é o NO_2 (Yang et al. 2009), por ser um gás agressivo ao trato respiratório e sua presença no ambiente está relacionada a casos de infecções respiratórias (OMS, 2005).

1.2.4 Óxidos de enxofre

Os SO_x são compostos de enxofre e moléculas de oxigênio. O dióxido de enxofre (SO_2) é um gás incolor que se dissolve facilmente com a água para formar o ácido sulfuroso (H_2SO_3). O SO_2 pode reagir cataliticamente ou fotoquimicamente na fase gasosa com outros poluentes do ar para formar o trióxido de enxofre (SO_3), ácido sulfúrico (H_2SO_4) e sulfatos. O SO_3 é um gás altamente reativo e, na presença de umidade no ar, é rapidamente convertido em H_2SO_4 . O H_2SO_4 reage com uma variedade de compostos atmosféricos para formando sulfatos, como, por exemplo, a amônia que reage com o H_2SO_4 e forma o sulfato de amônia.

Alguns sulfatos atingem diretamente o ar atmosférico, a partir das fontes de emissões veiculares e industriais, e, na proximidade de oceanos, o sulfato de magnésio está presente no aerossol gerado a partir do oceano spray.

Por ser um composto solúvel, o SO_2 é altamente tóxico ao sistema respiratório, sendo que a maior absorção ocorre na via aérea superior e apenas uma pequena parte atinge diretamente os pulmões (IPCS, 1979).

1.2.5 Ozônio

O ozônio é um gás presente na atmosfera e a sua formação é benéfica na estratosfera (entre 15 e 50 Km de altura), onde forma uma camada protetora contra os efeitos nocivos dos raios ultra-violetas, denominada: camada de ozônio. No entanto, o ozônio também é formado na baixa troposfera (até 25 Km de altura) por reações fotoquímicas da luz solar sobre os gases NO_x e COVs.

A formação do ozônio na troposfera é positivamente associada com as condições meteorológicas, no qual o nível do ozônio se eleva em dias quentes (Cifuentes et al., 2001). Classicamente, a formação do ozônio na atmosfera inicia-se pela fotólise do NO_2 e o produto desta reação, o NO (óxido de nítrico), reage rapidamente com O_3 para regenerar o NO_2 :

Se nenhum outro processo convertesse o NO em NO₂, a concentração do ozônio não aumentaria. No entanto, na presença dos COVs, as concentrações de ozônio aumentam, uma vez que o NO é convertido em NO₂ via formação de radicais livres e a velocidade de formação do ozônio depende da quantidade e da reatividade de cada um desses compostos (CETESB, 2004). Em concentrações elevadas, o ozônio pode causar danos à saúde e ao meio ambiente (EPA, 1997a).

Na RMSP, entre 1999 a 2003, o ozônio ultrapassou o padrão em 413 dias, nos últimos cinco anos ocorreram 286 dias de ultrapassagem, sendo que em 2008 ocorreram 49 dias de ultrapassagem. O maior número de ultrapassagens dos níveis de ozônio ocorreu no período de primavera e verão (CETESB, 2008).

1.2.6 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são formados na atmosfera por fontes antropogênicas e naturais. Em virtude do seu potencial tóxico, mutagênico e carcinogênico há um grande interesse ambiental (IARC, 2002).

Os HPAs podem ser identificados tanto na fase particulada quanto na fase gasosa. A fração gasosa tem moléculas menores e são menos tóxicas que a fração particulada (Zou et al., 2003). Os HPAs com 4 e 6 anéis aromáticos, geralmente detectados na fase particulada, são altamente mutagênicos e carcinogênicos, enquanto os de 2 a 3 anéis aromáticos, geralmente detectados na fase gasosa, são altamente tóxicos. Diversos

fatores determinam a liberação desses compostos na atmosfera pelos veículos automotores, como temperatura de combustão, nível de oxigênio no combustível, ciclo do motor (Zou et al., 2003).

O primeiro HPA identificado como carcinogênico foi o benzo(a)pireno em 1933, desde então, muitos HPAs foram identificados associados ao MP (Wingen et al., 1998). O conhecimento de tais compostos é de extrema importância, pois os HPAs se concentram nas partículas com menor diâmetro aerodinâmico (Miguel et al. 1978), como resultado, tem uma capacidade de atingir as regiões mais distais do sistema pulmonar e como consequência, pode causar danos a saúde mesmo em baixas concentrações (Sun et al., 1998). O Quadro 3 descreve a estrutura e o efeito dos HPAs, reconhecidos pela IARC (International Agency for Research on Cancer) (DHHS, 1990).

Quadro 3. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos classificados de acordo com a sua estrutura e efeito. Fonte: DHHS, 1990

HPAs	Estrutura	Efeito
Naftaleno		Tóxico
Acenafteno		Mutagênico
Fluoreno		Mutagênico
Fenantreno		Tóxico e mutagênico
Antraceno		Mutagênico
Fluoranteno		Carcinogênico e mutagênico
Pireno		Carcinogênico e mutagênico
Benzo[a]antraceno		Carcinogênico e mutagênico
Criseno		Carcinogênico e mutagênico
Benzo[k]fluoranteno		Carcinogênico e mutagênico
Benzo[a]pireno		Carcinogênico
Dibenzo[a,h]antraceno		Carcinogênico e mutagênico
Benzo[g,h,i]perileno		Carcinogênico
Indeno[1,2,3-cd]pireno		Carcinogênico

1.2.7 Compostos orgânicos voláteis

Os COVs são definidos como uma classe de substâncias com ponto de ebulição entre 50 - 100 °C e entre 240 - 260 °C. São emitidos na atmosfera tanto de forma biogênica (ex.: áreas rurais) quanto antropogênica (ex.: evaporação e queima incompleta de combustíveis fósseis). Quimicamente são classificados em hidrocarbonetos alifáticos, hidrocarbonetos aromáticos e/ou halogenados, alcoóis, éster e aldeídos (Figura 2).

Figura 2. Classificação dos compostos orgânicos voláteis. Fonte: Yu, 2005

Os alcanos, também chamados parafinas, são formados por cadeias de átomos de carbono com átomos de hidrogênio, tem baixo peso molecular e são altamente voláteis. Na atmosfera reagem com o radical hidroxila (OH[•]), para formar o radical alquila e este radical na presença de elevadas concentrações de NO forma o NO₂.

Os alcenos são hidrocarbonetos alifáticos insaturados com uma ligação covalente dupla ($C=C$) entre seus átomos de carbono, são mais reativos que os alcanos e menos reativos que os aromáticos. É um potente formador de metabolitos tóxicos, como tóxicos clorados e hidrocarbonetos bromados.

Os hidrocarbonetos aromáticos possuem uma estrutura com 6 átomos de carbono, 6 átomos de hidrogênio e 3 ligações duplas, são compostos insaturados. Dentre esses compostos, destacam-se o BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno) que são os compostos aromáticos mais comuns encontrados no petróleo (Ferreira et al., 2008). A OSHA (Occupational Safety and Health Administration) em 2004 definiu padrões de exposição ocupacional para os BTEX (Quadro 4).

Quadro 4. Padrões de exposição ocupacional para os BTEX. Fonte: OSHA, 2004

Poluente	Período de Tempo	Concentração
Benzeno	8 horas dia e/ou 40 horas semanal	1 ppm (3.19 mg/m ³)
Tolueno	8 horas dia e/ou 40 horas semanal	200 ppm (753.6 mg/m ³)
Etilbenzeno	8 horas dia e/ou 40 horas semanal	100 ppm (434 mg/m ³)
Xileno	8 horas dia e/ou 40 horas semanal	100 ppm (434 mg/m ³)

A exposição aos COVs é de grande interesse devido aos seus efeitos à saúde, como: depressão do sistema nervoso central (SNC), cefaléia, tontura, fraqueza, espasmos musculares, dermatite, fibrilação ventricular, dentre outros (OMS, 2005).

1.3 Combustíveis diesel e biodiesel

O óleo diesel é um combustível derivado do petróleo, formado principalmente por hidrocarbonetos alifáticos (alcanos, alcenos e alcinos) e aromáticos e em baixas concentrações, por átomos de enxofre, nitrogênio, metais e oxigênio (Ferreira et al., 2008). A composição química do diesel varia muito, devido a diferentes origens do petróleo utilizado como matéria-prima e diferentes processos de refino (Braun et al., 2003).

O primeiro motor a diesel de ignição indireta movido a óleo de amendoim foi apresentado em 1898, por seu inventor Rudolf Diesel na Exposição Mundial de Paris. Com uma visão já adiantada para o seu tempo, em 1912, Rudolf fez a seguinte afirmação:

“O motor a diesel pode ser alimentado por óleos vegetais, e ajudará no desenvolvimento agrário dos países que vierem a utilizá-lo. O uso de óleos vegetais como combustível pode parecer insignificante hoje em dia. Mas no futuro irá se tornar tão importante quanto o petróleo e o carvão são atualmente.”

Como Rudolf previa, na década de 40, já existia em Bruxelas e Louvain uma linha de ônibus que utilizava o combustível obtido a partir de óleo de palma. Em 1988, os chineses, foram os primeiros a nomearem os combustíveis de origem renovável como Biodiesel. Porém, o mundo só se preocupou em buscar fontes alternativas de combustíveis em 1973-1974, quando ocorreu a primeira crise do petróleo, além do mais, os países do Oriente Médio descobriram que o petróleo não é de origem renovável. Foi então, que em 1975, no Brasil surgiu o Proálcool, uma tecnologia 100% nacional, de origem renovável e menos poluente. Mas, com o fim da crise do petróleo, o programa pró-álcool foi deixado de lado, porém em 1979, com a segunda crise do petróleo, ocorreu o lançamento da segunda fase do Proálcool, levando a uma frota de veículos de quase 80% produzida no Brasil movida a motores a álcool.

Com o intuito de reduzir os níveis dos poluentes atmosféricos emitidos por veículos automotores, o PROCONVE impôs 6 fases de limites de emissão para veículos a diesel, através da Resolução CONAMA N° 18/86. O Quadro 5 descreve as fases 5 e 6 que deveria estar vigorando, conforme a Resolução CONAMA n° 315/02 (CONAMA, 2002).

Quadro 5. Fatores de emissão de motores para veículos pesados do ciclo Diesel. Fonte: CONAMA, 2002

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

Para cumprir os limites do PROCONVE de emissões impostas para os veículos a diesel, em 2007 a Resolução ANP nº 32/2007, reduziu o teor de enxofre de 500 ppm (partes por bilhão) para 50 ppm (ANP, 2007) e ficou estabelecido pela Resolução ANP nº 43/2008 que até Janeiro de 2010 os veículos a diesel das grandes cidades brasileiras devem ser abastecidos com o S-50 (ANP, 2008).

Em 2005, a Lei ANP nº 11.097/2005, define o combustível derivado de biomassa renovável para uso em motores a combustão interna e/ou, conforme regulamentação, para outro tipo de geração de energia, que possa substituir parcial ou totalmente combustíveis de origem fóssil como o Biocombustível (ANP, 2005). No entanto, apenas em 2008, a Resolução ANP nº 07/ 2008, define o biodiesel (B100) como combustível composto de alquil-ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, derivados de óleos vegetais ou de gorduras animais e estabelece a adição de 4% de biodiesel ao diesel (ANP, 2008).

O combustível biodiesel pode ser obtido através do processo químico de transesterificação, que consiste na reação química de óleos vegetais e gordura animal (ex.: matadouros; oleaginosas – palma, mamona, dendê, soja, óleo de fritura, etc.) com um álcool de cadeia curta (etanol e/ou metanol) na presença de um catalisador ácido (HCL – ácido clorídrico) ou básico (NaOH – Hidróxido de sódio), obtendo como produto final o éster etílico e/ou metílico de acordo com o álcool utilizado e o subproduto glicerina que pode ser refinado mais adiante para o uso em indústrias farmacêuticas e cosméticas Graboski et al., 1998; Parente, 2003). A Figura 3 descreve o processo de obtenção do combustível biodiesel.

Figura 3. Processo de obtenção do Biodiesel. Fonte: Parente, 2003.

1.4 Considerações das emissões veiculares dos combustíveis diesel e biodiesel

A frota automotiva movida a diesel na RMSP é responsável em lançar no ar atmosférico cerca de 24,97% de CO, 15,83% de HC, 78,45% de NO_x, 28,48% de MP e 15,08% de SO_x (CETESB, 2008).

O MP da queima do diesel consiste basicamente de fuligem (partículas de carbono aglomeradas), fração orgânica insolúvel (sulfato, nitrato, nitrito e metais) e fração orgânica solúvel (compostos oxigenados, aromáticos e alifáticos), como descrita na Figura 4 (Koltalo et al., 2009; Wallen et al., 2010).

Figura 4. Compostos presentes na queima de veículos a diesel na fase gás e sólida. Fonte: Chatterjee, 2004

O combustível biodiesel, por ser mais bem oxigenado que o combustível diesel, oxida mais facilmente os produtos da combustão, e como consequência, reduz o diâmetro médio geométrico das partículas e a emissão de carbono (Di et al., 2009).

A EPA (2002a) revisou os níveis de emissões dos poluentes NO_x, MP, CO e HC do combustível biodiesel em relação ao combustível diesel, e

essa revisão demonstrou que quanto maior a adição de biodiesel ao diesel, menor são as emissões de MP, CO e HC e maior são as emissões de NO_x, (Figura 5).

Figura 5. Porcentagem de alteração nas emissões das diferentes concentrações de biodiesel. Fonte: EPA, 2002a.

Um veículo Toyota, modelo Corolla, ano 1998 foi utilizado para avaliar as emissões de MP, CO, CO₂, NO_x, HC da queima do diesel e de dois tipos de biodiesel (éster metílico de colza e éster metílico de palma), nas proporções 5% (B5), 10% (B10) e 20% (B20); os resultados demonstraram que a queima do B5 e B10 reduziu as emissões de MP e

NO_x, o B20 elevou as emissões de MP e NO_x, o B5, B10 e B20 reduziu as emissões de CO e HC no biodiesel e as emissões de CO₂ foram similares ao diesel. Neste contexto, os autores sugerem que os dois tipos de biodiesel reduziram as emissões dos poluentes na atmosfera (Karavalakis et al. 2008).

Correa et al. (2008) analisaram as emissões de 7 carbonilas (formaldeído, acetaldeído, acroleína, acetona, propionaldeído, butialdeído e benzaldeído) no combustível diesel e biodiesel nas concentrações 2% (B2), 5% (B5), 10% (B10) e 20% (B20), utilizando um motor a diesel de 6 cilindradas, os resultados desse estudo exibiram que quanto maior a adição do combustível biodiesel ao combustível diesel, menor são as emissões de benzaldeído e maior são as emissões do formaldeído, acetaldeído, acroleína + acetona, propionaldeído e do butialdeído (Quadro 6).

Quadro 6. Emissões de carbonilas nos combustíveis B2, B5, B10 e B20.
Fonte: Correa et al., 2008

Poluentes	Combustível			
	B2	B5	B10	B20
Benzaldeído	-3,4%	-5,3%	-5,7%	-6,9%
Formaldeído	2,6%	7,3%	17,6%	35,5%
Acetaldeído	1,4%	2,5%	5,4%	15,8%
Acroleína + Acetona	2,1%	5,4%	11,1%	22%
Propionaldeído	0,8%	2,7%	4,6%	10%
Butialdeído	3,3%	7,8%	16%	26%

Turrio-Baldassarri et al. (2004) analisaram as emissões de HPAs, nitro-HPAs e carbonilas do combustível diesel e biodiesel na proporção de 20% (B20), os autores demonstraram uma redução nas emissões dos compostos mono e policíclicos e um aumento nas emissões de formaldeído para o combustível B20 em relação ao combustível diesel.

A adição do combustível biodiesel ao diesel gera uma melhora da combustão pelo aumento da quantidade de oxigênio no combustível que reage com o nitrogênio, reduzindo a concentração de carbono, fuligem, enxofre e a opacidade da fumaça. Em contrapartida, a elevada densidade do biodiesel causa uma redução no tempo de injeção, ocasionando o aumento das emissões de NO_x (Di et al., 2009; Lapuerta et al., 2008b). As diferenças entre as emissões do combustível diesel e biodiesel variam dependendo do motor, combustível, condição de operação (Bunger et al., 2000a) e do tipo do óleo biodiesel utilizado (Karavalakis et al., 2008).

1.5 Efeitos adversos causados pelos poluentes atmosféricos no sistema cardiopulmonar

Desde a década de 70, o Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LPAE-FMUSP), através de estudos epidemiológicos e experimentais, investiga a caracterização química dos poluentes atmosféricos (MP₁₀, MP_{2,5}, MP_{0,1}, O₃, SO₂, CO e NO₂), bem como, seus efeitos nocivos nos sistemas biológicos.

Estudos epidemiológicos na cidade de São Paulo, correlacionando efeitos à saúde causados pelos poluentes do ar (MP_{10} , O_3 , SO_2 , CO e NO_2), demonstram uma nítida influência na morbidade e mortalidade respiratória (Conceição et al., 2001; Freitas et al., 2004; Farhat et al., 2005; Arbex et al., 2009), morbidade e mortalidade cardiovascular (Cançado et al., 2006; Cendon et al., 2006, Filho et al., 2008, Santos et al., 2008). Sendo que os eventos cardiovasculares fatais ocorrem no mesmo dia da exposição ao MP Braga et al. (2001).

Dentre os poluentes atmosféricos, o $MP_{2,5}$ e o $MP_{0,1}$ tem sido amplamente estudados, pois possuem a capacidade de penetrar nas regiões mais distais do sistema respiratório, se deslocando para o sistema circulatório, gerando efeitos adversos nos órgãos atingidos, como coração (Rivero et al., 2005a, 2005b; Damaceno-Rodrigues et al., 2009; Maatz et al., 2009), pulmão (Cançado et al., 2006; Laks et al., 2008), cérebro (Oberdorster et al., 2004, Hougaard et al., 2009; Yokota et al., 2009), rim (Theis et al., 2008; Dünder et al., 2004), fígado (Araujo et al., 2008), aparelho reprodutor (Veras et al., 2008, 2009), entre outros.

Pereira et al. (2007) fizeram a exposição de um grupo de ratos Wistar ao MP proveniente da frota veicular e um outro grupo de ratos ao ar filtrado durante 20 horas (5 horas dia, durante 4 dias consecutivos). Demonstraram um aumento na contagem total de leucócitos no lavado broncoalveolar (LBA) para o grupo exposto e peroxidação lipídica, sugerindo que o estresse oxidativo é um dos mecanismos responsáveis pelos efeitos adversos agudos no sistema respiratório causado pelo MP.

Nemmar et al. (2008) administraram intravenosamente partículas da queima do diesel (0,02 e 0,1 mg/kg) em ratos Wistar e após 48 horas descreveram uma inflamação pulmonar caracterizada por um infiltrado de neutrófilos e inflamação sistêmica caracterizada pelo aumento no número de monócitos e granulócitos, uma redução na série vermelha e da hemoglobina do sangue. No entanto, a morfologia do miocárdio não sofreu alterações.

Em outro estudo, Nemmar et al. (2009) administraram partículas da queima do diesel (0.01 e 0.02 mg/Kg) via sistêmica em ratos hipertensos e após 24 horas observaram um aumento do influxo de neutrófilos no LBA, aumento da frequência cardíaca (FC) e da pressão arterial (PA) nos dois grupos expostos e aumento do influxo de macrófagos no LBA do grupo exposto a 0.02 mg/kg, sugerindo que as partículas do diesel leva a alterações cardíacas, inflamação pulmonar e sistêmica.

Estudos epidemiológicos demonstram uma relação entre a instabilidade do sistema nervoso simpático e parassimpático e a exposição ao MP_{2,5}, com o aumento na incidência de arritmias cardíacas, infarto do miocárdio e insuficiência cardíaca (Adar et al., 2007; Peretz et al., 2008; Santos et al., 2008).

O sistema nervoso autonômico é responsável pelo controle da atividade elétrica do coração e o desequilíbrio entre o sistema simpático e parassimpático pode levar a uma instabilidade nos impulsos elétricos. Um método eficaz e não invasivo amplamente utilizado na literatura para avaliar flutuações do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático é o estudo da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), obtido pelo registro

contínuo do eletrocardiograma. O estudo da VFC pode ser avaliado através de medidas do domínio de tempo e medidas do domínio de frequência (Task Force of the European Society of Cardiology the North American Society of Pacing Electrophysiology, 1996).

As chamadas medidas no domínio do tempo baseiam-se na determinação da duração dos intervalos entre complexos QRS (despolarização sinusal) pelo intervalo da variação do intervalo RR. Os parâmetros clássicos são o SDNN (Desvio Padrão de todos os intervalos RR normais), SDNNi (média dos desvios padrões dos intervalos RR normais calculados em intervalos de 5 minutos), RMSSD (raiz quadrada da soma das diferenças sucessivas entre intervalos RR normais adjacentes ao quadrado), pNN50 (percentual dos intervalos RR normais que diferem mais que 50 milissegundos de seu adjacente).

A medida do domínio de frequência baseia-se na análise espectral dos intervalos RR que estima a frequência e amplitude de alteração da frequência cardíaca (FC). As faixas de frequência analisadas são: AF (alta frequência: 0,15 a 0,04 Hz) moduladas pelo sistema nervoso autônomo parassimpático; BF (baixa frequência: 0,04 a 0,15 Hz) moduladas pelo sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático; e a BF/AF (proporção da baixa frequência pela alta frequência) modulada pelo tônus simpático-vagal.

Magari et al. (2001), em estudo de coorte ocupacional constituída por 40 trabalhadores não idosos, saudáveis, do gênero masculino, avaliaram a associação entre o PM_{2,5} e a VFC decorrente da ação direta do sistema

nervoso simpático ou indireta com produção pulmonar de citocinas inflamatórias e liberação para a circulação. A conclusão do estudo foi a alteração no controle autonômico do coração após a exposição ocupacional e ambiental do PM_{2,5}. Os possíveis mecanismos de ação propostos foram a produção de citocinas na exposição prolongada (várias horas), e ação do sistema nervoso simpático na exposição aguda (alguns minutos).

Peters et al. (2004) em estudo case-crossover, com 691 indivíduos, na faixa etária de 25 a 74 anos, com infarto do miocárdio prévio, avaliaram a associação entre a exposição ao tráfego (carro, ônibus, bicicleta, motocicleta) e o infarto agudo do miocárdio (IAM); este estudo mostrou que as exposições ao tráfego foram mais frequentes no dia da ocorrência do infarto e o risco de infarto em uma hora de exposição antes do evento foi de 2,60 (IC95%: 1,89; 3,57) a 3,94 (IC95%: 2,14; 7,24), sugerindo uma associação positiva entre a exposição ao tráfego uma hora antes de ocorrer o IAM.

Mills et al. (2007) em um estudo randomizado, case-crossover, expuseram 20 homens com doença arterial coronariana estável durante o período de uma hora a queima do diesel (300 µg/m³) e/ou ao ar filtrado durante a realização de exercício moderado em bicicleta ergométrica. Durante a exposição, a isquemia do miocárdio foi quantificada pela análise do segmento ST, e após 6 horas da exposição, a função fibrinolítica e vasomotora foi avaliada. Os autores demonstraram aumento da FC em ambas às exposições (ar filtrado e queima do diesel) e a exposição ao diesel não agravou a disfunção vasomotora pré-existente, concluindo que a queima

do diesel promove isquemia do miocárdio e inibe a capacidade endógena fibrinolítica.

Seagrave et al. (2005) afirmam que os efeitos adversos à saúde e ao ambiente causado pelas emissões do combustível diesel pode ser melhor entendido pela caracterização química e física do mesmo, no qual, se torna um guia valioso para a redução à exposição a esse poluente, por meio de medidas de saúde pública.

A adição do biodiesel como combustível é recente, por isso a maioria dos estudos foca na análise da eficiência do motor, propriedades físicas e químicas do biodiesel e emissões (Canakci, 2007; Lu et al., 2007; Ozgunay et al., 2007; Singh et al., 2008). Em contrapartida, apenas alguns estudos focam na análise do combustível biodiesel em nível de toxicidade (Finch et al., 2002; Khan et al., 2007; Liu et al., 2008) citotoxicidade e mutagenicidade (Carraro et al., 1997; Bunger et al., 1998, 2000a, 2000b, 2007).

Finch et al. (2002), expuseram ratos durante 6 horas por dia, 5 dias por semana, por 13 semanas, à inalação do material oriundo da combustão do biodiesel de soja, nas concentrações de MP (0.04, 0.2, e 0.5 mg/m³). Os autores demonstraram um infiltrado de macrófagos alveolares que perduram até 28 dias após o fim das exposições, sugerindo esse evento como uma resposta fisiológica normal.

Células A549 da via aérea humana foram tratadas durante 5 dias com as partículas da queima do diesel e das diferentes concentrações do biodiesel (B20, B40, B60, B80 e B100) na concentração de 25 mg/ML. Houve a formação de células multinucleadas para todos os grupos tratados: diesel

e B100 (12%), B20 (52%), B40 (48%), B60 (47%), B80 (16%). Esses resultados demonstram uma relação entre a formação de células multinucleadas e o MP (Ackland et al., 2007). Khan et al. (2007) demonstraram uma associação positiva entre a exposição aguda ao MP do combustível B50 e o aumento da mortalidade dos organismos aquáticos.

Bunger et al. (2000b) estudaram as propriedades mutagênicas da queima do diesel e de dois tipos de biodiesel (éster metílico de soja e éster metílico de colza), utilizando como modelo de estudo, *Salmonella*; os autores observaram que os dois tipos de biodiesel são significativamente menos mutagênicos que o diesel por emitir menos fuligem e HPAs, e atribuíram essa propriedade mutagênica ao enxofre do combustível diesel. Em outro estudo, Bunger et al. (2000a), avaliaram os efeitos citotóxicos e mutagênicos da combustão do diesel e biodiesel (éster metílico de colza); os resultados demonstraram que o diesel é mais mutagênico do que o biodiesel, porém o biodiesel é mais citotóxico do que o diesel por elevar as emissões de carbonilas. Bunger et al. (2007), em estudo semelhante aos anteriores, descreveram que as emissões do biodiesel também possuem efeitos citotóxicos similares e/ou mais marcantes que o diesel.

A possibilidade da ampliação da mistura diesel/biodiesel, em diferentes proporções indica claramente a necessidade de estudos sobre as modificações das emissões e sua toxicidade, uma vez que o mecanismo fisiopatológico sobre a morbidade e mortalidade por doenças cardiovasculares não está totalmente estabelecido. Nesse contexto, a determinação da toxicidade relativa do material da queima do combustível

diesel e biodiesel no sistema cardiovascular é de extrema relevância no fornecimento de dados para discussões sobre as vantagens e desvantagens dos mesmos, além de contribuir com o desenvolvimento de estratégias que visem à elaboração de políticas públicas para a melhoria da qualidade de vida da população.

2 OBJETIVOS

---

2. OBJETIVO GERAL

Analisar a toxicidade cardiovascular e inflamatória aguda induzida pela exposição via inalação, ao material oriundo da queima do combustível diesel e de concentrações do biodiesel na proporção de 50% (B50) e 100% (B100).

2.1 Objetivos específicos

- Caracterizar a composição orgânica e inorgânica das partículas finas do material particulado (MP_{2,5});
- Analisar a alteração cardiovascular através da frequência cardíaca, variabilidade da frequência cardíaca e pressão arterial;
- Analisar a inflamação pulmonar através da contagem de células inflamatórias no lavado broncoalveolar e no parênquima pulmonar;
- Analisar a resposta sistêmica aguda dos marcadores hematológicos (hemograma, reticulócitos), de hemostasia (fibrinogênio, tempo de protrombina - TP, tempo de trombina - TT e tempo de tromboplastina parcial ativada - TTPA) e medular.

3 MÉTODOS

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

3.1 Combustíveis

Os combustíveis utilizados foram: óleo diesel metropolitano (500 ppm de enxofre acrescido de 3% biodiesel) proveniente da distribuidora Combuluz/SP; biodiesel (óleo vegetal de éster etílico de soja degomado) proveniente da Refinaria Fertibom Catanduva/SP, utilizado nas seguintes concentrações: B50 (combustível composto por 50% de diesel metropolitano e 50% de biodiesel) e B100 (combustível composto por 100% de biodiesel). As propriedades físicas do óleo diesel e do óleo vegetal biodiesel estão descritos nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1. Propriedades físicas do óleo vegetal éster etílico de soja degomado (biodiesel)

Éster etílico de soja (biodiesel)				
Parâmetro	Unidade	Valor	Especificação	Metodologia
Massa específica a 20 °C	kg/m ³	875,4	850 a 900	NBR 14065
Viscosidade cinemática a 40°C	(mm ² /s) CST	3,5	3,0 a 6,0	NBR 10441
Teor de água, máx.	mg/kg	825	500	ASTM D6304
Ponto de fulgor, min.	°C	107	100	NBR 14598
Teor de éster, mín.	% massa	94,3	96,5	EN 14103
Resíduo de carbono	% massa	0,035	0,05	NBR 6294
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C, máx.	-	1A	1	NBR 14359
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	-4	19	NBR 14747
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,36	0,5	NBR 14448
Glicerol livre, máx.	% massa	0,01	0,02	ASTM D6584
Glicerol total, máx.	% massa	0,38	0,25	
Monoacilglicerol	% massa	1,3	Anotar	
Diacilglicerol	% massa	0,32	Anotar	
Triacilglicerol	% massa	0	Anotar	
Etanol, máx.	% massa	0,12	0,2	EN 14110

Resolução ANP nº 7, de 19.3.2008 - DOU 20.3.2008 - Estabelece a especificação do biodiesel a ser comercializado pelos diversos agentes econômicos autorizados em todo o território nacional. Fonte: ANP, 2008.

Tabela 2. Propriedades físicas do óleo diesel

Óleo diesel				
Parâmetro	Unidade	Valor	Especificação	Metodologia
Aspecto	-	OK	Límpido	visual
Cor	-	OK	Metropolitano	Visual
Teor de biodiesel	% vol.	2,7	3	EN 14078
Enxofre Total, máx.	mg/kg	252	500	NBR 14553
10% vol., recuperados	°C	176,5	Anotar	NBR 9619
50% vol., recuperados, máx.		266,5	245 a 310	
85% vol., recuperados, máx.		346	360	
90% vol., recuperados		363	Anotar	
Massa específica a 20 °C	kg/m ³	852,1	820 a 865	NBR 14065
Ponto de fulgor, min.	°C	47	38	NBR 14598

Resolução ANP nº 15, de 17.7.2006 – DOU 19.7.2006 - Estabelece as especificações do óleo diesel e mistura óleo diesel/biodiesel – B3 de uso rodoviário, para comercialização em todo o território nacional, e define obrigações dos agentes econômicos sobre o controle da qualidade do produto. Fonte: ANP, 2006.

3.2 Gerador de partículas finas dos combustíveis diesel e biodiesel

O sistema de geração de partículas dos poluentes provenientes da queima dos diferentes combustíveis (diesel, B50 e B100) foi desenvolvido e montado no LPAE – FMUSP, com o objetivo de expor pequenos animais via inalação aguda, à queima desses combustíveis, bem como, realizar amostragens do MP_{2,5} e gases para posterior análise laboratorial (Figura 6).

Figura 6. Gerador de partículas do material da queima dos combustíveis diesel e biodiesel. BV: bomba de vácuo; VA: válvula agulha; FI: rotâmetro; PI: pressão; HI: umidade; TI: temperatura

Os gases resultantes do processo de queima ocorrido no gerador portátil estacionário de energia a diesel (BD-2500 CFE, Branco, China), foram conduzidos até uma câmara de exposição, onde os camundongos Balb/C estavam acomodados de maneira a proceder à exposição aguda via inalação do material oriundo da queima do combustível em estudo.

O sistema de filtragem do ar ambiente (filtro de ar mecânico e químico, modelo ECU-100, Purafil, EUA) foi responsável em captar o ar ambiente para filtrá-lo em 98% e direcioná-lo ao ejetor, que tem como função diluir os gases resultantes do material da queima. Este sistema foi

adicionado para reduzir a dosagem de intoxicação, de modo a garantir a sobrevivência do animal. Em seguida, esse material já diluído, através de um tubo de distribuição (“*manifold*”), foi direcionado tanto para a câmara de inalação quanto para as tomadas específicas de amostragem do MP. Para expor os camundongos Balb/C ao ar filtrado (controle), a válvula de abertura dos gases provenientes da queima do diesel e biodiesel foi fechada. Após atravessar a câmara, os gases foram conduzidos para fora do equipamento.

Durante todo o período de exposição (60 minutos) dos camundongos Balb/c na câmara de inalação, parâmetros foram monitorados em tempo real: concentração de MP_{2,5} (TrakPro versão 3.6.1.0, EUA), emissões de CO (ToxyPro), pressão dentro da câmara, nível de ruído (decibelímetro digital, modelo IURDEC-420, Instrutemp, São Paulo, Brasil), temperatura e umidade relativa (termohigrômetro digital, modelo DHT-2000, Brasil).

Simultaneamente à exposição dos camundongos Balb/c, o MP_{2,5} do ar filtrado (controle) e da queima dos combustíveis (diesel, B50 e B100) foram amostrados por meio de impactadores de pequeno volume operando a uma vazão de 10 L/min, por um período de 60 minutos em filtros de polycarbonato (Isopore™ Membrane Filters Polycarbonate, 0.8µm, 37mm, Millipore, EUA) para caracterização elementar e em filtros de teflon™ (PTFE Membrane W/PMP Ring 2.0µm, 37mm, Energética, Brasil) para caracterização dos HPAs.

Realizou-se uma amostragem pontual do ar filtrado a 98% (controle) e da queima de cada combustível (diesel, B50, B100), imediatamente na saída da câmara de inalação, em globos de aço inox de 6 litros (canister), a

um fluxo de 50 mL/min, por um período de 60 minutos para posterior análise dos COVs. A metodologia de amostragem dos COVs foi baseada nos métodos do TO-14 e TO-15 da EPA (EPA, 1999a; 1999b).

3.3 Caracterização do material particulado ($MP_{2,5}$): gravimetria, refletância e espectrometria de fluorescência de raio-X (FRX)

Após a amostragem $MP_{2,5}$ em filtros de polycarbonato (Isopore™ Membrane Filters Polycarbonate, 0.8 μ m, 37mm, Millipore, EUA), a determinação da massa (concentração de partículas) foi realizada pelo método de gravimetria em uma balança ultra-micro analítica (modelo UMXZ, Mettler e Toledo, Suíça). Em seguida, fez-se a medição da concentração de fuligem presente nos filtros de polycarbonato pela técnica de refletância de luz (Refletômetro, modelo “Smoke Stain reflectometer – Model 43”, Diffusion Systems, Londres, Reino Unido). A técnica de refletância consiste na incidência de luz de uma lâmpada de tungstênio no filtro amostrado, que reflete uma intensidade inversamente proporcional a quantidade de carbono elementar presente na amostra, ou seja, quanto maior a quantidade de carbono elementar no filtro, menor a intensidade de luz refletida pelo filtro e menor a detecção pelo fotosensor.

Posteriormente, a caracterização elementar do $MP_{2,5}$ foi determinada pelo método de espectrometria de fluorescência de raio-X por dispersão de

energia (FRX-DE) (modelo EDX 7000HS, Shimadzu Corporation Analytical Instruments Division, Kyoto, Japão). A medição consiste na excitação dos elementos da amostra com raios-X, os quais tendem a ejetar os elétrons no interior dos níveis dos átomos, e assim, elétrons dos níveis mais afastados realizam um salto quântico preenchendo a vacância. Em cada salto o elétron perde energia e esta energia é emitida em forma de um fóton de raios-X, de energia característica e bem definida para cada elemento, representados através de linhas espectrais. A área percorrida pelo raio-X foi de 10 mm para todas as amostras e foram realizadas três varreduras para cada filtro. Os elementos químicos passíveis de serem determinados foram: magnésio (Mg), alumínio (Al), silício (Si), fósforo (P), enxofre (S), cloro (Cl), potássio (K), cálcio (Ca), titânio (Ti), vanádio (V), cromo (Cr), manganês (Mn), ferro (Fe), níquel (Ni), cobre (Cu), zinco (Zn), selênio (Se), bromo (Br), chumbo (Pb).

3.4 Análise dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Os solventes classificados pelo HPLC usados neste estudo foram: n-hexano (HEX), acetona (ACT) e acetonitrila (ACN) (J.T. Baker, EUA). Uma solução de mistura padrão de 13 HPAs foi preparada de acordo com o padrão sólido para cada HPA: fenantreno (FEN), antraceno (ANT), fluoranteno (FLR), pireno (PYR), benzo[a]antraceno (BaA), criseno (CRY), benzo[k]fluoranteno (BkF), benzo[a]pireno (BaP), benzo[e]pireno (BeP), dibenzo[a,h]antraceno (DahA), Benzo[e]acefenantrileno (BeAcf), benzo[g,h,i]perileno (BghiP),

indeno[1,2,3-cd]pireno (IND). Os padrões de HPAs sólidos (pureza > 98%) foram obtidos pelo Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemanha), exceto o benzo[k]fluoranteno (BkF) e o benzo[g,h,i]perileno (BghiP) que foram obtidos pela Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

A Extração dos HPAs foi executada por um banho ultra-sônico (10 minutos), usando a mistura de 10 mL acetona: hexano (1:1, v/v) em três tempos. Em seguida, o volume extraído foi reduzido por um evaporador rotativo e seco em baixo fluxo de N₂. O resíduo foi dissolvido em 1000 µL de acetonitrila e analisado pelo HPLC/Fluorescência (LC920, Varian, Riacho de Noz, o EUA). Uma coluna de HPA Supelcosil LC (250 mm x 4,6 mm x 5 µm - Supelco, Bellefonte, EUA) foi usada. A fase móvel foi a acetonitrila/água em modo de gradiente: acetonitrila 60% por 5 minutos, que foi usado com uma gradiente linear até 100% de acetonitrila (20 minutos), e esta condição permaneceu por 10 minutos. A temperatura da coluna, volume de injeção e fluxo de fase móvel foram, respectivamente, 30°C, 50 µL e 1.8 mL/min. O detector de fluorescência foi operado com um programa de comprimento de onda, como apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Programa de comprimento de onda para HPLC por detector de fluorescência para análise de HPAs

Tempo (min)	λ_{ex}	λ_{em} (nm)
0-8.6	220	322
8.6-22.80	240	392
22.80-25	300	498

A precisão do método de extração foi avaliada usando o certificado de referência INPT CRM-1649a (poeira urbana). A recuperação dos HPAs variou de 65 a 108% com RSD < 10%, para todos os compostos.

3.5 Análise dos Compostos Orgânicos Voláteis

Foram utilizados dois equipamentos para a análise dos COVs. Um cromatógrafo gasoso (VARIAN 3800) com detecção simultânea de espectrometria de massas (SATURN 2000) para identificação dos compostos e ionização de chama para quantificação dos compostos. Este sistema possui um método para análise de COVs que tenham no mínimo quatro carbonos. Outro método foi desenvolvido no Laboratório de Química Atmosférica (LQA) para COVs leves (2 a 5 carbonos), sendo que este sistema utiliza um cromatógrafo (VARIAN 3800) acoplado com detector de ionização de chama.

A amostra foi analisada diretamente na fase gasosa, utilizando pré-concentração criogênica, para possibilitar a análise de um grande volume de amostra (150-200ml). Para os COVs com mais de 4 carbonos foi utilizada uma coluna apolar, de 60 m de comprimento, 1 μ m de espessura de fase estacionária e 0,32 mm de diâmetro interno. A programação utilizou uma variação de temperatura de 6°C/min, de -50°C a 200°C. No final da coluna cromatográfica, a amostra foi dividida para dois detectores diferentes. Uma parte foi enviada para o Detector de Espectrometria de Massas (SATURN 2000) e outra para o Detector de Ionização de Chama, utilizando-se uma

conexão em “T” de volume morto “zero” da Valco, compensando-se o vácuo do Detector de Espectrometria de Massas e a pressão atmosférica do Detector de Ionização de Chama.

No método para a quantificação dos COVs leves foi utilizado uma coluna PLOT de sílica fundida de $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{Na}_2\text{SO}_4$ (polar) com 50 m de comprimento e 0,53 mm de diâmetro interno e 10 μm de espessura de fase estacionária. A etapa da pré-concentração é igual a do método descrito anteriormente, a diferença está na utilização de uma coluna apropriada para COVs leves. A rampa de temperatura utilizada foi de 10°C/min, na faixa de -50°C a 180°C. A detecção foi realizada com ionização de chama.

A quantificação dos HC foi realizada utilizando-se quatro misturas de padrões gasosos produzidos e certificados pela SCOTT SPECIALISTY com a utilização de curvas de calibração de padrões certificados. As misturas padrões gasosas utilizadas foram: alcanos, alcenos, aromáticos e TO-14, de aproximadamente 1,0 ppmv, balanceados em nitrogênio.

Para a quantificação de compostos não contidos nos padrões, foram utilizados os fatores de resposta dos compostos de mesma família como alcanos, alcenos e aromáticos. O fator de resposta é a razão entre a área obtida no cromatograma, dividido pela concentração, multiplicada pelo número de carbonos do composto em questão. As amostras foram analisadas em duplicata quando se verificava que a diferença de resposta entre as áreas encontradas era menor que 5%, caso contrário realizava-se a triplicata. Foram encontrados 70 picos nos cromatogramas, utilizando como critério à integração de picos com sinal superior a 400 contagens.

3.6 Animais

Foram expostos na câmara de inalação do gerador de partículas ao ar filtrado (controle) e ao material da queima dos combustíveis diesel, B50 e B100 um total de 48 camundongos Balb/c, machos, com aproximadamente 60 dias de idade, pesando entre 20 e 30 gramas, obtidos do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos a 22-23°C, em ciclos diários, alternando 12 horas em ambiente escuro e 12 horas em ambiente claro, com controle da umidade relativa do ar. Foram alimentados com ração e água *ad libitum*.

Quatro grupos de 12 animais foram formados; cada grupo foi exposto à concentração média de 550 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$ por um período de 60 minutos, que corresponde a uma média diária de 23 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{MP}_{2,5}$. Os grupos foram divididos da seguinte maneira:

- Grupo I: controle (exposto ao ar filtrado em 98%);
- Grupo II: diesel metropolitano (500 ppm de enxofre acrescido de 3% de biodiesel);
- Grupo III: B50 (50% de biodiesel - éster etílico de soja degomado acrescidos com 50% de diesel metropolitano);
- Grupo IV: B100 (100% de biodiesel - éster etílico de soja degomado).

3.7 Registro da frequência cardíaca, variabilidade da frequência cardíaca e pressão arterial

Os animais foram previamente anestesiados via inalatória com Isoflurano, e um *cuff* específico para camundongos foi ajustado na base da cauda do animal. Utilizou-se um sistema digital de aquisição de dados da marca Powerlab (*ADInstruments*) para o registro da FC, VFC e PA. A VFC foi avaliada através do domínio tempo e frequência (SDNN, RMSSD, BF, AF, BF/AF). Esses registros foram obtidos antes da exposição ao gerador (medida pré-inalatória) e imediatamente após 30 e 60 minutos da exposição dos animais na câmara de inalação ao ar filtrado (controle) e a queima das diferentes concentrações dos combustíveis diesel/biodiesel.

3.8 Coleta e análise laboratorial dos parâmetros hematológicos e dos fatores de coagulação

Após 24 horas, os camundongos foram anestesiados via intraperitoneal com Rompum® (Xilasina, 15mg/kg de peso) e Ketamina-S(+)® (Cloridrato de Ketamina, 75mg/kg de peso). Em seguida, procedeu-se a coleta de sangue via punção cardíaca. O sangue foi acondicionado em frascos contendo EDTA K2 para análise de hemograma e contagem de reticulócitos. Para a análise dos parâmetros de hemostasia (TP, TT e TTPA), o sangue foi coletado em frascos de citrato de sódio a 3%. O material

coletado foi encaminhado ao Serviço de Hematologia do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para análise.

A análise hematológica foi realizada através do equipamento Pentra 120 da ABX Diagnósticos (Montpellier, França). O princípio da contagem de plaquetas e eritrócitos foi feito por impedância elétrica, e, para a classificação do tamanho e complexidade dos leucócitos, usou-se dispersão a laser associada a citotóxicidade. Para a avaliação dos reticulócitos, a citometria de fluxo foi usada associada à coloração fluorescente. A contagem diferencial de leucócitos foi feita através de microscópio ótico em aumento de 1000 x, em lâminas coradas com Romanowsky.

Os marcadores de hemostasia foram determinados em plasma citratado mensurados em equipamento Thrombolyzerb Rack Rotor (Behnk Elektronik® - Organon Tekinica®) automatizado. Os níveis de fibrinogênio, TP, TT e TTPA foram determinados pela metodologia coagulométrica.

3.9 Coleta e análise do lavado broncoalveolar

Após a coleta do sangue, procedeu-se a eutanásia dos camundongos via secção total da aorta abdominal. Para a realização do LBA, realizou-se uma traqueostomia. Cerca de 0.5 mL de PBS (tampão fosfato-salino) foi infundida na traquéia por meio de uma cânula traqueal, por 3 vezes consecutivas, totalizando um volume de 1,5 mL. O volume

recuperado foi acondicionado em tubos tipo *eppendorf* e foi centrifugado a 1210 rpm por 10 minutos a 5°C (Centrífuga GS-6R, Beckman).

Para a contagem total de células, o “*pellet*” foi ressuspendido em volume de 400 µL de PBS e foi homogenizado. A seguir, 10 µL foram colocados na câmara de Neubauer para a contagem total das células (contagem total de células/mL = contagem total x 10⁵ x diluição da amostra) (Figura 7).

Figura 7. Câmara de Neubauer: locais de contagem dos leucócitos

A partir da mesma ressuspensão de 400 µL de PBS, foram coletados 100 µL e adicionados em centrífuga cytopsin (Cytopsin 3 – Shandon) e citocentrifugados a 450 rpm por 6 minutos. O material depositado na lâmina do cytopsin foi corado com Diff Quick (Baxter Dade, Dudingen, Suíça) para contagem diferencial das células inflamatórias: macrófagos, neutrófilos, linfócitos, eosinófilos em microscópio óptico com aumento de 1000 x.

3.10 Coleta e análise da medula óssea

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

Para a contagem total de células, o “*pellet*” foi ressuspendido em volume de 1mL de PBS e homogenizado, em seguida, 10 µL foi colocado na câmara de Neubauer para a contagem total das células. A contagem total na câmara de Neubauer foi realizada como descrito na metodologia do LBA.

A partir da mesma ressuspensão de 1 mL de PBS, foram coletados 100 µL e adicionados em centrífuga cytospin (Cytospin 3 – Shandon) e citocentrifugados a 450 rpm por 6 minutos. O material depositado na lâmina do cytospin foi corado com Diff Quick (Baxter Dade, Dudingen, Suíça) para contagem diferencial em microscópio óptico com aumento de 1000x. Foram avaliadas 200 células por lâmina, sendo classificadas em: mielócito, metamielócito, plasmócito, monócito, bastonete, segmentado, eosinófilo, linfócito, macrófago e série vermelha.

3.11 Coleta e análise histológica pulmonar

Os pulmões de cada animal foram fixados através de instilação de solução de formalina tamponada a 10%. Após 48 horas, cortes sagitais dos pulmões foram realizados e encaminhados ao setor de rotina da técnica histológica do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Cortes finos de cinco micrômetros de espessura foram preparados e corados com hematoxilina-eosina (HE). Realizou-se a contagem de células polimorfonucleares e mononucleares na parede alveolar através de um retículo de pontos e retas. Foram escolhidos aleatoriamente dez campos através de microscópio óptico comum e contamos o número de células por área de parênquima.

3.12 Análise estatística

Foram realizadas análises descritivas para todas as variáveis avaliadas nesse estudo. Para as variáveis quantitativas, a homogeneidade das variâncias e a aderência a curva normal foram analisadas através dos testes de Kolmogorov-smirnov. A comparação dos efeitos da exposição aos diferentes combustíveis foi realizada pela análise de variância (ANOVA) para as variáveis com distribuição normal. As variáveis do LBA não tinham distribuição normal, fez-se então uma correção utilizando Log10, e em seguida foi realizada a análise de variância (ANOVA). Quando demonstrada

diferença entre os grupos, o teste de Tukey foi adotado para identificar os grupos divergentes.

Para a análise do registro eletrocardiográfico, os resultados foram expressos pela variação do tempo 30 e 60 minutos após a exposição em relação ao tempo pré-exposição. Utilizou-se o modelo linear generalizado para medidas repetidas.

O pacote estatístico utilizado foi o SPSS versão 17; SPSS Inc.®, Chicago, IL. O nível estatístico de significância adotado foi de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 Análise dos parâmetros de exposição em tempo real

A concentração média de $MP_{2,5}$ na câmara de exposição para o grupo controle (ar filtrado) foi de $45 \mu\text{g}/\text{m}^3$, o que equivale a uma concentração média diária de $1,88 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Para grupos expostos a queima dos combustíveis diesel, B50 e B100, a concentração média de $MP_{2,5}$ na câmara de exposição foi de $550 \mu\text{g}/\text{m}^3$, o que equivale a uma concentração média diária de $23 \mu\text{g}/\text{m}^3$; níveis diários abaixo do recomendado ($25 \mu\text{g}/\text{m}^3$), porém, longe do ideal ($10 \mu\text{g}/\text{m}^3$) (OMS, 2005).

A concentração de CO foi maior para os grupos expostos a queima do B50 em comparação aos grupos expostos a queima do diesel ($p < 0,05$), B100 ($p < 0,001$) e controle ($p < 0,001$); houve um aumento na emissão dos níveis de CO para o grupo exposto a queima do diesel em comparação aos expostos ao B100 ($p < 0,01$) e controle ($p < 0,001$).

Os níveis de temperatura e umidade não mostraram diferenças entre si para os grupos (controle, diesel, B50 e B100), porém, os níveis de ruído dos grupos expostos ao diesel, B50 e B100 foram maiores em relação ao controle ($p < 0,001$). No entanto, os padrões de temperatura, umidade e ruído estão de acordo com as normas de cuidados para roedores (ILAR 2003). A Tabela 4 descreve os valores de MP, CO, temperatura, umidade e ruído para cada grupo exposto.

Tabela 4. Valores descritivos dos parâmetros mensurados em tempo real (MP, CO, temperatura, umidade e ruído) de cada grupo exposto na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100). Os valores estão apresentados como média, desvio padrão, mínimo e máximo

	Controle	Diesel	B50	B100
Parâmetros	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
	Min – Max	Min – Max	Min – Max	Min – Max
MP (µg)	45,08 (36,17) 47 – 1360	556,41 (134,69)* 47 – 1360	551,61 (176,07)* 17 – 981	550,13 (153,55)* 38 – 990
CO (ppm)	ALD	9,79 (7,32) 0 – 34	11,90 (5,61)** 0 – 31	3,84 (3,17) 0 – 16
Temperatura (°C)	20,41 (2,10) 15 – 26	20,24 (1,59) 17 – 24	20,20 (2,89) 10 – 28	20,67 (1,06) 19 – 23
Umidade	72,37 (6,33) 61 – 88	72,36 (6,22) 63 – 90	72,48 (4,81) 65 – 83	72,68 (6,95) 51 – 86
Decibéis (Hz)	63,3 (2,72) 60 – 69	67,30 (1,73)* 62 – 70	66,57 (0,84)* 65 – 68	67,39 (1,79)* 57 – 73

ALD: abaixo do limite detectável

* Diesel, B50 e B100 ≠ controle ($p < 0,001$).

** B50 ≠ diesel ($p < 0,05$), B100 e controle ($p < 0,001$).

4.2 Análise dos filtros por gravimetria e refletância

A Figura 8 demonstra a concentração média de fuligem em relação à concentração média da massa amostrados durante a exposição dos animais ao ar filtrado (controle) e ao material da queima dos combustíveis diesel, B50 e B100.

Figura 8. Média da concentração de fuligem e massa amostradas nos filtros com ar filtrado (controle), diesel, B50 e B100

A concentração média da massa (concentração de partículas) do $MP_{2,5}$ foi maior para o diesel e B50 quando comparado ao controle ($p < 0,001$) e B100 ($p < 0,05$), a queima do B100 apresentou uma maior concentração média de massa quando comparado ao controle ($p < 0,05$).

A concentração média de fuligem foi maior para todas as amostras dos combustíveis diesel, B50 e B100 em relação ao controle ($p < 0,001$). A queima do B50 apresentou uma maior concentração de fuligem em relação às amostras do combustível diesel ($p < 0,05$), B100 ($p < 0,001$) e controle ($p < 0,001$) (Tabela 5).

Tabela 5. Valores descritivos dos parâmetros mensurados nos filtros: massa e fuligem. Os valores estão apresentados como média, desvio padrão, mínimo e máximo

Parâmetros ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Controle	Diesel	B50	B100
	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
	Min – Max	Min – Max	Min – Max	Min – Max
Massa	32,83 (12,06)	424,01 (244,03)*	516,78 (222,82)*	229,28 (157,69)
	12,20 – 56,65	11,7 – 1089	236,2 – 981,1	96,7 – 626
Fuligem	0,99 (0,62)	43,49 (29,66)**	68,65 (19,71)**†	26,68 (17,79)**
	0,25 – 2,68	11,73 – 89,43	37,15 – 97,66	9,62 – 70,69

* diesel e B50 $\neq$ B100 ($p < 0,05$) e controle ($p < 0,001$).

** diesel, B50 e B100 $\neq$ controle ($p < 0,001$).

† B50 $\neq$ diesel ($p < 0,05$), B100 e controle ($p < 0,001$).

4.3 Análise da composição elementar por fluorescência de raio-X (FRX)

A análise da composição elementar amostrados nos filtros de policarbonato, referentes aos compostos químicos (Mg, Al, Si, P, S, Cl, K, Ca, Ti, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Se, Br, Pb) do grupo controle e do $\text{MP}_{2,5}$ dos combustíveis diesel, B50 e B100, encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6. Valores descritivos da composição elementar dos componentes inorgânicos. Os valores estão apresentados como média e desvio padrão

Parâmetros (ng/m ³)	Controle (n=10)	Diesel (n=22)	B50 (n=13)	B100 (n=20)
	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
Mg	0,00 (0,05)	0,07 (0,16)	0,19 (0,20)	0,07 (0,15)
Al	0,27 (0,45)	0,20 (0,29)	0,07 (0,17)	0,16 (0,27)
Si	0,02 (0,06)	0,00 (0,01)	0,01 (0,02)	0,01 (0,05)
P	0,03 (0,09)	0,01 (0,01)	0,01 (0,02)	0,01 (0,02)
S	0,13 (0,22)	0,46 (0,19)	0,59 (0,18)	0,22 (0,16)
Cl	0,01 (0,02)	0,01 (0,03)	0,02 (0,03)	0,02 (0,04)
K	0,04 (0,03)	0,09 (0,08)	0,16 (0,28)	0,08 (0,06)
Ca	0,03 (0,06)	0,06 (0,06)	0,08 (0,09)	0,01 (0,03)
Ti	0,00 (0,01)	0,00 (0,01)	ND	ND
V	0,01 (0,01)	0,01 (0,01)	ND	0,00 (0,01)
Cr	ND	ND	0,01 (0,01)	ND
Mn	0,00 (0,01)	ND	0,01 (0,01)	0,01 (0,01)
Fe	0,01 (0,02)	0,05 (0,04)	0,07 (0,06)	0,05 (0,06)
Ni	0,01 (0,01)	0,01 (0,01)	0,00 (0,01)	0,01 (0,01)
Cu	0,02 (0,04)	0,02 (0,03)	0,09 (0,11)	0,07 (0,14)
Zn	0,01 (0,02)	0,02 (0,03)	0,10 (0,12)	0,06 (0,11)
Se	0,01 (0,01)	0,02 (0,01)	0,01 (0,01)	0,01 (0,01)
BR	0,02 (0,01)	0,02 (0,01)	0,01 (0,01)	0,01 (0,02)
PB	0,01 (0,01)	0,02 (0,02)	0,01 (0,01)	0,01 (0,02)

ND: não detectado

Destaca-se um aumento dos compostos elementares nas amostras dos filtros do combustível B50, tais como o enxofre (S), magnésio (Mg), potássio (K), zinco (Zn), cobre (Cu), cálcio (Ca), e ferro (Fe) em relação às demais amostras (diesel, B100 e controle) como observado na Figura 9.

Figura 9. Média da concentração dos compostos elementares do MP_{2,5} amostrados nos filtros com ar filtrado (controle), diesel, B50 e B100

4.4 Análise dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

A concentração média total dos HPAs amostrados nos filtros de Teflon mostrou-se significativamente maior no material oriundo da queima do combustível diesel quando comparado ao material da queima dos combustíveis B100, B50 e controle. Os filtros das amostras do material da

queima do combustível B50 possuem valores intermediários da concentração de HPAs em relação às amostras da queima do combustível B100 e controle (Figura 10). Observa-se o mesmo analisando separadamente cada HPA (Figuras 11, 12, 13 e 14).

Figura 10. Média das concentrações de HPAs totais amostrados nos filtros de ar filtrado (controle), diesel, B50 e B100

Figura 11. Média das concentrações de FLR e FEN amostrados nos filtros de ar filtrado (controle), diesel, B50 e B100.

Figura 12. Média das concentrações de BghiP, BeP, CRY e BaA amostrados nos filtros de ar filtrado (controle), diesel, B50 e B100

Figura 13. Média das concentrações de DahA, PYR, NAF e BeACY amostrados nos filtros de ar filtrado (controle), diesel, B50 e B100

Figura 14. Média das concentrações de ANT, BkF, BaP e ACE amostrados nos filtros de ar filtrado (controle), diesel, B50 e B100

A Tabela 7 descreve os resultados em valores mínimos e máximos das amostragens dos HPAs provenientes do ar filtrado (controle) e da queima dos combustíveis diesel, B50 e B100 coletados em filtros de teflon^{TM}. A fração volátil (naftaleno, acenafteno e fluoreno) dos HPAs também foram consideradas nesta análise.

Tabela 7. Valores descritivos dos HPAs. Os valores estão apresentados como valores mínimos e máximos

HPAs (ng/m ³)	Controle (n=6)	Diesel (n=14)	B50 (n=9)	B100 (n=9)
	Min – Max	Min – Max	Min – Max	Min – Max
NAF	0.27 – 0.35	4.57 – 149.78	0.33 – 12.5	1.3 – 14.1
ACE	ND	ND	0.83 – 6	0.3 – 0.4
FENO	21.88 – 51.07	745.8 – 2861.83	5.17 – 71.2	ND
ANT	1.63 – 6.65	29.33 – 92.58	0.5 – 4.4	ND
FLR	26.52 – 103.85	958.83 – 4402.02	28.8 – 52.4	15.8 – 40.3
PYR	3.7 – 13.15	81.77 – 197.82	2.1 – 52.5	2.6 – 9.7
BaA	1.82 – 14.32	99.18 – 321.2	29.5 – 80.3	28 – 45.5
CRY	37 – 12	15.77 – 103.88	20.7 – 196.4	ND
BeACY	1.03 – 6.68	6.05 – 574.93	13.8 – 90.83	6.1 – 11.4
BkF	0.05 – 0.43	7.33 – 87.63	2 – 6.7	0.5 – 2.8
BaP	0.08 – 0.45	0.92 – 9.72	0.8	0.3 – 0.7
BeP	0.7 – 23.78	19.62 – 811.98	7.67 – 172.8	15.5 – 28.3
DahA	1.37 – 4.12	25.85 – 585.2	13.5 – 20.5	ND
BghiP	0.88 – 7.03	128.15 – 1803.82	4.33 – 22.8	ND
Σ PAHs	18.7 – 150.1	860.93 – 8019.55	55.17 – 644.7	27.6 – 95.8

ND: não detectado

4.5 Análise dos compostos orgânicos voláteis (COVs)

Os valores da concentração total dos COVs para cada amostra dos combustíveis (controle, diesel, B50 e B100) estão demonstrados na Figura 15. Observa-se que houve uma maior emissão dos COVs na queima do combustível diesel em relação as demais amostras (controle, B50 e B100). Adicionalmente nota-se que a amostra do combustível B100 emitiu uma maior concentração de COVs quando comparada ao combustível B50.

Figura 15. Valores pontuais da concentração total dos COVs amostrados nos gases oriundos da emissão do ar filtrado (controle) e dos combustíveis diesel, B100 e B50

Na amostragem pontual da fração orgânica volátil do ar filtrado (controle) e do material da queima dos combustíveis diesel, B50 e B100 foi possível a detecção de 97 COVs, como descrito na Tabela 8.

Tabela 8. Valores Pontuais dos COVs mensurados nas amostras dos gases oriundos da emissão do ar filtrado e dos combustíveis diesel, B50 e B100

Concentração ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Controle	Diesel	B50	B100
Aromáticos				
Tolueno	59,87	223,03	56,22	76,12
p-xileno	44,98	320,93	55,28	182,20
1,2,4 trimetilbenzeno	38,21	99,28	34,70	124,98
Etilbenzeno	26,48	216,38	38,48	110,37
o-xileno	26,22	182,42	28,20	112,67
m-xileno	22,65	180,88	27,83	92,09
1-etil-4-metilbenzeno	19,93	70,58	22,52	93,65
1,3,5 trimetilbenzeno	18,85	91,62	20,26	83,61
1,2,3-trimetilbenzeno	23,37	42,98	20,05	57,40
1-metil-3-propilbenzeno	11,65	22,71	13,81	29,81
1-etil-3-metilbenzeno	16,21	97,58	13,47	56,10
Propilbenzeno	10,61	89,61	13,65	63,07
1-etil-2-metilbenzeno	9,97	40,73	11,64	47,08
Estireno	13,63	ND	7,96	18,50
Isopropilbenzeno	10,34	74,24	8,30	40,95
Indano	10,43	12,40	7,19	14,76
1,2-dietilbenzeno	4,15	10,34	4,74	11,67
Benzeno	1,20	63,89	33,75	59,32
Alcanos				
Nonano	44,83	636,37	83,11	427,16
Decano	63,24	197,92	66,17	238,85
Undecano	64,84	64,19	67,31	92,40
Metilcicloexano	8,62	487,50	47,18	59,52
Octano	14,11	689,73	50,50	184,01
Heptano	5,28	373,72	39,09	47,15
1,1,3-trimetilcicloexano	12,90	478,12	33,40	109,89
2-metil-heptano	6,16	385,95	28,98	67,17
1,2,4-trimetilcicloexano	12,45	352,00	26,67	108,87
trans-1,4-dimetilcicloexano	6,29	364,73	27,28	60,33
Etilcicloexano	8,74	325,39	24,02	90,27
Propano	6,07	11,34	30,42	8,89
Ciclohexano	2,71	86,93	11,31	9,31
1-etil-2-metil-cicloexano	13,67	176,99	15,94	75,15

Continua...

Continuação Tabela 8

Concentração ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Controle	Diesel	B50	B100
Alcanos				
Isopentano	14,10	27,78	12,54	8,17
3-metil hexano	3,34	144,11	29,53	21,56
trans-1-etil-3-metil-cicloexano	8,87	170,32	14,80	70,40
1-metil-1-propilcicloexano	13,81	35,73	14,66	41,00
Etano	2,90	17,27	29,44	19,19
trans-1,3-dimetilcicloexano	4,84	207,06	15,56	36,99
Butano	12,95	21,91	12,59	7,43
Hexano	2,02	62,32	13,17	10,66
1,3,5-trimetilcicloexano	7,93	154,64	13,15	49,06
Metilciclopentano	1,47	74,50	17,36	11,97
2-metil hexano	1,31	92,59	13,53	10,79
3-metil-heptano	2,88	157,74	13,01	28,48
cis-1,2-dimetilciclopentano	2,25	156,16	13,87	10,99
Pentano	4,11	27,88	10,00	6,16
1,2,3-trimetilciclopentano	1,72	137,27	11,55	17,70
cis-1-etil-3-metil-ciclopentano	ND	161,79	11,78	28,79
Etilciclopentano	1,99	110,58	11,52	14,75
cis-1-etil-4-metil-cicloexano	5,25	103,75	8,91	44,94
cis-1,3-dimetilciclopentano	1,63	80,09	9,99	8,70
cis-1,4-dimetilcicloexano	2,44	115,03	8,35	20,52
1,2,4-trimetilciclopentano	1,39	96,71	12,37	12,20
trans-1,3-dimetilciclopentano	1,00	66,62	8,17	7,36
2-metil pentano	1,54	29,29	17,68	10,32
cis-1,3-dimetilcicloexano	2,33	114,72	8,38	21,52
2,3-dimetilpentano	1,05	54,57	8,11	6,89
Isobutano	2,91	6,06	5,92	2,35
2,3-dimetil-hexano	1,13	76,97	7,05	10,33
3-metil pentano	1,51	15,70	5,10	4,46
1,1,3-trimetilciclopentano	1,29	44,96	4,36	5,74
1,2,3-trimetilcicloexano	0,85	44,51	5,09	12,11
butilciclopentano	0,88	45,72	4,54	8,37
1,1-dimetilciclopropano	0,90	7,41	3,47	1,63
ciclopentano	ND	5,35	1,82	1,05
1,1-dimetilciclopentano	ND	15,90	2,00	1,75

Continua...

Conclusão Tabela 8

Concentração ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Controle	Diesel	B50	B100
Alcanos				
2,2-dimetilbutano	ND	ND	ND	ND
2-metiloctano	ND	ND	ND	48,03
4-metil-octano	ND	302,43	26,13	127,04
Alcenos				
Eteno	4,00	558,25	502,68	383,40
1-buteno	1,52	97,72	53,02	24,65
Propeno	1,23	291,88	163,72	88,93
trans-2-penteno	2,10	10,12	4,51	2,74
3-etil-ciclopenteno	ND	ND	1,93	ND
trans-1-etil-3-metil-ciclopentano	2,92	ND	ND	ND
2-metil-2-buteno	2,20	13,81	5,40	2,20
2-penteno-4-metil	0,53	ND	0,69	ND
cis-2-penteno	0,75	5,02	2,44	1,29
4-metil-2-penteno	ND	ND	2,14	1,60
trans-2-buteno	ND	10,05	5,52	2,73
cis-2-buteno	ND	9,80	4,41	2,61
1-penteno	0,28	9,84	3,49	1,47
ciclopenteno	ND	7,84	5,56	2,67
3-metil-1-buteno	ND	7,32	3,91	ND
2-metil-1-penteno	ND	23,15	5,31	3,77
Hexeno	ND	16,57	17,90	7,67
3-metil-ciclopenteno	ND	4,65	2,42	1,27
1-metilciclopenteno	ND	5,33	2,44	1,24
3-hepteno	0,99	ND	ND	ND
3-hexeno-3-metil	ND	2,20	1,00	0,81
4-octeno	ND	ND	7,39	ND
2,6-dimetil-4-octeno	ND	59,31	5,10	24,35
Alcadieno				
Isopreno	1,99	19,27	7,34	4,27
1,3-butadieno	ND	81,27	54,53	35,51
but-1-eno-3-ino	ND	6,72	3,19	3,18
pent-3-en-1-ino	ND	20,89	12,11	11,36
Σ COVs	775,29	10716,94	2253,07	4210,40

ND: não detectado

Dentre os COVs analisados, observa-se uma maior concentração de 30 compostos nas amostras (controle, diesel, B50 e B100). A seguir, estão descritos os COVs de maior predomínio em cada amostra:

Controle: undecano, decano, tolueno, p-xileno, nonano, 1,2,4-trimetilbenzeno, etilbenzeno, o-xileno, 1,2,3-trimetilbenzeno, m-xileno, 1-etil-4-metilbenzeno, 1,3,5-trimetilbenzeno, 1-etil-3-metilbenzeno, octano, isopentano.

Diesel: octano, nonano, eteno, metilcicloexano, 1,1,3-trimetilcicloexano, 2-metil-heptano, heptano, trans-1,4-dimetilcicloexano, 1,2,4-trimetilcicloexano, etilcicloexano, p-xileno, 4-metil-octano, propeno, tolueno, etilbenzeno.

B50: eteno, propeno, nonano, undecano, decano, tolueno, p-xileno, 1,3-butadieno, 1-butenos, octano, metilcicloexano, heptano, etilbenzeno, 1,2,4-trimetilbenzeno, benzeno.

B100: nonano, eteno, decano, octano, p-xileno, 4-metil-octano, 1,2,4-trimetilbenzeno, o-xileno, etilbenzeno, 1,1,3-trimetilcicloexano, 1,2,4-trimetilcicloexano, 1-etil-4-metilbenzeno, undecano, m-xileno, etilcicloexano.

Os níveis de emissão para os compostos aromáticos, alcanos, alcenos e alcadienos estão descritos na Figura 16. O ar filtrado (controle) continha 9% de aromáticos, 3% de alcanos, 1% de alcenos e 1% de

alcadienos; o material da queima do diesel emitiu 47% de aromáticos, 68% de alcanos, 45% de alcenos e 49% de alcadienos; o material da queima do B50 emitiu 11% de aromáticos, 8% de alcanos, 32% de alcenos e 29% de alcadienos e o material da queima do B100 emitiu 33% de aromáticos, 21% de alcanos, 22% de alcenos e 21% de alcadienos.

Figura 16. Concentração pontual dos COVs (aromáticos, alcanos, alcenos e alcadienos) amostrados nos gases oriundos do ar filtrado (controle) e da queima dos combustíveis diesel, B100 e B50

4.6 Análise da frequência cardíaca, variabilidade da frequência cardíaca, pressão arterial

Os valores absolutos da FC, VFC (SDNN, RMSSD, BF, AF, BF/AF) e da PA nos tempos pré, 30 e 60 minutos após a exposição, estão descritos na Tabela 9. A Tabela 10 descreve a variação dos valores nos tempos 30 e 60 minutos após a exposição em relação ao tempo pré-exposição. Não houve interação entre tempo e grupo para os índices de FC, VFC (SDNN, RMSSD, BF, AF, BF/AF) e PA mensurados nos grupos expostos (controle, diesel, B50 e B100). Os valores nos tempos 30 e 60 minutos após a exposição foram maiores para os registros: RMSSD no grupo diesel ($p < 0,05$) quando comparados ao grupo controle; BF nos grupos diesel ($p < 0,01$) e B100 ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle; FC no grupo B100 ($p < 0,05$) quando comparado ao controle. Não houve diferenças estatisticamente significativas quanto aos valores do SDNN, AF, razão BF/AF e PA entre os grupos expostos ao ar filtrado (controle) e a queima dos combustíveis diesel, B50 e B100 (Figura 17).

Tabela 9. Valores descritivos absolutos da VFC (SDNN, RMSSD, BF, AF, BF/AF), FC e PA de cada grupo exposto na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100). Os valores estão apresentados como média, desvio padrão, mínimo e máximo

	Controle (n=20)	Diesel (n=20)	B50 (n=16)	B100 (n=15)
Parâmetros	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
	Min – Max	Min – Max	Min – Max	Min – Max
SDNN Pré (ms)	28,45 (16,02)	15,72 (14,4)	23,45 (23,32)	17,06 (5,39)
	4,67 – 60,77	3,2 – 53,66	6,54 – 93,56	8,33 – 28,29
SDNN 30 (ms)	16,89 (9,57)	15,58 (10,74)	20,72 (12,92)	17,92 (13,27)
	4,17 – 47,65	3,96 – 43,27	4,76 – 43,94	6,7 – 55,51
SDNN 60 (ms)	22,34 (19,32)	24,27 (22,95)	19,01 (12,68)	20,81 (14,93)
	5,12 – 69,33	4,47 – 111,91	5,02 – 49,4	4,89 – 55,38
RMSSD Pré (ms)	37,01 (22,13)	19,68 (18,75)	30,49 (29,24)	20,35 (8,99)
	5,7 – 80,95	4,85 – 70,03	8,39 – 121,44	4,55 – 36,8
RMSSD 30 (ms)	19,94 (11,51)	20,02 (14,9)	21,93 (14)	26,12 (16,28)
	4,22 – 43,12	4,69 – 56,77	7,52 – 50,23	6,36 – 51,44
RMSSD 60 (ms)	26,9 (24,09)	31,11 (23,61)	27,16 (19,76)	25,05 (14,96)
	6,21 – 93,64	6,09 – 111,01	7,27 – 73,65	6,74 – 56,29
FC Pré (bpm)	401,11 (56,15)	382,01 (71,21)	413,81 (40,32)	362,53 (49,43)
	305,69 – 496,86	264,98 – 519,29	334,84 – 466,98	290,73 – 470,76
FC 30 (bpm)	395,03 (45,49)	392,62 (57,08)	405,95 (32,64)	406,36 (57,01)
	333,29 – 514,69	284,95 – 507,04	340,34 – 467,51	256,07 – 477,77
FC 60 (bpm)	352,68 (41,51)	352,07 (40,72)	374,32 (47,81)	361,04 (52,32)
	268,32 – 434,59	276,14 – 409,85	310,22 – 461,58	254,27 – 433,53

Continua...

Conclusão Tabela 9

	Controle (n=20)	Diesel (n=20)	B50 (n=16)	B100 (n=15)
Parâmetros	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
	Min – Max	Min – Max	Min – Max	Min – Max
BF Pré (ms ²)	74,26 (76,98)	12,38 (25,36)	31,02 (58,54)	19,89 (25,75)
	0,48 – 239,19	0,09 – 110,25	0,4 – 236,73	1,29 – 88,94
BF 30 (ms ²)	12,51 (12,82)	35,26 (74,94)	31,94 (60,89)	21,17(28,27)
	0,41 – 47,91	0,36 – 261,07	0,55 – 240,08	0,54 – 88,26
BF 60 (ms ²)	34,74 (73,79)	36,25 (86,73)	27,33 (39,93)	55,03 (122,97)
	1,29 – 267,92	0,66 – 378,58	0,21 – 154,1	0,26 – 477,62
AF Pré (ms ²)	28,5 (33,33)	13,44 (24,61)	14,87 (20,9)	9,23 (10,8)
	0,18 – 105,6	0,02 – 77,59	0,31 – 77,31	0,43 – 32,78
AF 30 (ms ²)	10,53 (9,93)	14,59 (22,3)	21,46 (53,93)	15,78 (16,9)
	0,19 – 29,97	0,14 – 77,46	0,3 – 220,84	0,51 – 51,72
AF 30 (ms ²)	19,03 (37,19)	32,74 (75,93)	19,87 (42,58)	35,29 (69,8)
	0,78 – 158,67	0,32 – 310,8	1,05 – 176,15	0,26 – 262,52
BF/AF Pré	3,72 (3,43)	1,98 (1,59)	2,16 (2,48)	2,97 (2,77)
	1,2 – 15,22	0,53 – 6,79	0,52 – 11,1	0,76 – 11,48
BF/AF 30	2,21 (2,91)	2,45 (2,18)	2,1 (1,62)	1,48 (0,69)
	0,37 – 13,49	0,27 – 7,49	0,74 – 5,75	0,2 – 2,75
BF/AF 60	2,09 (1,7)	1,68 (0,94)	2,12 (2,59)	1,6 (0,72)
	0,39 – 6,73	0,55 – 3,61	0,2 – 11,1	0,62 – 3,23
PA Pré (mmHg)	99,43 (29,42)	110,63 (26,99)	98,04 (22,51)	109,82 (20,96)
	64,05 – 171,38	72,48 – 165,67	56,86 – 145,55	81,58 – 141,75
PA 30 (mmHg)	123,86 (35,38)	106,99 (21,92)	103,09 (24,52)	110,78 (30,25)
	68,15 – 182,52	61,38 – 156,63	73,64 – 148,5	61,8 – 167,3
PA 60 (mmHg)	97,34 (16,42)	102,16 (30,02)	103,37 (13,3)	115,52 (31,99)
	74,38 – 139,69	61,44 – 168,63	85,03 – 129,94	60,22 – 169,23

Tabela 10. Valores descritivos da variação de VFC, FC e PA em relação aos tempos 30 e 60 minutos para os grupos expostos na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100). Os valores estão apresentados como média, desvio padrão, mínimo e máximo

Parâmetros	Controle (n=20)	Diesel (n=20)	B50 (n=16)	B100 (n=15)
	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
	Min – Máx	Min – Máx	Min – Máx	Min – Máx
SDNN 30 (ms)	-11,56 (13,3) 41,61 – 9,86	-0,13 (15,65) 36,42 – 29,14	-5,54 (27,84) -5,54 – 27,84	3,65 (14,94) 3,65 – 14,94
SDNN 60 (ms)	-6,11 (21,11) -55,66 – 37,77	8,55 (26,24) -29,83 – 105,38	-4,45 (28,32) -81,73 – 33,21	3,75 (17,34) -15,94 – 41,1
RMSSD 30 (ms)	-17,07 (16,55) -45,93 – 15,16	0,34 (19,98)* -45,77 – 38,52	-8,56 (34,14) -110,36 – 33,05	5,77 (20,68) -18,33 – 46,89
RMSSD 60 (ms)	-10,11 (26,27) -67,65 – 38,48	11,44 (26,17)* -34,68 – 101,96	-5,43 (34,42) -105,14 – 32,17	6,81 (23,41) -21,86 – 57,41
FC 30 (bpm)	-6,08 (52,93) -112,57 – 112,1	10,6 (58,15) -146,9 – 137,01	-7,85 (35,60) -67,34 – 53,38	43,83 (63,96) † -58,47 – 131,26
FC 60 (bpm)	-48,42 (67,79) -158,48 – 79,51	-29,95 (55,92) -154,06 – 62,36	-39,48 (47,4) -117,93 – 89,48	-1,49 (50,58) † -95,62 – 78,77
BF 30 (ms ²)	-61,75 (71,17) -224,72 – 6,85	22,88 (59,88)** -10,62 – 245,21	0,92 (91,47) -234,96 – 224,27	1,28 (41,2)** -88,02 – 80,12
BF 60 (ms ²)	-39,52 (98,33) -208,21 – 168,48	23,87 (84,41)** -29,72 – 377,48	-3,69 (76,92) -229,84 – 150,93	35,15 (130,78)** -77,53 – 471,05
AF 30 (ms ²)	-17,97 (31,42) -105,17 – 10,77	1,15 (29,59) -64,76 – 77,03	6,60 (62,30) -75,93 – 219,42	6,55 (22,36) -27,36 – 51,02
AF 60 (ms ²)	-9,47 (47,17) -104,63 – 130,86	19,31 (76,4) 19,31 – 76,40	-69,98 (310,12) 5,01 – 50,72	-71,50 (147,05) 26,05 – 72,28

Continua...

Conclusão Tabela 10

	Controle (n=20)	Diesel (n=20)	B50 (n=16)	B100 (n=15)
Parâmetros	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
	Min – Máx	Min – Máx	Min – Máx	Min – Máx
BF/AF 30	-1,51 (4,61)	0,46 (2)	-0,06 (3,17)	-1,49 (92,63)
	-14,52 – 9,59	-2,01 – 5,18	-10,01 – 4,43	-9,78 – 0,62
BF/AF 60	-1,63 (4,22)	-0,3 (2,07)	-0,04 (3,75)	-1,37 (2,73)
	-14,41 – 4,21	-5,18 – 2,27	-10,18 – 9,25	-9,27 – 0,91
PA 30 (mmHg)	26,11 (41,07)	-3,64 (39,59)	6,65 (36,04)	0,96 (36,28)
	-47,89 – 118,47	-103,52 – 72,41	-61,41 – 80,64	-37,34 – 75,16
PA 60 (mmHg)	-1,21 (31,52)	-8,47 (45,09)	6,54 (27,63)	5,70 (37,29)
	-70,59 – 37,09	-88,55 – 84,41	-45,98 – 66,50	-54,92 – 64,91

* Controle ≠ diesel ($p < 0,05$)

** Controle ≠ diesel ($p < 0,01$) e B100 ($p < 0,05$)

† Controle ≠ B100 ($p < 0,05$)

Figura 17. Erro padrão da média dos valores da variação de VFC (SDNN, RMSSD, BF, AF, BF/AF) e da FC em relação aos tempos 30 e 60 minutos para os grupos expostos na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100)

4.7 Análise dos parâmetros hematológicos, fatores de coagulação e da medula óssea

Quanto à análise dos parâmetros hematológicos, observou-se um aumento nos seguintes parâmetros: volume corpuscular médio (VCM) no grupo B100 quando comparado aos grupos diesel ($p < 0,01$), B50 ($p < 0,001$) e controle ($p < 0,001$); concentração corpuscular média da hemoglobina (CHCM) no grupo B50 comparado aos grupos diesel ($p < 0,01$) e B100 ($p < 0,001$); leucócitos e linfócitos no grupo B50 em relação ao grupo diesel ($p < 0,05$); plaquetas no grupo exposto B100 comparado aos grupos diesel ($p < 0,05$) e controle ($p < 0,05$); reticulócitos no grupo B50 quando comparado aos grupos controle ($p < 0,01$), diesel ($p < 0,01$) e B100 ($p < 0,05$). Em contrapartida, houve uma diminuição dos seguintes parâmetros hematológicos mensurados: VCM no B50 quando comparado ao grupo diesel ($p < 0,05$); CHCM no grupo B100 quando comparado ao B50 ($p < 0,001$) e controle ($p < 0,05$) (Figura 18).

Figura 18. Erro padrão da média dos parâmetros hematológicos para os grupos expostos na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100)

Na contagem total de células da medula óssea, houve um aumento do infiltrado de células para os grupos expostos a queima do diesel ($p < 0,001$), B50 ($p < 0,05$) e B100 ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle. Na contagem diferencial das células da medula óssea; houve um aumento de metamielócitos no grupo B50 e B100 em relação ao grupo diesel ($p < 0,05$). Houve uma diminuição no número de plasmócitos no grupo B50 quando comparado ao grupo B100 ($p < 0,001$) e controle ($p < 0,01$), da mesma forma, houve uma diminuição no número de monócitos no grupo B50 quando comparado aos grupos diesel ($p < 0,05$) e B100 ($p < 0,05$) (Figura 19).

Figura 19. Erro padrão da média dos parâmetros do mielograma para os grupos expostos na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100)

A exposição aguda ao material da queima dos combustíveis diesel, B50 e B100 não foi capaz de produzir alteração nos seguintes parâmetros laboratoriais: fatores de coagulação (fibrinogênio, tempo de trombina - TT, tempo de protrombina - TP e tempo de tromboplastina parcial ativada – TTPA) (Tabela 11); eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, HCM (concentração média de hemoglobina), RDW CV (amplitude de distribuição do tamanho dos eritrócitos), RDW SD, neutrófilos, eosinófilos, monócitos e basófilos (Tabela 12); mielograma (mielócitos, bastonetes, segmentados, eosinófilos, linfócitos, macrófagos e série vermelha) (Tabela 13).

Tabela 11. Valores descritivos dos parâmetros de coagulação de cada grupo exposto na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100). Os valores estão apresentados como média, desvio padrão, mínimo e máximo

	Controle (n=12)	Diesel (12)	B50 (n=10)	B100 (n=12)
Parâmetros	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
	Min – Max	Min – Max	Min – Max	Min – Max
Fibrinogênio (mg/mL)	131,54 (70,68)	125,58 (51,97)	113 (19,94)	129,92 (59,99)
	0 – 293	80 – 218	80 – 162	80 – 268
TP (segundos)	1,88 (0,54)	1,93 (0,29)	1,90 (0,33)	1,95 (0,24)
	0 – 2,20	1,18 – 2,18	1,15 – 2,03	1,28 – 2,02
TT (segundos)	15,53 (0,85)	15,51 (2,95)	17,27 (1,17)	15,74 (0,49)
	13,9 – 16	11,5 – 22,4	16 – 18,3	14,9 – 16
TTPA (segundos)	23,38 (1,85)	25,99 (5,82)	30,06 (11,84)	24,67 (6,08)
	21,4 – 25,8	20,7 – 37,9	21,60 – 46,20	21,6 – 40,6

Tabela 12. Valores descritivos da série vermelha e branca do hemograma de cada grupo exposto na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100). Os valores estão apresentados como média, desvio padrão, mínimo e máximo

Parâmetros	Controle (n=12)	Diesel (n=10)	B50 (n=10)	B100 (n=11)
	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
	Min – Max	Min – Max	Min – Max	Min – Max
Eritrócito ($10^6/\text{mm}^3$)	9,90 (1,11) 6,62 – 10,74	10,39 (0,44) 9,7 – 11,09	10,22 (0,39) 9,46 – 10,85	9,97 (0,33) 9,14 – 10,32
Hemoglobina (g/dL)	14,75 (1,66) 9,9 – 16,3	15,44 (0,57) 14,5 – 16,1	15,50 (0,50) 14,6 – 16,1	15,11 (0,57) 13,7 – 15,8
Hematócrito (%)	42,90 (4,73) 29,40 – 48,3	45,76 (2,12) 42,3 – 48,8	43,83 (1,76) 40,7 – 46,5	45,43 (1,52) 42,1 – 47,3
HCM (pg)	14,91 (0,16) 14,7 – 15,2	14,86 (0,17) 14,5 – 15,2	15,18 (0,64) 14,7 – 16,7	15,15 (0,14) 14,9 – 15,4
RDW SD (%)	28,52 (1,45) 25,1 – 30,9	28,90 (0,99) 27,1 – 30,8	28,54 (0,75) 27,2 – 30	28,75 (0,52) 27,9 – 29,3
RDW CV (%)	23,12 (1,74) 18,3 – 25,4	23,45 (0,63) 22,4 – 24,5	23,34 (1,13) 20,7 – 25	22,13 (0,53) 21 – 22,7
Neutrófilos ($10^3/\text{mm}^3$)	0,69 (0,23) 0,4 – 1,1	0,62 (0,29) 0,3 – 1,1	0,68 (0,79) 0,1 – 2,7	0,60 (0,30) 0,3 – 1,2
Monócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	0,04 (0,07) 0 – 0,2	0,03 (0,05) 0 – 0,1	0,09 (0,11) 0 – 0,3	0 (0) 0 – 0
Eosinófilos ($10^3/\text{mm}^3$)	0	0	0	0
Basófilos ($10^3/\text{mm}^3$)	0	0	0	0

Tabela 13. Valores descritivos dos parâmetros do mielograma de cada grupo exposto na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100). Os valores estão apresentados como média, desvio padrão, mínimo e máximo

	Controle (n=14)	Diesel (n=11)	B50 (n=11)	B100 (n=10)
Parâmetros (%)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
	Min – Max	Min – Max	Min – Max	Min – Max
Mielócito	1,57 (0,64)	1,18 (0,4)	1,73 (0,65)	1,9 (1,2)
	1 – 3	1 – 2	1 – 3	1 – 4
Bastonete	20,14 (3,5)	17,55 (1,92)	19,27 (3,13)	19,2 (3,99)
	16 – 31	14 – 20	16 – 26	11 – 25
Segmentado	27,42 (5,4)	24,36 (3,67)	24,73 (4,47)	25,2 (5,01)
	22 – 35	21 – 32	18 – 34	19 – 35
Eosinófilo	2,34 (1,88)	2,91 (1,22)	1,45 (1,04)	1 (0)
	1 – 6	1 – 5	0 – 3	1 – 1
Linfócito	17,07 (3,02)	16,91 (1,97)	15,73 (2,41)	18,8 (4,73)
	11 – 21	14 – 20	13 – 20	12 – 25
Macrófago	1,12 (0,64)	1 (0)	0,82 (0,6)	2 (0)
	0 – 2	1 – 1	0 – 2	2 – 2
Série Vermelha	21,78 (9,64)	27,45 (2,5)	26,36 (5,84)	20,3 (5,12)
	8 – 34	24 – 32	20 – 36	13 – 30

4.8 Análise inflamatória pulmonar pelo lavado broncoalveolar e histologia pulmonar

Este estudo demonstrou um aumento na contagem total de células inflamatórias no LBA nos grupos diesel ($p < 0,01$), B50 ($p < 0,001$) e B100 ($p < 0,001$) em comparação ao grupo controle. Na contagem diferencial das

células inflamatórias, houve um aumento no infiltrado de neutrófilos no grupo diesel ($p < 0,05$) e B50 ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle. Houve um aumento no infiltrado de macrófagos alveolares no grupo diesel ($p < 0,01$), B50 ($p < 0,05$) e B100 ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle (Figura 20).

Figura 20. Erro padrão da média dos parâmetros inflamatórios do LBA para os grupos expostos na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100)

Os valores absolutos dos parâmetros inflamatórios mensurados no LBA após 24 horas de exposição estão descritos na Tabela 14. A Tabela 15 descreve os valores em Log10 dos parâmetros inflamatórios do LBA nos grupos controle, diesel, B50 e B100.

Tabela 14. Valores descritivos dos parâmetros inflamatórios do LBA para os grupos expostos na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100). Os valores estão apresentados como média, desvio padrão, mínimo e máximo

	Controle (n=10)	Diesel (n=11)	B50 (n=12)	B100 (n=8)
Células / mL x 10 ⁴	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
	Min – Max	Min – Max	Min – Max	Min – Max
Neutrófilo	0,001 (0,001) 0 – 0,003	0,005 (0,004) 0 – 0,015	0,004 (0,008) 0 – 0,24	0,001 (0,001) 0 – 0,003
Macrofago	4,56 (2,37) 0,10 – 7,48	10,32 (6,43) 0 – 18,18	7,82 (4,60) 0 – 14,52	9,52 (5,88) 0 – 16,66
Total	14,70 (18,63) 3 – 56	61,09 (65,04) 12 – 174	48 (49,08) 12 – 136	45,25 (44,52) 4 – 140

Tabela 15. Valores descritivos em Log10 dos parâmetros inflamatórios do LBA para os grupos expostos na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100). Os valores estão apresentados como média, desvio padrão, mínimo e máximo

	Controle (n=10)	Diesel (n=11)	B50 (n=12)	B100 (n=8)
Células / mL x 10 ⁴	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
	Min – Max	Min – Max	Min – Max	Min – Max
Log10 Neutrófilo	-2,78 (0,20) -3,00 – 2,52	-2,23 (0,26)* -2,55 – -1,83	- 2,21 (0,50)* -2,70 – -1,62	-2,66 (0,08) -2,71 – -2,54
Log10 Macrofago	0,48 (0,62) -1,01 – 0,87	1,11 (0,10)** 0,94 – 1,26	0,90 (0,20)** 0,57 – 1,16	0,99 (0,24)** 0,55 – 1,22
Log10 Total	0,91 (0,46) 0,48 – 1,75	1,58 (0,43)** 1,08 – 2,24	1,50 (0,40)** 1,08 – 2,13	1,47 (0,47)** 0,60 – 2,15

* Diesel e B50 ≠ controle (p < 0,05)

** controle ≠ diesel (p < 0,01), B50 e B100 (p < 0,05)

No parênquima pulmonar foi evidenciado um aumento na contagem total das células inflamatórias para todos os grupos expostos a queima do diesel ($p < 0,01$), B50 ($p < 0,001$) e B100 ($p < 0,001$) em comparação ao grupo controle. Em relação à contagem diferencial das células inflamatórias no parênquima pulmonar, este estudo descreve um aumento no infiltrado das seguintes células: macrófagos alveolares nos grupos expostos ao B50 ($p < 0,01$) e B100 ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle; neutrófilos polimorfonucleares no grupo diesel ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle (Figura 21).

Figura 21. Erro padrão da média dos parâmetros inflamatórios mensurados no parênquima pulmonar para os grupos expostos na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100)

A Tabela 16 descreve os valores absolutos dos parâmetros inflamatórios mensurados no parênquima pulmonar para todos os grupos expostos (controle, diesel, B50 e B100).

Tabela 16. Valores descritivos dos parâmetros inflamatórios mensurados no parênquima pulmonar para os grupos expostos na câmara de inalação (controle, diesel, B50 e B100). Os valores estão apresentados como média, desvio padrão, mínimo e máximo

	Controle (n=9)	Diesel (n=10)	B50 (n=12)	B100 (n=12)
Parâmetros	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)	Média (DP)
	Min – Max	Min – Max	Min – Max	Min – Max
Macrofago	2,11 (1,62) 0 – 5	4,30 (2,06) 0 – 7	6,58 (1,93)* 4 – 10	5,83 (3,88)* 2 – 14
Netrófilo	2,44 (1,51) 0 – 5	5,30 (3,02)** 2 – 10	4,58 (2,15) 2 – 9	4 (2,17) 2 – 10
Total	4,56 (1,59) 1 – 7	10,10 ± 3,90† 5 – 16	11,17 (2,59)† 7 – 16	9,83 (4,04)† 5 – 17

* Controle ≠ B50 ($p < 0,01$) e B100 ($p < 0,05$)

** Diesel ≠ controle ($p < 0,05$)

† controle ≠ diesel ($p < 0,01$), B50 e B100 ($p < 0,001$)

5 DISCUSSÃO

Ressalta-se, em nosso estudo, que mesmo utilizando uma concentração média diária de $MP_{2,5}$ ($23 \mu g/m^3$) abaixo do nível médio diário recomendado pela OMS ($25 \mu g/m^3$) (OMS, 2005), os resultados demonstram que uma única exposição ao material da queima dos combustíveis diesel, B50 e B100 foi capaz de desencadear um desequilíbrio no sistema nervoso autônomo parassimpático, evidenciado pelo aumento da VFC, bem como uma resposta inflamatória pulmonar e sistêmica. Tais efeitos no sistema biológico podem ser melhor compreendidos pela especificação química do $MP_{2,5}$ e dos gases oriundos da queima dos diferentes combustíveis (diesel, B50 e B100 utilizados neste estudo).

De forma consistente, outros estudos têm demonstrado que a queima do diesel é capaz de induzir inflamação pulmonar e sistêmica (Törnqvist et al. 2007; Nemmar et al., 2004; Nemmar et al., 2007; Nemmar et al., 2008; Nemmar et al., 2009). Em contrapartida, este estudo, evidenciou que os animais expostos a queima do biodiesel e da mistura diesel/biodiesel (B50) tiveram um efeito sistêmico mais consistente do que os animais expostos a queima do diesel. Efeito evidenciado pelo aumento no infiltrado de células totais na medula óssea e de metamielócitos nos grupos B50 e B100; pelo aumento do infiltrado de plasmócitos no grupo B50; e pelo aumento do infiltrado de monócitos no grupo B100.

No tecido pulmonar e no LBA do grupo exposto a queima do diesel, houve um aumento no recrutamento de neutrófilos polimorfonucleares. Outros estudos descrevem que após 24 horas da administração sistêmica em ratos (Nemmar et al., 2009), da instilação intra-traqueal em camundongos (Ioune et al., 2005; Yokota et al., 2008) de partículas do diesel há um aumento no infiltrado de neutrófilos polimorfonucleares no LBA, sugerindo que a neutrofilia é causada pela fração orgânica solúvel do diesel, no qual, eleva a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e G-CSF. Em contrapartida os grupos expostos ao B50 e B100 apresentaram um aumento no recrutamento de macrófagos alveolares. Finch et al. (2002) expôs em estudo sub-crônico ratos a queima do biodiesel de soja, via inalação, eles demonstraram um infiltrado de macrófagos alveolares no parênquima pulmonar que perdurou por 28 dias após inalação, sugerindo em seu estudo que esse evento é uma resposta fisiológica normal, pois não houve aumento do infiltrados de neutrófilos polimorfonucleares.

O efeito tanto inflamatório quanto sistêmico de que a inalação do material oriundo da combustão do diesel pode causar no sistema pulmonar, pode ser explicado pelo tamanho aerodinâmico das partículas, que são menores que 2,5 μm (Anselme et al., 2007; Gottipolu et al., 2009). Essas partículas têm a capacidade de atingir as regiões mais distais do pulmão, estimulando a liberação de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos alveolares (Nemmar et al., 2002; Bayram et al., 1998) levando a diminuição da função pulmonar, agravamento de doenças respiratórias como asma e bronquite (Salvi et al., 1999; Sydbom et al., 2001). A administração de

partículas do diesel causa inflamação pulmonar e eventos trombóticos em hamsters (Nemmar et al., 2004), camundongos (Arimoto et al., 2007) e em ratos (Nemmar et al., 2007, Nemmar et al., 2008) e em humanos prejudica a regulação do tônus vascular (Salvi et al., 1999; Mills et al., 2005). Adicionalmente, as partículas inaláveis da queima do diesel induz a uma resposta sistêmica pela liberação de leucócitos e plaquetas pela medula óssea na circulação (Van Eden et al., 2002), levando a alterações dos parâmetros sanguíneos (Schwartz, 2001) tais como fibrinogênio, contagem de eritrócitos e leucócitos, vasoconstrição, alterações de coagulabilidade (Kodavanti et al., 2002; Seaton et al., 1999; Gardner et al., 2000; Baskurt et al., 1990; Bouthillier et al., 1998; Nemmar et al., 2004) ocasionando um aumento na tendência de formação de coágulos e trombos (Gilmour et al., 1996). Tais efeitos trombóticos e sistêmicos foram observados nos animais expostos a queima do B100, em contrapartida, não foram observados efeitos trombóticos nos animais expostos ao diesel.

Estudos controlados em humanos (Liao et al., 1999; Devlin et al., 2003; Brook et al., 2004; Park et al., 2005; Adar et al., 2007) e experimentais (Rivero et al., 2005a, 2005b; Maatz et al., 2009; Pereira et al., 2007) demonstram uma associação entre a poluição atmosférica e o infarto agudo do miocárdio, aumento da FC e diminuição da VFC. A redução da VFC reflete ao aumento da atividade do simpático e/ou redução do tônus vagal parassimpático. Nesse contexto, a avaliação da VFC, FC e PA foram de extrema relevância neste estudo; pois tanto o grupo exposto ao diesel quanto os grupos expostos ao B50 e B100 demonstraram um aumento da

VFC. O aumento da VFC pode ser explicado pelo aumento da atividade do sistema parassimpático (Rhoden et al., 2005) e/ou aumento do tônus vagal parassimpático (Pope et al., 1999).

Estudos recentes demonstraram que através da instilação intratraqueal aguda do PM_{2,5} em ratos Wistar, na dose de 100 µg/mL e 500 µg/mL (Rivero et al., 2005a) e na dose de 50 µg/mL (Maatz et al., 2009), uma redução da VFC após 60 minutos. Por outro lado, a administração sistêmica de MP do diesel em ratos hipertensos gerou um aumento da FC (Nemmar et al., 2009) e em ratos normotensos uma diminuição da FC e da PA (Nemmar et al., 2007) após 24 horas.

De forma esquemática, a Figura 22 descreve os principais achados deste estudo para os diferentes combustíveis testados.

O esquema abaixo resume os principais achados deste estudo:

Figura 22. Efeitos gerados no sistema pulmonar e cardíaco dos camundongos Balb/c

Neste trabalho desenvolvemos um modelo simples e de baixo custo, para a exposição de pequenos animais a queima do combustível diesel e biodiesel e uma mistura de biodiesel/diesel (B50) que possibilitou o estudo da toxicidade cardiovascular, inflamatória e sistêmica. A literatura científica, não é muito rica em estudos sobre a toxicidade via inalação da queima do biodiesel. Apenas um estudo, Finch et al. (2002) utilizou um modelo de exposição ao material da queima do combustível diesel e biodiesel para expor pequenos animais e posteriormente analisar a os efeitos dessa queima no sistema pulmonar, cardíaco, reprodutivo. Neste trabalho, utilizou-se como modelo de exposição um motor a diesel de 6 cilindros sobre um dinamômetro acoplado a uma câmara de inalação, com monitoração contínua da emissão de NO_x, umidade relativa, temperatura, pressão, fluxo e porcentagem de oxigênio.

Em contrapartida, a literatura apresenta inúmeros estudos experimentais de toxicidade da queima do diesel (Campen et al., 2005; Anselme et al., 2007; Gottipolu et al., 2009; Saxena et al., 2009; Sunil et al., 2009) e de exposição controlada em humanos (Törnqvist et al., 2007; Lucking et al., 2008; Peretz et al., 2008a, 2008b; Langrish et al., 2009). Dentre os estudos de toxicidade da queima do diesel experimentais, destacam-se estudos que utilizaram gerador a diesel mono-cilíndro acoplado a uma câmara de inalação, com monitoração contínua do fluxo, emissão de MP, hidrocarbonetos não metano, NO₂ e CO para a análise da toxicidade vascular em camundongos ApoE^{-/-} (Campen et al., 2005) e análise das alterações cardiovasculares em ratos (Anselme et al., 2007); Saxena et al.

(2009) e Gottipolu et al. (2009) utilizaram um gerador a diesel de 4 cilindros de injeção indireta acoplado a uma câmara de inalação, com monitoração contínua da umidade relativa, temperatura, concentração de MP, CO, SO₂, NO₂ para a análise da toxicidade pulmonar em ratos não hipertensos (Wistar Kyoto) e em ratos hipertensos expostos.

Estudos de exposição controlada em humanos também utilizam motores a diesel acoplados a câmara de inalação com monitoração contínua na câmara de inalação da umidade relativa, temperatura, emissão de MP, CO, NO, NO_x, NO₂ e HC para avaliação da toxicidade da queima do diesel sobre o sistema vascular, sistêmico (Törnqvist et al., 2007; Lucking et al., 2008; Langrish et al., 2009), a reatividade vascular (Peretz et al., 2008a) e a VFC (Peretz et al., 2008b). Os compostos orgânicos da queima do diesel, são descritos como geradores de inflamação e estresse oxidativo (Ball et al., 2000; Saldiva et al., 2002; Nemmar et al., 2009; Sunil et al., 2009).

Nesse contexto, este trabalho fez um inventário de emissões para os seguintes parâmetros: massa, fuligem, metais, HPAs, COVs e CO; para descrever qualitativamente e quantitativamente o quanto a queima do biodiesel (B50 e B100) pode emitir a mais e/ou a menos que a queima do diesel. Para comparação utilizamos o cálculo de alteração nas emissões dos diferentes combustíveis, como descrito no relatório da EPA (2002a):

$$\% \text{ alterações nas emissões} = \frac{(\text{emissões}) \text{ com biodiesel} - (\text{emissões}) \text{ sem biodiesel}}{\text{Emissões (sem biodiesel)}} \times 100$$

Neste inventário de emissões dos combustíveis B50 e B100 em relação ao combustível diesel, destaca-se que queima do combustível B50 aumentou as emissões de massa (+21,88%), fuligem (+57,85%), metais (+37,64%) e CO (+21,55%), em contrapartida, reduziu as emissões dos HPAs (-91,77%) e dos COVs (-78,98%) em relação ao diesel. A queima do combustível B100 reduziu as emissões para todos os parâmetros avaliados: massa (-45,93%), fuligem (-38,65%), metais (-22,81%), CO (-60,78%), HPAs (-97,81%) e COVs (-60,71%) em comparação ao diesel (Figura 23).

Figura 23. Emissões médias dos combustíveis B50 e B100 comparadas ao combustível diesel

Similarmente aos achados deste estudo, o inventário de emissões da queima do B100, realizado pela EPA (2002a) demonstra que a queima deste combustível reduz as emissões de CO em 48%, de MP em 47%, e de HPAs em 80% em comparação ao diesel. Chen et al. (2002) também demonstra uma redução nas emissões de MP em 40–49% na queima do B100 em comparação ao diesel. Em contrapartida Sharp (1998) demonstrou que o B100 reduz em torno de 30% as emissões de MP e aumenta em cerca de 40% as emissões do composto orgânico solúvel em relação ao combustível diesel.

Outros estudos também demonstraram que o B100 reduz as emissões de MP, CO e HC e aumenta as emissões de NO_x (parâmetro não avaliado neste estudo) (EPA, 2002a; Graboski et al., 2003; Zou et al., 2003; Yuan et al., 2007; Lapuerta et al., 2008a). O aumento nas emissões de NO_x se deve ao B100 conter mais oxigênio que o diesel, em contrapartida reduz as emissões do MP, HC, CO e fuligem, por oxidar os produtos de combustão mais facilmente (Kegl, 2008; Di et al., 2009). Como produto da queima de combustíveis fósseis, a emissão de fuligem é uma indicadora da emissão veicular (principalmente veículos movidos a diesel), por determinar indiretamente a concentração de carbono elementar no cenário urbano (Watson, 2002). Quanto maior a adição do combustível biodiesel ao combustível diesel, maiores são as emissões de NO_x, gás precursor do ozônio, conhecido como causador de efeitos adversos a saúde, como irritação das vias aéreas, asma e danos pulmonares permanentes (EPA, 2006).

Como destacado no inventário de emissões na Figura 23, as emissões de MP na combustão do B50 aumentou. Este evento pode ser explicado pelo estudo realizado por Karavalakis et al. (2009), no qual, demonstraram que o B20 (20% éster metílico de palma + 80% diesel) aumentou as emissões de MP, sugerindo que esse aumento se deve a baixa volatilidade do biodiesel, o qual, ocasiona o aumento da fração orgânica solúvel.

As emissões do $MP_{2,5}$ proveniente da combustão do B50 foram marcadas pelo aumento nos elementos S, Ca, Fe, Zn, K, Cu, similarmente, o o diesel foi marcado pelos elementos S, Ca, Al, Fe, K, porém em concentrações inferiores ao B50. Turrio-Baldassarri et al. (2004) também caracterizaram a composição elementar do $MP_{2,5}$ presente na queima do diesel e B20, eles também demonstraram uma semelhança na composição dos elementos na queima dos dois combustíveis, no qual, o diesel foi marcado pelos elementos C, S, Si, Cl, K, Ti, V, Ca e o B20 foi marcado pelo elementos C, S, Si, Cl, K. Dentre esses elementos, o enxofre e o ferro são utilizados como indicadores de emissão veicular (Kaegi et al., 2006; Maatz et al., 2009).

As concentrações para os HPAs, individualmente ou somadas, mostraram-se muito maior (1 e/ou 2 ordens de grandeza) nas emissões decorrentes da queima do diesel em relação ao B100. Já nas amostras do B50, os valores da concentração dos HPAs são intermediários, porém se aproximam mais dos valores do B100. Outros estudos também demonstram que quanto maior a adição do biodiesel no diesel, menores

são as emissões de HPAs (Graboski et al., 1998; Turrio-Baldassarri et al., 2004; Correa et al., 2006; Lin et al., 2006).

Mesmo que não seja esperado que os HPAs mais voláteis (naftaleno, acenafteno e fluoreno) sejam encontrados na fração partícula do MP_{2,5}, e sim na fração volátil, por suas características físico-químicas, neste estudo consideramos os compostos voláteis. Convém ressaltar que as assinaturas químicas obtidas pela análise de HPAs são recorrentes, sendo necessários mais dados sobre seu impacto na saúde humana e de outros organismos, não bastando à conclusão de que os combustíveis alternativos geram emissões menores de compostos sabidamente tóxicos.

Os HPAs são amplamente estudados, principalmente o BaP que é classificado como um carcinogênico animal e possivelmente humano (Grupo 2A) (ATSDR, 1995, Genium, 1999). Também utilizado como um indicador de risco carcinogênico (Liao et al., 2006; Chiang et al., 2009).

Nesse contexto, utilizando os 14 HPAs identificados nas amostras da queima dos diferentes combustíveis (diesel, B50 e B100), conduzimos de uma maneira apenas ilustrativa uma análise de risco no desenvolvimento de câncer, considerando uma situação hipotética de exposição crônica para apenas estes compostos. Para tanto, as concentrações dos diferentes HPAs foram convertidos a concentrações equivalentes de BaP através da lista do Fator de Equivalência Tóxica (TEF), sugerido pela Nisbet et al. (1992) em seguida, realizou-se uma análise de risco de desenvolvimento de câncer, baseado no estudo de See et al. (2006) (Quadro 7).

De forma hipotética, os valores do BaP foram usados para estimar o risco de uma população de 1.000.000 de pessoas em desenvolver câncer, além dos casos esperados. Os dados mostraram que dentro de uma população hipotética, haverá aumento de 340 casos de câncer além do esperado para a população exposta as emissões do combustível diesel, 35 casos para a mistura diesel/biodiesel (B50) e de 8 casos para o biodiesel.

Quadro 7. Fator de equivalência tóxico e os modelos matemáticos de estimativa de risco

HPAs	TEF	Modelo Matemático usado
Fenantreno	0,001	$CDI = (Ci \times IR) / BW \text{ ug.kg}^{-1} \cdot d^{-1}$ (1)
Antraceno	0,01	
Fluoranteno	0,001	
Pireno	0,001	$ISF = (IUR \times BW) / IR [\text{ug.kg}^{-1} \cdot d^{-1}]^{-1}$ (2)
Benzo[a]antraceno	0,1	
Criseno	0,01	
Benzo[e]pireno	-	$ELCRi = CDI_i \times ISF$ (3)
Benzo[e]acefenantrileno	0,1	
Benzo[k]fluoranteno	0,1	
Benzo[a]pireno	1	
Dibenzo[a,h]antraceno	1	
Benzo[g,h,i]perileno	0,01	
Indeno[1,2,3-cd]pireno	0,1	

(1) CDI= dose crônica diária; Ci = concentração de HPAs; IR = proporção de inalação; BW = peso corporal. (2) ISF = fator de inalação; IUR = unidade de risco de inalação. (3) ELCRi = aumento do risco de câncer.

Adicionalmente, obtivemos resultados importantes sobre os níveis de emissões dos COVs (aromáticos, alcenos, alcanos e alcadienos) provenientes da queima dos diferentes combustíveis (diesel B50 e B100). Observa-se que a queima do B50 e B100 reduz a emissão os COVs quando comparada ao diesel. Em contrapartida o B100, mesmo emitindo uma menor concentração de COVs em relação ao diesel, elevou as emissões dos compostos orgânicos aromáticos e dos alcanos em relação ao B50. Outros estudos têm descrito que na queima do biodiesel há um aumento das emissões de formaldeído, aldeídos (Mauderly, 1997; Karavalakis et al., 2009) e redução nas emissões de etilbenzeno, tolueno e do m-xileno (Ferreira et al., 2008; Correa et al., 2008; Di et al., 2009). A redução dos BTEX (tolueno, benzeno, etilbenzeno, m-xileno, p-xileno, o-xileno) é de extrema relevância quando se leva em consideração riscos a saúde, pois esses compostos são reconhecidos como: carcinogênicos, mutagênicos e neurotóxicos (ATSDR, 2004).

Sugere-se, neste estudo, que as diferenças entre as emissões dos poluentes avaliados na queima do B50 em relação ao diesel e B100, se deve a capacidade da mistura diesel/biodiesel em promover alterações no processo de combustão, e como consequência elevar os níveis de emissão dos poluentes para esse combustível. Por outro lado, sabe-se que existem diferenças relacionadas a origem do petróleo, método de produção do óleo diesel, tipo de matéria-prima para a produção do óleo vegetal, sendo que essas peculiaridades conferem as características físicas e químicas de cada combustível.

Em nível comercial, o biodiesel é entendido como um combustível limpo, não tóxico, biodegradável que pode ser usados em motores a diesel com e/ou sem alterações. Em questões de saúde pública, a queima do combustível B100 emite menos poluentes atmosféricos do que o diesel. Porém, os achados deste estudo demonstraram que a queima da mistura diesel/biodiesel (B50) e do B100 são potencialmente tóxicos no sistema cardiovascular e pulmonar em relação ao combustível diesel.

6 CONCLUSÃO

O sistema de geração de partículas a partir dos diferentes combustíveis foi capaz de fornecer resultados rápidos e fidedignos sobre a especificidade química dos diferentes combustíveis, bem como dos efeitos tóxicos deste tipo de emissão no sistema pulmonar, cardíaco e sistêmico de camundongos Balb/c.

- ➡ A queima do diesel aumentou as emissões de HPAs e COVs em relação ao B50 e B100; a queima do B50 aumentou as emissões de massa (concentração de material particulado), fuligem, metais e CO em relação ao diesel e B100.
- ➡ Houve uma associação positiva entre a exposição dos combustíveis (diesel e B100) e o aumento da VFC.
- ➡ Para todos os grupos expostos houve uma resposta inflamatória pulmonar, evidenciada por um infiltrado de neutrófilos e macrófagos no grupo exposto ao diesel e B50 e um infiltrado de macrófagos no grupo exposto ao B50 e B100.
- ➡ A inflamação sistêmica, evidenciada pelo aumento de leucócitos e plaquetas, foi positivamente associada com a exposição dos grupos a queima do B50 e B100.

Neste contexto, destaca-se a importância de políticas de saúde pública e programas voltados a redução na emissão de poluentes atmosféricos, com ênfase na frota veicular, que, constitui um dos principais e mais crescentes contribuidores na emissão de poluentes na atmosfera, problema ocasionado pela falta de planejamento e desenvolvimento de transporte alternativo.

Estudos adicionais são de extrema necessidade e importância, para avaliar mais profundamente as emissões e os possíveis efeitos tóxicos no sistema cardiovascular e pulmonar decorrentes da exposição às emissões derivadas da queima de combustíveis, de forma a compreendermos melhor os efeitos fisiopatológicos envolvidos.

7 REFERÊNCIAS

Ackland ML, Zou L, Freestone D, Wasssenburg VS, Michalczyk AA. Diesel exhaust particulate matter induces multinucleate cells and zinc transporter-dependent apoptosis in human airway cells. *Immunol Cell Biol.* 2007; 85(8):617-22.

Adar SD, Gold DR, Coull BA, Schwartz J, Stone PH, Suh H. *Epidemiology.* 2007; 18(1):95-03.

ANP. Agência Nacional do Petróleo. Lei ANP nº 11.097 de 13.01.2005 – DOU 14.01.2005.

ANP. Agência Nacional do Petróleo. Resolução ANP nº 15 de 17.07.2006 – DOU 19.07.2006.

ANP. Agência Nacional do Petróleo. Resolução ANP nº 32 de 16.10.2007 – DOU 17.13.2007.

ANP. Agência Nacional do Petróleo. Resolução ANP nº 43 de 24.12.2008 – DOU 26.12.2008.

ANP. Agência Nacional do Petróleo. Resolução ANP nº 7 de 19.03.2008 – DOU 20.03.2008.

Anselme F, Lorient S, Henry JP, Dionnet F, Napoleoni JG, Thuillez C, Morin JP. Inhalation of diluted diesel engine emission impacts heart rate variability and arrhythmia occurrence in a rat model of chronic ischemic heart failure. *Arch Toxicol.* 2007; 81:299-07.

Araujo JA, Barajas B, Kleinman M, Wang X, Bennett BJ, Gong KW, Navab M, Harkema J, Sioutas C, Lusk JA, Nel AE. Ambient Particulate Pollutants in the Ultrafine Range Promote Early Atherosclerosis and Systemic Oxidative Stress. *Circ Res.* 2008; 102:589-96.

Arbex MA, Conceição GMS, Cendon SP, Arbex FF, Lopes AC, Moysés EP, Santiago SL, Saldiva PHN, Pereira LAA, Braga AFL. Urban air pollution and chronic obstructive pulmonary disease-related emergency department visits. *J Epidemiol Community Health.* 2009; 63:777-783.

Arimoto T, Takano H, Inoue K, Yanagisawa R, Yoshino S, Yamaki K, Yoshikawa T. Pulmonary exposure to diesel exhaust particle components enhances circulatory chemokines during lung inflammation. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2007; 20(1):197-01.

ATDSR. Agency for toxic substances and disease registry. Toxicological profile for Benzo(a)pyrene. 1995. U.S Department of health and human services. Atlanta, US.

ATDSR. Agency for toxic substances and disease registry. Toxicol profile for Benzene. 2004. U.S Department of health and human services. Atlanta, US.

Ball JC, Straccia AM, Young WC, Aust AE. The formation of reactive oxygen species catalyzed by neutral, aqueous extracts of NIST ambient particulate matter and diesel engine particles. *J Air Waste Manag Assoc*. 2000; 50:1897-03.

Baskurt OK, Levi E, Caglayan S, Dikmenoglu N. Hematological and hemorheological effects of air pollution. *Arch Environ Health*. 1990; 45:224-28.

Bayram H, Devalia JL, Sapsford RJ, Ohtoshi T, Miyabara Y, Sagai M, Davies RJ. The effect of diesel exhaust particles on cell function and release of inflammatory mediators from human bronchial epithelial cells in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998; 18(3):441-8.

Bouthillier L, Vincent R, Goegan P, Adamson IYR, Bjarnason S, Stewart M, Guénette J, Potvin M, Kumarathasan P. Acute affects of inhaled urban particles and ozone. Lung morphology, macrophage activity and plasma endothelin-1. *Am J Pathol*. 1998; 153:1873-84.

Braga ALF, Saldiva PHN, Pereira LAA, Menezes JJC, Conceição GMS, Lin CA, Zbonetti A, Schwartz J, Dockery DW. Health effects os air pollution exposure on children and adolescents in São Paulo, Brazil. *Pediatric Pulmonology*. 2001, 31:106 -13.

Braun S, Appel LG, Schmal M. A poluição gerada por máquinas de combustão interna movidas a diesel – a questão dos particulados. Estratégias atuais para a redução e controle das emissões e tendências futuras. *Quim. Nova*. 2003; 27(3):472-82.

Brook RD, Franklin B, Cascio W, Hong Y, Howard G, Lipsett M, Luepker R, Mittlemam M, Samet J, Smith SC Jr, Target 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; 109:2655-71.

Bunger J, Krah J, Kranke HU, Munack A Hallier E. Mutagenic and cytotoxic effects of exhaust particulate matter of biodiesel compared to fossil diesel fuel. *Mut Res*. 1998; 415(1-2):13-23.

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

Bunger J, Muller MM, Krah J, Baum K, Weigel A, Hallier E, Schulz TG. Mutagenicity of diesel exhaust particles from two fossil and two plant oil fuels. *Mutagenesis*. 2000b; 15(5):391-97.

Bünger J, Krah J, Munack A, Ruschel Y, Schröder O, Emmert O, Westphal G, Müller M, Hallier E, Brüning T. Strong mutagenic effects of diesel engine emissions using vegetable oil as fuel. *Arch Toxicol*. 2007 81:599-03.

Campen MJ, Babu NS, Helms GA, Pett S, Wernly J, Mehran R, McDonald JD. Nanoparticulate Components of diesel exhaust promote constriction in coronary arteries from ApoE^{-/-} mice. *Toxicol Sciences*. 2005; 88(1):95-02.

Canakci M. Combustion characteristics of a turbocharged DI compression ignition engine fueled with petroleum diesel fuels and biodiesel. *Bioresour Technol*. 2007; 98(6):1167-75.

Cançado JDF, Braga A, Pereira LAA, Arbex MA, Saldiva PHN, Santos UP. Repercussões clínicas da exposição à poluição atmosférica. *J Bras Pneumol*. 2006; 32(Supl 1):S5-S11.

Carraro E, Locatelli AL, Ferrero C, Fea E, Gilli G. Biological activity of particle exhaust emissions from light-duty diesel engines. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 1997; 16(2-3):101-109.

Cendon S, Pereira LAA, Braga ALF, Conceição GMS, Junior AC, Romaldini H, Lopes AC, Saldiva PHN. Efeitos da poluição do ar no infarto do miocárdio. *Rev Saúde Pública*. 2006; 40(3):414-19.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Estudos investigativos da ocorrência de ozônio troposférico na região de Sorocaba de São Paulo - 2004. Cetesb, 81p., São Paulo, 2004.

CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Relatório de qualidade do ar no Estado de São Paulo - 2008. Cetesb, 354p., São Paulo, 2009.

Chatterjje S. Retrofit emission controle technologies for heavy duty Diesel engines – The state of art. Jonhson Matthey Catalysts. BAQ; 2004.

Chiang KC, Chio CP, Chiang YH, Liao CM. Assessing hazardous risks of human exposure to temple airborne polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Hazard Mater.* 2009; 166(2-3):676-85.

Chen YC, Wu CH. Emissions of submicron particles from a direct injection diesel engine by usinbg biodiesel. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng.* 2002; 37(5):829-43.

Cifuentes L, Victor H. Borja-Aburto VH, Gouveia N, Thurston G, Davis DL. Assessing the Health Benefits of Urban Air Pollution Reductions Associated with Climate Change Mitigation (2000–2020): Santiago, São Paulo, México City, and New York City. *Environmental Health Perspectives.* 2001;109(3):419-25.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 18 de 06.05.1986. Dispõe sobre a criação do Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores – PROCONVE. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 17.06.1986.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 03 de 28.06.1990. Estabelece padrões para a qualidade do ar. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 20.08.1990.

CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução 315 de 29.10.2002. Estabelece limites máximos de emissão de poluentes para os motores destinados a veículos pesados novos, nacionais e importados. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 29.10.2002.

Conceição GMS, Miraglia SGEK, Kishi HS, Saldiva PHN, Singer JM. Air Pollution and Child Mortality: A Time–Series Study in São Paulo, Brazil. *Environ Health Perspect.* 2001; 109(suppl 3):347-50.

Correa SM, Arbilla G. Aromatic Hidrocarbons emissions in Diesel and Biodiesel Exhaust. *Atmospheric Environment.* 2006; 40:6821-26.

Correa SM, Arbilla G. Carbonyl emissions in diesel and biodiesel exhaust. *Atmospheric Environment.* 2008; 42:769-65.

Damaceno-Rodrigues NR, Veras MM, Negri EM, Zanchi ACT, Rhoden CR, Saldiva PHN, Dolhnikoff M, Caldini EG. Effect of pre- and postnatal exposure to urban air pollution on myocardial lipid peroxidation levels in adult mice. *Inhalation Toxicology.* 2009; 21(13): 1129-37.

DENATRAN. Departamento Nacional de Trânsito. Transporte e meio ambiente. Rio de Janeiro.1980.

DENATRAN. Departamento Nacional de Trânsito. Dados da frota veicular de São Paulo, 2008. [Disponível: www.denatran.gov.br/frota.htm – acessado em 10.11.2009].

Devlin RB, Ghio AJ, Kehrl H, Sandres G, Cascio W. Elderly humans exposed to concentrated air pollution particles have decreased heart rate variability. *Eur Respir J Suppl.* 2003; 40:60s-80s.

Di Y, Cheung CS, Huang Z. Experimental investigation on regulated and unregulated emissions of a diesel engine fueled with ultra-low sulfur diesel fuel blended with biodiesel from waste cooking oil. *Sci Total Environ.* 2009; 407(2):835-46.

DHHS. Department of Health and Human Services. Toxicological Profile for Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. US DHHS, 1990. PB91-1815, Washington.

Dundar M, Kocak I, Culhaci N. Effects of long-term passive smoking on the diameter of glomeruli in rats: Histopathological evaluation. *Nephrology.* 2004; 9:53-57.

EPA. Environmental Protection Agency of New South Wales Government, NSW. State of the Environment Report 1997. NSW Environment Protection Authority, Sydney.1997a [disponível: www.epa.nsw.gov.au/soe/97/index.htm].

EPA. Environmental Protection Agency. Compendium method TO-14A: Determination of volatile organic compounds (VOCs) in ambient air using specially prepared canisters with subsequent analysis by gas chromatography, In: Compendium of methods for the determination of toxic organic compounds in ambient air, 1999a. 2nd Edition.

EPA. Environmental Protection Agency. Compendium method TO-15: Determination of volatile organic compounds (VOCs) in ambient air using specially prepared canisters with subsequent analysis by gas chromatography, In: Compendium of methods for the determination of toxic organic compounds in ambient air, 1999b. 2nd Edition.

EPA. Environmental Protection Agency. Air Quality Criteria for Carbon Monoxide Office of Research and Development. Estados Unidos: US EPA, 2000. 600/P-99/001F, Washington.

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

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

Farhat SCL, Paulo RLP, Shimoda TM, Conceição GMS, Lin CA, Braga ALF, Warth MPN, Saldiva PHN. Effect of air pollution on pediatric respiratory emergency room visits and hospital admissions. Air pollution and respiratory morbidity. *Braz J Med Biol Res.* 2005; 38(2):227-35.

Ferreira SL, Santos AM, Souza GR, Polito WL, Módolo DL. Análise por Cromatografia Gasosa de BTEX nas emissões de motor de combustão interna alimentado com Diesel e mistura Diesel-Biodiesel (B10). *Quim Nova.* 2008; 31(3):539-45.

Filho PMA, Pereira LAA, Arbex FF, Arbex M, Conceição GM, Santos UP, Lopes AC, Saldiva PHN, Braga ALF, Cendon S. Effect of air pollution on diabetes and cardiovascular diseases in São Paulo, Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2008; 41:526-32.

Finch GL, Hobbs CH, Blair LF, Barr EB, Hahn FF, Jaramillo RJ, Kubatko JE, March TH, White RK, Krone JR, Ménache MG, Nikula KJ, Mauderly JL. Effects of subchronic inhalation exposure of rats to emissions from a diesel engine burning soybean oil-derived biodiesel fuel. *Inhalation Toxicology.* 2002; 14:1017-48.

Freitas C, Bremner AS, Gouveia N, Pereira LAA, Saldiva PHN. Interações e óbitos e sua relação com a poluição atmosférica em São Paulo, 1993 a 1997. *Rev Saúde Pública.* 2004; 38 (6):751-57.

Gardner SY, Lehmann JR, Costa DL. Oil fly ash-induced of plasma fibrinogen levels in rats. *Toxicol Sci.* 2000; 56:175-80.

Genium. 1999. Genium Publishing Corporation. Genium's Handbook of Safety, Health and Environmental Data for Common Hazardous Substances, McGraw, New York, NY.

Gilmour PS, Brown DM, Lindsay TG, Beswick PH, MacNee W, Donaldson K. Adverse health-effects of PM₁₀ particles: involvement of iron in generation of hydroxyl radical. *Occup Environ Med.* 1996; 53:817-22.

Gottipolu RR, Wallenborn JG, Karoly ED, Schladweiler MC, Ledbetter AD, Krantz T, Linak W, Nyska A, Johnson JA, Thomas R, Richards JE, Jaskot

RH, Kodavanti UP. One-month diesel exhaust inhalation produces hypertensive gene expression pattern in healthy rats. *Environ Health Perspect.* 2009; 117:38-46.

Graboski MS, McCormick RL. Combustion of fat and vegetable oil derived fuels in diesel engines. *Prog. Energy Combust. Sci.* 1998; 24:125-64.

Graboski MS, McCormick RL, Alleman TL, Herring AM. The Effect of Biodiesel Composition on Engine Emissions from a DDC Series 60 Diesel Engine. NREL/SR-510-31461. Golden, CO:Colorado Institute for Fuels and Engine Research, Colorado School of Mines. 2003.

Hougaard KS, Saber AT, Jensen KA, Vogel U, Wallin H. Diesel exhaust particles: effects on neurofunction in female mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2009; 105(2):139-43.

IARC. International Agency for Research on Cancer. Some traditional herbal medicines, naphthalene and styrene. In: Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. 2002; v.82, 590p.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Ministério do Planejamento. IBGE, Cidades [Disponível: www.ibge.gov.br/cidades/default.php – acessado em 15.10.2009].

Inoue K, Takano H, Yanagisawa R, Ichinose T, Shimada A, Yoshikawa T. Pulmonary exposure to diesel exhaust particles induces airway inflammation and cytokine expression in NC/Nga mice. *Arch Toxicol.* 2005; 9(10):595-609.

IPCS. International Programme On Chemical Safety. 1979. Sulfur oxides and suspended particulate matter. [Disponível: www.inchem.org/documents/ehc - acessado em 15.10.2009].

Khan N, Warith MA, Luk G. A comparison of acute toxicity of biodiesel, biodiesel blends, and diesel on aquatic organisms. *J Air Waste Manage Assoc.* 2007; 57(3):286-96.

Kaegi R, Gasser P. Application of the focused ion beam technique in aerosol science: detailed investigation of selected, airborne particles. *J Microsc.* 2006; 224:140-45.

Karavalakis G, Stournas S, Bakeas E. Light vehicle regulated and unregulated emissions from different biodiesels. *Sci Total Environ.* 2009; 407(10):3338-46.

Karavalakis G, Tzirakis E, Mattheou L, Stournas S, Zannikos F, Karonis D. The impact of using biodiesel/marine gas oil blends on exhaust emissions from a stationary diesel engine. *Journal of Environmental Science and Health*. 2008; 43:1663-72.

Kegl B. Effects of biodiesel on emissions of a bus diesel engine. *Bioresource Technology*. 2008; 99:863-73.

Kodavanti UP, Schladweiler MC, Ledbetter AD. Temporal association between pulmonary and systemic effects of particulate matter in healthy and cardiovascular compromised rats. *J Toxicol and Environ Health*. 2002; 65:1545-69.

Koltalo PF, Oukebdane K, Dionnet F, Desbène PL. Optimisation of supercritical fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitrated derivatives adsorbed on highly sorptive diesel particulate matter. *Analytica Chimica Acta*. 2009; 651:48-56.

Laks D, Oliveira RC, André PA, Macchione M, Lemos M, Faffe D, Saldiva PNH, Zin WA. Composition of Diesel Particles Influences Acute Pulmonary Toxicity: An Experimental Study in mice. *Inhal Toxicol*. 2008; 20:1037-42.

Langrish JP, Lundback M, Mills NL, Johnston NR, Webb DJ, Sandström T, Blomberg A, Newby DE. Contribution of endothelin 1 to the vascular effects of diesel exhaust inhalation in humans. *Hypertension*. 2009; 54(4):910-5.

Lapuerta M, Armas O, Rodríguez-Fernández J. Effect of biodiesel fuels on diesel engine emissions, *Prog Energy Combust Sci*. 2008a; 34:198-23.

Lapuerta M, Rodríguez-Fernández J, Agudelo JR. Diesel particulate emissions from used cooking oil biodiesel. *Bioresour Technol*. 2008b; 99(4):731-41.

Liao D, Creason J, Shy C, Williams R, Watts R, Zweidinger R. Daily variation of particulate air pollution and poor cardiac autonomic control in the elderly. *Environ Health Perspect*. 1999; 107:521-25.

Liao CM, Chiang KC. Probabilistic risk assessment for personal exposure to carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in Taiwanese temples. *Chemosphere*. 2006; 63(9):1610-9.

Lin CY, Lin HA. Diesel engine performance and emission characteristics of biodiesel characteristics of biodiesel produced by the peroxidation process. *Fuel*. 2006; 85:298-05.

- Liu YY, Lin TC, Wang YJ, Ho WL. Biological toxicities of emissions from an unmodified engine fueled with diesel and biodiesel blend. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng*. 2008; 43(14):1735-43.
- Lu XM, Ge YS, Han XK, Wu SJ, Zhu RF, He C. Experimental study on particle size distributions of an engine fueled with blends of biodiesel. *Huan Jing Ke Xue*. 2007; 28(4):701-5.
- Lucking AJ, Lundback M, Mills NL, Faratian D, Barath SL, Pourazar J, Cassee FR, Donaldson K, Boon NA, Badimon JJ, Sandstrom T, Blomberg A, Newby DE. Diesel exhaust inhalation increases thrombus formation in man. *Eur Heart J*. 2008; 29(24):3043-51.
- Maatz LF, Wood, GJA, Rivero DHRF, Saldiva PHN. Tracheal instillation of urban PM_{2.5} suspension promotes acute cardiac polarization changes in rats. *Brazilian J Med Biol Research*. 2009; 42:207-13.
- Magari SR, Hauser R, Schwartz J, Williams PL, Smith TJ, Christiani DC. Association of heart rate variability with occupational and environmental exposure to particulate air pollution. *Circulation*. 2001; 104: 986-91.
- Mauderly JL. Health issues concerning inhalation of petroleum diesel and biodiesel exhaust. In: Plant Oils as Fuels: Present State of Science and Future Developments (Martini N, Schell J, eds). Berlin:Springer. 1997; 92-103.
- Miguel AH, Friedlander SK. Distribution of benzo(a)pyrene and coronene with respect to particle size in Pasadena aerosols in the submicron range. *Atmos. Environ*. 1978; 12:2407-13.
- Mills NL, Tornqvist H, Robinson SD, Gonzalez M, Darnley K, MacNee W, Boon NA, Donaldson K, Blomberg A, Sand-Strom T, Newby DE. Diesel exhaust inhalation causes vascular dysfunction and impaired endogenous fibrinolysis. *Circulation*. 2005; 112:3930-36.
- Mills NL, Törnqvist H, Gonzalez MC, Vink E, Robinson SD, Söderberg S, Boon NA, Donaldson K, Sandström T, Blomberg A, Newby DE. Ischemic and Thrombotic Effects of Dilute Diesel-Exhaust Inhalation in Men with Coronary Heart Disease. *N Engl J Med*. 2007; 357:1075-82.
- Nemmar A, Nemery B, Hoylaerts MF, Vermeylen J. Air pollution and thrombosis: an experimental approach. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 2002; 32:349-50.

Nemmar A, Hoylaerts MF, Hoet PHM, Nemery B. Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: systemic translocation and prothrombotic effects. *Toxicol Letters*. 2004; 149:243-53.

Nemmar A, Al-Maskari S, Ali BH, Al-Amri IS. Cardiovascular and lung inflammatory effects induced by systemically administered diesel exhaust particles in rats. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007; 292:L664–L670.

Nemmar A, Inuwa IM. Diesel exhaust particles in blood trigger systemic and pulmonary morphological alterations. *Toxicology Letters*. 2008; 176:20-30.

Nemmar A, Dhanasekaran S, Yasin J, Ba-Omar H, Fahim MA, Kazzam EE, Ali BH. Evaluation of the direct systemic and cardiopulmonary effects of diesel particles in spontaneously hypertensive rats. *Toxicology*. 2009; 262:50-56.

Nisbet ICT, Lagoy PK. Toxic equivalency factors (TEFs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Regul Toxicol Pharmacol*. 1992; 16:290-300.

Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, Kreyling W, Cox C. Translocation of Inhaled Ultrafine Particles to the Brain. *Inhalation Toxicology*. 2004; 16:437-45.

OMS. Organização Mundial de Saúde. Diretrizes de qualidade do ar. Global update 2005. Disponível em: <http://www.euro.who.int/Document/E90038.pdf>. Acessado em 10/10/2009)

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

OSHA. Occupational Safety and Health Administration. Regulations (Standards—29 CFR) 1910 Subpart Z—Toxic and Hazardous Substances. 2004. Disponível em: http://www.osha.gov/pls/oshaweb/owastand.display_standard_group?p_toc_level=1&p_part_number=1910>. Acessado em 05/11/2009.

Ozgunay H, Colak S, Zengin G, Sari O, Sarikahya H, Yuceer L. Performance and emission study of biodiesel from leather industry pre-fleshings. *Waste Manag*. 2007; 27(12):1897-01.

Parente EJS. Biodiesel: Uma aventura tecnológica num país engraçado. 2003. Disponível em: www.demec.ufmg.br/disciplinas/eng032-BL/livro_biodiesel.pdf. Acessado em 01/11/2009.

Park SK, O'Neill MS, Vokonas PS, Sparrow D, Schwartz J. Effects of Air Pollution on Heart Rate Variability: The VA Normative Aging Study. *Environ Health Persp.* 2005; 113(3):305-09.

Pereira CEL, Heck TG, Saldiva PHN, Rhoden CR. Ambient particulate air pollution from vehicles promotes lipid peroxidation and inflammatory responses in rat lung. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40:1353-59.

Peters A, Klot SV, Heier M, Trentinaglia I, Hörmann A, Wichmann HE, Löwel H. Exposure to traffic and the onset of myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351:1721-30.

Peretz A, Sullivan JH, Leotta DF, Trenga CA, Sands FN, Allen J, Carlsten C, Wilkinson CW, Gill EA, Kaufman JD. Diesel exhaust inhalation elicits acute vasoconstriction in vivo. *Environ Health Perspect.* 2008a; 116(7):937-42.

Peretz A, Kaufman JD, Trenga CA, Allen J, Carlsten C, Aulet MR, Adar SD, Sullivan JH. Effects of diesel exhaust inhalation on heart rate variability in human volunteers. *Environ Res.* 2008b; 107(2):178-84.

Pope CA, Verrier RL, Lovett EG, Larson CA, Raizenne ME, Kanner RE, Schwartz J, Villegas GM, Gold DR, Douglas W. Heart rate variability associated with particulate air pollution. *Am Heart J.* 1999; 138, 890-899.

Pope CA III. Epidemiology of Fine Particulate Air Pollution and Human Health: Biologic Mechanisms and Who's at Risk? *Environmental Health Perspectives.* 2000; 108(4):713-23.

Rivero DHRF, Sasaki C, Lorenzi-Filho G, Saldiva PHN. PM(2.5) induces acute electrocardiographic alterations in healthy rats. *Environ Res.* 2005a; 99(2):262-6.

Rivero DHRF, Soares SRC, Lorenzi-Filho G, Saiki M, Godleski JJ, Antonangelo L, Dolhnikoff M, Saldiva PHN. Acute Cardiopulmonary Alterations Induced by Fine Particulate Matter of São Paulo, Brazil. *Toxicol Sciences.* 2005b; 85:898-05.

Rhoden CR, Wellenius GA, Ghelfi E, Lawrence J, González-Flecha B. PM-induced cardiac oxidative stress and dysfunction are mediated by autonomic stimulation. *Biochimica Et Biophysica Acta.* 2005; 1725, 305-313.

Saldiva PH, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GG, Diaz E, Koutrakis P, Suh H, Tsuda A, Godleski JJ. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165(12):1610-17.

Salvi S, Blomberg A, Rudell B, Kelly F, Sandstrom T, Holgate ST, Frew A. Acute inflammatory responses in the airways and peripheral blood after short-term exposure to diesel exhaust in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999; 159:702-09.

Santos UP, Terra-Filho M, Lin CA, Pereira LAA, Vieira TCB, Saldiva PHN, Braga ALF. Cardiac arrhythmia emergency room visits and environmental air pollution in São Paulo, Brazil. *J Epidemiol Community Health*. 2008; 62:267-72.

Saxena RK, Gilmour MI, Schladweiler MC, McClure M, Hays M, Kodavanti UP. Differential Pulmonary Retention of Diesel Exhaust Particles in Wistar Kyoto and Spontaneously Hypertensive Rats. *Toxicol Sciences*. 2009; 111(2):392-01.

Schwartz J. Air pollution and blood markers of cardiovascular risk. *Environ Health Perspect*. 2001; 109(3):405-09.

Seagrave JC, McDonald JD, Reed MD, Seilkop SK, Mauderly JL. Responses to Subchronic Inhalation of Low Concentrations of Diesel Exhaust and Hardwood Smoke Measured in Rat Bronchoalveolar Lavage Fluid. *Inhalation Toxicology*. 2005; 17:657-70.

Seaton A, Soutar A, Crawford V, Elton R, McNerlan S, Cherrie J, Watt M, Agius R, Stout R. Particulate air pollution and the blood. *Thorax*. 1999; 54:1027-32.

See SW, Karthikeyan S, Balasubramanian R. Health risk of occupational exposure to particulate-phase polycyclic aromatic hydrocarbons associated with Chinese, Malay and Indian cooking. *J Environ Monit*. 2006; 8:369-76.

Sharp C. Characterization of Biodiesel Exhaust Emissions for EPA 211(b). *Report San Antonio*. 1998; TX:Southwest Research Institute.

Singh V, Solanki K, Gupta MN. Process optimization for biodiesel production. *Recent Pat Biotechnol*. 2008; 2(2):130-43.

Sun F, Littlejohn D, Gibson MD. Ultrasonication extraction and phase extraction clean up for determination of us epa 16 priority pollutant polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet absorption detection. *Analitica Chimica Acta*. 1998; 364:1-11.

Sunil VR, Patel KJ, Mainelis G, Turpin BJ, Ridgely S, Laubach RJ, Kipen HM, Nazarenko Y, Veleparambil M, Gow AJ, Laskin JD, Laskin DL. Pulmonary effects of inhaled diesel exhaust in age mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009; 241(3):283-93.

Sydbom A, Blomberg A, Parnia S, Stenfors N, Sandström T, Dahlgren SE. Health effects of diesel exhaust emissions. *Eur Respir J*. 2001; 17(4):733-46.

Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. Heart rate variability: standards of measurements, physiological interpretation, and clinical use. *Circulation*. 1996; 93:1043-65.

Theis RP, Dolwick GSM, Burr D, Siddiqui T, Asal NR. Smoking, environmental tobacco smoke, and risk of renal cell cancer: a population-based case-control study. *BMC Cancer*. 2008; 24(8):387.

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

Turrio-Baldassarri L, Battistelli CL, Conti L, Crebelli R, Berardis B, Iamiceli AL, Gambino M, Iannaccone S. Emission comparison of urban bus engine fueled with diesel oil and 'biodiesel' blend. *Science of the Total Environment*. 2004; 327:147-62.

van Eeden SF, Hogg JC. Systemic inflammatory response induced by particulate matter air pollution: the importance of bone-marrow stimulation. *J Toxicol Environ Health A*. 2002; 65(20):1597-613.

Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Caldini EG, Maciel Ribeiro AA, Mayhew TM, Saldiva PH, Dolhnikoff M. Particulate urban air pollution affects the functional morphology of mouse placenta. *Biol Reprod*. 2008; 79(3):578-84.

Veras MM, Damaceno-Rodrigues NR, Silva RMG, Scoriza JN, Saldiva PHN, Caldini EG, Dolhnikoff M. Chronic exposure to fine particulate matter emitted by traffic affects reproductive and fetal outcomes in mice. *Environmental Research*. 2009; 109:536-43.

Zou L, Atkinson S. Characterising vehicle emissions from the burning of biodiesel made from vegetable oil. *Environ Technol*. 2003; 24(10):1253-60.

Yang W, Omaye ST. Air pollutants, oxidative stress and human health. *Mutat Res*. 2009; 31:674(1-2):45-54.

Yokota S, Ohara N, Kobayashi T. Tracheal instillation of diesel exhaust particles component causes blood and pulmonary neutrophilia and enhances myocardial oxidative stress in mice. *J Toxicol Sci*. 2008; 33(1):1-10.

Yokota S, Mizuo K, Moriva N, Oshio S, Sugawara I, Takeda K. Effect of prenatal exposure to diesel exhaust on dopaminergic system in mice. *Neurosci Lett*. 2009; 449(1):38-41.

Yu MH. Environmental Toxicology: Biological and Health Effects of Pollutants. 2005. Ed: CRS Press, Second Edition. Washington DC. 2005.

Yuan CS, Lin HY, Lee WJ, Lin YC, Wu TS, Chen KF. A new alternative fuel for reduction of polycyclic aromatic hydrocarbon and particulate matter emissions from diesel engines. *Air Waste Manag Assoc*. 2007; 57(4):465-71.

Wallén A, Lidén G, Hansson HC. Measured Elemental Carbon by Thermo-Optical Transmittance Analysis in Water-Soluble Extracts from Diesel Exhaust, Woodsmoke, and Ambient Particulate. *J Occup Environ Hyg*. 2010; 7(1):35-45.

Watson JC. Visibility: science and regulation. *J Air Waste Manag Assoc*. 2002; 52(6):628-13.

Wingen LM, Low JC, Finlayson-Pitts BJ. Chromatography, absorption and fluorescence: A new instrument on the measurement of PAH in cigarette smoke. *Journal of Chemical Education*. 1998; 75(12):1599-03.

Apêndice

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 02/09/2009, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0838/09**, intitulado: **"TOXICIDADE CARDIOVASCULAR E INFLAMATÓRIA AGUDA INDUZIDA PELA INALAÇÃO DE PARTÍCULAS DOS COMBUSTÍVEIS DIESEL E BIODIESEL"** apresentado pela área **FISIOPATOLOGIA EXPERIMENTAL**.

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: **Dolores Helena Rodriguez Ferreira Rivero**

Pesquisador (a) Executante: **Jôse Mára de Brito**

CAPPesq, 03 de Setembro de 2009

Encaminhe-se à CPG-FMUSP
para as devidas providências.
S.P., 21/10/09

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

Prof. Dra. Elia Garcia Caldini
Programa Fisiopatologia Experimental
(Pós-Graduação em Ciências)
Coordenador

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