REGIANI CARVALHO DE OLIVEIRA

Efeito da composição do material particulado fino, $PM_{2,5}$ e “residual oil fly ash” (ROFA), como determinante do potencial mutagênico e tóxico celular: um estudo em bioensaios vegetais e animais

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

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientadora: **Prof. Dra. Maria Lúcia Bueno Garcia**

São Paulo
2006

***À Genny, Josias, Arthur e
Matheus pelo incentivo,
apoio e dedicação!***

Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Paulo H. Nascimento Saldiva** por ter me acolhido no Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental, pelo exemplo diário de pesquisador e ser humano, que mostra-nos que mais importante que acreditar nos nossos sonhos, é fundamental que façamos deles parte do nosso cotidiano.

Ao **Dr. Geraldo Lorenzi Filho** pela sua contribuição inestimável em meu crescimento profissional.

À **Prof. Dra. Maria Lúcia Bueno Garcia** que me aceitou como aluna já com o projeto em andamento, mas com a sua garra e determinação me fez acreditar que daria certo, mesmo com todos os empecilhos e obstáculos do caminho, mostrou-me que objetivos só existem para serem alcançados.

À **Dra. Mariangela Macchione** minha co-orientadora e amiga, por sua presença constante, pela amizade e cumplicidade que impulsionaram este trabalho.

À **Débora Jã de Araújo Lobo** pelo preparo e leitura das lâminas do teste TRAD-MN e muito mais que isto, pela sempre presente amizade e companheirismo.

À **Rosa Maria K Pozo** pela realização dos testes de inibição de mitoses em *Allium cepa* e pelo carinho que sempre demonstrou em nossa breve convivência.

Ao **Ruy Camargo Pires Neto** pela ajuda na fase experimental e apoio em todo este processo de pesquisa. Contar com amigos sempre é gratificante.

Ao **Davi Francisco Ferreira** e ao **Carlos Eduardo Ribeiro** pelo auxílio na manutenção dos animais utilizados neste experimento.

À amiga **Claúdia Simeire Albertini Yagi** por ter sanado minhas dúvidas, ouvido minhas queixas e transformado algumas delas em soluções. Com sua determinação me ensinou que o que parece difícil torna-se fácil depois que nos encorajamos em fazer..

À **Ana Luiza e Reginaldo** (Museu da Patologia) pela boa vontade e ajuda na solução de problemas de imagem e informática.

À **Rosana Aparecida Reis Paz** pela amizade e contribuição inestimável para a finalização desta tese.

À todo o **grupo do LPAE, Alessandra Choqueta Toledo, Ana Júlia Faria Coimbra Lichtenfels, Andréa Cristina Pereira, Dolores Helena Rivero, Eliane Tigre Guimarães, Dra. Elnara Márcia Negri, Heloisa Maria Bueno Guimarães, Luciana Rabelo de Oliveira Cisti, Naomi Kondo Nakagawa**, amigas e companheiras de pesquisa, estar neste grupo me faz crer que tudo aquilo que construímos não conseguimos sozinhos. Muito obrigada por tudo. À **Emília, Dalva, Márcia, Nildo, e Dna Severina** pelo apoio em todos os momentos.

Sumário

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Histórico.....	01
1.2 Poluentes atmosféricos - Legislação Brasileira.....	13
1.3 Material Particulado.....	15
1.4 Epitélio respiratório e o aparelho mucociliar.....	23
1.5 Estresse oxidativo.....	31
1.6 Poluição e Mecanismos Fisiopatológicos.....	38
2. OBJETIVOS.....	46
2.1 Objetivo geral.....	46
2.2 Objetivos específicos.....	46
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	48
3.1 Experimento I.....	48
3.1.1 Amostragem e caracterização do Material Particulado Fino (PM_{2,5}).....	48
3.1.2 Ensaio Toxicológicos.....	50
3.1.2.1 Teste de micronúcleo em <i>Tradescantia pallida</i>.....	51
3.1.2.2 Teste de inibição de mitose em <i>Allium cepa</i>.....	55
3.1.2.3 Análise estatística.....	58
3.2 Experimento II.....	58
3.2.1 Caracterização do “Residual oil fly ash” (ROFA) através	

da ativação com neutrons.....	59
3.2.2 Preparo do palato de rã.....	61
3.2.3 Transporte mucociliar in vitro.....	62
3.2.4 Frequência de batimento ciliar.....	64
3.2.5 Diferença de potencial transepitelial.....	65
3.2.6 Análise morfométrica.....	66
3.2.7 Desenho experimental.....	67
3.2.8 Análise estatística.....	68
3.3 Experimento III.....	69
3.3.1 Amostragem do Material Particulado fino (PM _{2,5}) e do “Residual oil fly ash” (ROFA).....	70
3.3.2 Caracterização do material particulado fino (PM _{2,5}) e do “Residual oil fly ash” (ROFA) através da espectrometria de fluorescência de raio-X (FRX).....	71
3.3.3 Desenho experimental.....	72
3.3.4 Análise estatística.....	74
4 RESULTADOS.....	75
4.1 Resultados do Experimento I.....	75
4.1.1 Caracterização do material particulado fino (PM _{2,5}).....	75
4.1.2 Teste de micronúcleo em <i>Tradescantia pallida</i>	78
4.1.3 Teste de inibição de mitoses em <i>Allium cepa</i>	80
4.2 Resultados do Experimento II.....	82
4.2.1 Caracterização do “Residual oil fly ash” (ROFA) através	

da ativação com nêutrons.....	82
4.2.2 Transporte mucociliar in vitro.....	84
4.2.3 Frequência de Batimento Ciliar.....	86
4.2.4 Diferença de Potencial Transepitelial.....	88
4.2.5 Análise morfométrica.....	90
4.3 Resultados do Experimento III.....	92
4.3.1 Caracterização do material particulado fino (PM _{2,5}) e do “residual oil fly ash” (ROFA) através da espectrometria de fluorescência de raio-X (FRX).....	92
4.3.2 Transporte Mucociliar in vitro.....	94
4.3.3 Frequência de Batimento Ciliar.....	96
4.2.4 Diferença de Potencial Transepitelial.....	98
4.2.5 Análise Morfométrica.....	100
5. DISCUSSÃO.....	103
6 CONCLUSÕES.....	126
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	129
8 . ANEXOS	

Resumo

Efeito da composição do material particulado fino, PM_{2,5} e “residual oil fly ash” (ROFA), como determinante do potencial mutagênico e tóxico celular: um estudo em bioensaios vegetais e animais

O consenso sobre os efeitos prejudiciais da material particulado atmosférico (MP) para a saúde humana é apoiado por um grande número de trabalhos epidemiológicos e experimentais mas a capacidade para definir qual o componente mais importante envolvido em sua toxicidade é dificultado pela sua grande complexidade de composição. O objetivo deste estudo é avaliar os efeitos de diferentes partículas de poluição atmosférica, quanto à origem e quanto a sua composição, sobre o sistema biológico através de 3 experimentos. O efeito do PM_{2,5} urbano de São Paulo, Brasil, coletado durante greve de ônibus foi avaliada através do TRAD-MN para a mutagenicidade e o teste de inibição de mitose em células meristemáticas da raiz de *Allium cepa*. para a toxicidade. Utilizamos o palato de rã para avaliar os parâmetros funcionais (transporte mucociliar -TMC, frequência do batimento ciliar - FBC e diferença de potencial - DP) e morfométricos (espessura do epitélio, produção de muco) do aparelho mucociliar exposto ao ROFA, proveniente de usina siderúrgica e ao PM_{2,5} urbano. A análise comparativa da composição do PM_{2,5} através da ativação com nêutrons, fluorescência de raio-X e cromatografia gasosa espectrometria de massa mostrou redução na concentração de elementos traços de metais, redução de enxofre (44,17%) e de orgânicos (39,3%) na amostra de PM_{2,5} nos filtros coletados no dia

de greve que associou-se com redução do dano no DNA. O ROFA induziu dano funcional do aparelho mucociliar (queda do TMC e aumento da FBC) que foi recuperado pela ação de antioxidantes vitamina E e n-Propil galato. O PM_{2,5} urbano provocou danos funcionais (diminuição do TMC e aumento da FBC) e morfológicos (diminuição da espessura e produção de muco) do epitélio respiratório. A análise comparativa da composição do ROFA e do PM_{2,5}, demonstrou que o ROFA possui composição predominante de ferro (57,729%±0,004%) enquanto o PM_{2,5} urbano possui composição mais heterogênea, com predominância de enxofre (37,594%±17,930%), ferro (14,490%±6,489%) e silício (13,142%±8,516%) e pequenas quantidades de níquel (0,0336%±0,312%) e vanádio(0,260%±0,006%). Concluímos que substâncias oxidantes presentes no MP possuem papel relevante na injúria do aparelho mucociliar e que os efeitos lesivos do MP sobre os sistemas biológicos são fortemente dependentes de sua composição.

Summary

The role of fine particulate matter composition of PM_{2.5} and ROFA in the cell mutagenic potential and toxicity: a vegetable and animal bioassay study.

The association between atmospheric particulate matter (PM) and adverse human health effects have been consistently reported in epidemiological and experimental studies however, the ability to define the most important components involved in PM toxicity is hindered by its complex composition. In the present study we decided to further explore the effects of different atmospheric particles due to both source and composition, on the biologic system through 3 experiments. The mutagenicity and toxicity of urban PM_{2.5} of Sao Paulo, Brazil, from a bus strike day was evaluated by the TRAD-MN assay and inhibition of mitotic rate test of root tips *Allium cepa*. The frog palate was used to evaluate functional parameters (mucociliary transport – MCT, ciliary beating frequency - CBF and potential difference – PD) and morphometric data (epithelium thickness and mucus production) of the mucociliary apparatus exposed to ROFA from an a still plant, and to urban PM_{2.5}. The comparative analysis of PM_{2.5} composition made by neutrons activation, fluorescence X-ray and gas chromatography/mass spectrometry showed decrease of trace elements, sulfur concentration (44,17%) and organics compounds (39,3%) in relation to the non strike day and was associated to coherent reduction in DNA damage. ROFA induced functional injury of the mucociliary apparatus (decrease of MCT and increase of CBF) and the presence

of antioxidants n-Propyl gallate and E vitamin protected against the mucociliary impairment induced by ROFA exposure. The comparative analysis between ROFA and PM_{2,5} composition showed that ROFA exhibited predominance of iron while PM_{2,5} showed heterogeneous composition presenting predominance of sulfur (37,594%±17,930%), iron (14,490%±6,489%) and silicon (13,142%±8,516%) and decrement of nickel (0,0336%±0,312%) and vanadium (0,260%±0,006%). We concluded that PM plays an important role in respiratory injury through oxidative stress and that adverse effects of PM on the biologic systems are strongly dependent on its composition.

1

INTRODUÇÃO

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - Histórico

Desde o início de sua evolução o homem tem, progressivamente, transformado o ambiente em que vive.

No período paleolítico nosso ancestral era principalmente caçador e coletor, caçando animais para se alimentar e para produzir vestimentas com peles para se proteger dos intempéries. Fazer fogo e utilizá-lo de forma produtiva foi fundamental para o homem iniciar sua trajetória evolutiva. A utilização do fogo permitiu inserir novos alimentos a dieta, prover proteção contra animais e contra o frio. A manutenção de um ambiente quente e protegido, levou a formação de grupos sociais mais fortes, o que, possivelmente, permitiu o sucesso dos grupos que possuíam o domínio do fogo.

Quando nosso ancestral levou o fogo para a caverna, utilizando-o para cozer alimentos e se proteger contra o frio e predadores, iniciou a degradação antropogênica do ar atmosférico.

Muito posteriormente, com o desenvolvimento das cidades, a população mundial cresceu aceleradamente. Houve necessidade da produção em grande escala dos bens de consumo e foi assim que, há mais de 250 anos (por volta de 1750, na Inglaterra), surgiram as primeiras fábricas. Com elas o homem fez uma nova revolução, a Revolução Industrial, e mudou totalmente a face do planeta. Porém, essa

transformação fez uma vítima, o meio ambiente, no início sufocado pela fumaça das máquinas a vapor que usavam carvão como combustível e, mais tarde, aquecido e poluído pela queima de gases derivados do petróleo.

O ar é um dos mais importantes recursos naturais do nosso planeta. A vida da maioria dos seres que nele vivem é dependente do ar atmosférico. Com o ar cada vez mais poluído, começaram a ser percebidas as consequências de sua degradação sobre a saúde humana. Episódios de poluição excessiva, no início do século XX, causaram aumento do número de mortes em algumas cidades da Europa e dos Estados Unidos.

O primeiro episódio documentado na história ocorreu em 1930, no vale de Meuse, Bélgica, uma região com grande concentração de indústrias. Nos cinco primeiros dias de dezembro daquele ano, condições meteorológicas desfavoráveis, como ausência de ventos, impediram a dispersão dos poluentes, que permaneceram estacionados sobre a região. Durante este período, foram registrados um aumento da incidência de doenças respiratórias e um excesso de mortes (60 mortes) até dois dias após o início do episódio (Firket, 1931).

Em outubro de 1948, durante cinco dias, os produtos da combustão de indústrias locais permaneceram estacionados sobre a cidade de Donora, EUA, em consequência a um fenômeno meteorológico caracterizado pela sobreposição de uma camada de ar quente a uma camada de ar frio, impedindo o movimento ascendente do ar. A presença do ar frio retido na camada inferior devido ao seu maior peso de densidade, fenômeno este

denominado inversão térmica, propiciou também a retenção dos poluentes que se mantiveram próximos da superfície. Neste período, foram observadas 20 mortes ao invés das duas mortes normalmente esperadas para uma comunidade de 14.000 habitantes (Ciocco,1961).

Durante o inverno londrino de 1952, ocorreu o mais clássico e grave episódio de poluição excessiva documentado no início daquele século. Sob a ação da inversão térmica, os poluentes gerados pelas indústrias e pelos aquecedores domésticos, que utilizavam carvão como combustível, formaram uma nuvem, composta principalmente por material particulado e enxofre (com concentrações até nove vezes maiores que a média, para ambos os poluentes), que permaneceu estacionada sobre a cidade por aproximadamente três dias. O resultado foi a ocorrência de um aumento de 4.000 mortes em relação à média de óbitos em períodos semelhantes (Logan, 1952).

Os estudos epidemiológicos relacionados a estes episódios (Firket, 1931; Logan, 1952; Ciocco et al.,1961) levaram a mobilização da sociedade na tentativa de controlar as emissões dos poluentes do ar atmosférico. Na década de 70, foi criada nos Estados Unidos da América a entidade “Environmental Protection Agency” (EPA) à qual foi delegada o controle da qualidade do ar e, sendo então, estabelecidos padrões com limites máximos para seis poluentes, material particulado, dióxido de enxofre, monóxido de carbono, dióxido de nitrogênio, ozônio e chumbo. Subseqüentemente, estudos epidemiológicos publicados entre 1989 e 1996 reportaram que a exposição às concentrações menores de material

particulado, próximas aos padrões estabelecidos para a qualidade do ar, estava associada ao aumento de morbidade e mortalidade por doenças respiratórias. Este fato inesperado levou a EPA a reconsiderar os padrões previamente estabelecidos para o material particulado e, após um programa de pesquisa desenhado para avaliar os efeitos a longo prazo do material particulado sobre a saúde humana, foi proposto, em 1997, novos padrões para a qualidade do ar ambiente e regulamentado limites para as partículas finas, com diâmetro aerodinâmico menor que $2,5 \mu\text{m}$ (Pope et al., 2002).

Estes episódios de poluição excessiva levaram a uma resposta também no continente Europeu. Em 1956 o Parlamento Inglês atribuiu às autoridades locais o controle das áreas de maior risco de ocorrência e acúmulo de fumaça preta emitida pelas chaminés das residências, obrigando e financiando a troca do sistema à carvão por eletricidade, gás ou óleo diesel. De 1956 a 1958 os “Clean Air Acts” ampliaram o controle das emissões de poluentes industriais, regulamentando as emissões de enxofre e fumaça preta (Braga et al., 2002). No início dos anos 70, a Comunidade Européia demonstrou, através de propostas e discussões de medidas de controle da qualidade do ar, estar suficientemente convencida dos danos à saúde humana causados pelas altas concentrações de poluentes lançados na atmosfera (Braga et al., 2002)

Em 1976 a “Comission of the European Communities - CEC” estabeleceu padrões para o dióxido de enxofre, monóxido de carbono, dióxido de nitrogênio, material particulado e oxidantes foto-químicos e, desde então, vem aprimorando estes padrões, o que tem subsidiado as

legislações dos diversos países europeus de maneira uniforme (Braga et al., 2002) .

A OMS (Organização Mundial da Saúde) mantém desde 1975 um programa de apoio técnico aos países em desenvolvimento para a implantação de programas de monitorimento de poluentes atmosféricos (WHO, 1997).

Na última década do século passado, encontramos um cenário global de preocupação com o meio ambiente e os danos causados a ele pela ação humana. O efeito estufa torna-se o principal alvo desta preocupação. Em 1992 a Convenção das Nações Unidas sobre as Mudanças Climáticas é adotada na Sede da ONU, Nova Iorque e, é disponibilizada para assinatura na Convenção das Nações Unidas sobre as Mudanças Climáticas Rio 92, realizada no Rio de Janeiro, Brasil, onde os líderes mundiais concordam em tentar reduzir as emissões (de CO₂ e gases CFC) aos níveis de 1990. Esta surgindo o Protocolo de Kioto. O Protocolo de Kioto tem como objetivo a redução até 2008-2012 pelos países industrializados, das emissões de gases que causam o efeito estufa em aproximadamente 5% abaixo dos níveis registrados em 1990, a exceção dos Estados Unidos da América, que se recusaram a aderir ao Protocolo. Em 2001, o Terceiro Relatório de Avaliação do Painel Inter-governamental sobre Mudanças Climáticas contém a primeira conclusão de consenso global científico sólido, que identifica a interferência antropogênica na mudança do clima mundial. Em novembro deste mesmo ano (2001), em Marrakesh, o Protocolo é finalizado e disponibilizado para ratificação pelos governos. O Protocolo possui dois

critérios para entrar em vigor. Primeiro, deverá ter a ratificação, aceitação, aprovação e adesão de 55 países membros da Convenção das Nações Unidas sobre as Mudanças Climáticas. Segundo, dentre esses 55 países, devem estar presentes os países industrializados, responsáveis por 55% das emissões que causam o aquecimento global. Em 16 de fevereiro de 2005, o Protocolo entra em vigor, após oito anos da adoção de seu texto, em Kioto, Japão. O Protocolo de Kioto entra em vigor sem a assinatura dos Estados Unidos da América e da Austrália.

No Brasil, o caso mais marcante dos efeitos sobre a saúde humana e dos custos econômicos, sociais e ambientais da poluição do ar é o da cidade de Cubatão, SP, que foi considerada nos anos 80 como uma das mais poluídas do mundo, chegando a ser denominada como o “Vale da Morte”. No vale localizado na Serra do Mar, o Pólo Petroquímico começou a ser desenvolvido em 1955. Nesta época, não existia legislação ambiental específica de monitorização e padronização do ar inspirado e também não existia a preocupação com o impacto dos resíduos industriais sobre o meio ambiente. Na década de 80, 23 indústrias lançavam diariamente na atmosfera da região mais de mil toneladas de gases e partículas tóxicas ao homem e ao ambiente.

Em 1984 o Plano de Prevenção de Episódios Agudos de Poluição do Ar foi efetivamente implementado na área, observando-se desde então a declaração de estados de alerta e de emergência. De 1995 a 2004 não mais registraram-se níveis de poluição que levassem à declarações de “Alerta” ou de “Emergência”, embora observam-se ainda algumas ultrapassagens do

nível de “Atenção”. A principal preocupação em Vila Parise, área industrial de Cubatão, é, atualmente, as altas concentrações de material particulado (MP). A análise dos dados de amostragem de PM_{10} (material particulado com diâmetro aerodinâmico inferior ou igual a $10\mu m$) indica uma queda constante desde 1997, embora ainda estejam bem acima do padrão de qualidade do ar. Em 2003 e 2004 as concentrações deste poluente foram mais altas que no período de 1999 a 2002 (figura 01) (CETESB, 2005). Em 2005, a média observada em Vila Parise de PM_{10} ($93\mu g/m^3$) é quase o dobro do padrão de qualidade do ar ($50\mu g/m^3$).

Figura 01. Número de ultrapassagens do padrão por ano do PM_{10} - Cubatão - V. Parise - Rede Automática (CETESB, 2005)

Na maioria das outras áreas do Estado de São Paulo, as ações de controle, como instalação de equipamentos que reduzissem a emissão de poluentes pelas indústrias já instaladas e a obrigatoriedade de licença para instalação e funcionamento para novos empreendimentos, além de um intenso esquema de fiscalização do funcionamento das indústrias, ações

implantadas pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), levaram ao quadro atual onde apenas 10% dos poluentes presentes na atmosfera são provenientes de fontes fixas (industrial).

Enquanto a poluição de origem industrial estava sendo controlada houve grande crescimento da frota veicular, que compõem as fontes móveis de poluição, e conseqüente aumento nas concentrações dos poluentes gerados por estas fontes. Com vistas a controlar as emissões desta crescente fonte poluidora o Conselho Nacional de Meio Ambiente - CONAMA, criou, em 1986, o Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores - PROCONVE, definindo os limites máximos de emissão para todos os veículos novos, leves e pesados, nacionais e importados. Para o cumprimento destes limites, foi necessária a aplicação de tecnologia e sistemas que otimizem o funcionamento dos motores para proporcionar a queima perfeita de combustível e conseqüente diminuição das emissões bem como, do consumo de combustível. O PROCONVE atingiu a sua última etapa em 1998, chegando a redução média de 90% na emissão de poluentes, em relação ao início do programa. A utilização de combustíveis denominados “limpos”, obtidos a partir da adição de 22% de álcool a gasolina, deu um grande incremento para o sucesso do PROCONVE. A viabilização desta mistura levou o Brasil a atingir o mesmo nível tecnológico dos EUA, Europa e Japão no controle da poluição veicular mas em metade do prazo.

A operação caça fumaça, iniciada em 1976 pela CETESB, visa fiscalizar a emissão de fumaça preta, emissão característica de motores

movidos a óleo diesel quando se encontram desregulados. Com esta medida a CETESB conseguiu, na frota de São Paulo, diminuir o índice de veículos com motores desregulados de 45% em 1996, para 9,2% em 2000.

O rodízio municipal foi implantado em São Paulo, nos invernos de 1995 a 1998, com o intuito de reduzir os níveis da concentração dos poluentes, principalmente de monóxido de carbono. Hoje o rodízio de veículos, no que denominamos como centro expandido da Cidade, ocorre durante todo o ano, sendo suspenso somente nos períodos de férias escolares e tem como objetivo principal a redução dos congestionamentos, muito freqüentes nesta região.

Em seu relatório de 2005, a CETESB relata que os índices de ultrapassagens do padrões tanto na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), quanto nas demais regiões monitoradas por este órgão, como Cubatão e Interior do Estado, demonstram que as emissões dos principais poluentes encontram-se em grande parte controladas. A figura 02 mostra o número de ultrapassagens do padrão de PM_{10} para a RMSP nos últimos 9 anos. Observa-se queda significativa nos últimos anos, atingindo mínima freqüência em 2005. Entretanto, o ozônio tem freqüentemente excedido os padrões de qualidade do ar e os níveis de atenção, principalmente em dias de alta insolação, tanto na Região Metropolitana de São Paulo, quanto em Cubatão e em algumas cidades do interior do Estado (CETESB, 2005).

Figura 02. Número de ultrapassagens do padrão por ano do PM_{10} - RMSP - Rede Automática (CETESB, 2005)

Apesar de todas estas ações e de se ter conseguido um razoável controle das emissões de poluentes tanto na Região Metropolitana de São Paulo quanto em outras localidades do estado, como em Cubatão, vários estudos têm comprovado que os índices de poluentes existentes é ainda um grande problema de saúde pública em nossa cidade.

Na década de 70 do século passado o aumento nos preços do petróleo, levaram o Brasil a lançar o pro-álcool, um programa de incentivos a utilização do álcool como combustível de carros de passeios. Em 1979 o Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina da USP (LPAE) iniciou suas pesquisas com o objetivo de comparar os efeitos tóxicos da emissão veicular do álcool e da gasolina. Os estudos do LPAE mostraram que o álcool não é o combustível mais ecológico, mas é menos tóxico que a gasolina (Massad et al., 1985, 1986; Saldiva et al.,

1985). Por razões políticas e econômicas, esta alternativa de fonte de energia não teve muito incentivo nas décadas subsequentes, mas, no início do século 21, a indústria automobilística voltou sua atenção novamente para a utilização deste combustível e os carros com motor bi-combustível é uma realidade nas ruas de nosso país.

Com a proposta principal de investigar a poluição do ar e suas consequências adversas sobre a saúde o LPAE publicou, nestas três décadas de pesquisa, extenso número de trabalhos, epidemiológicos e experimentais, utilizando bioindicadores animais e vegetais, demonstrando os efeitos da poluição do ar sobre a saúde da população.

Estudos epidemiológicos do grupo realizados no município de São Paulo observaram forte correlação entre mortalidade infantil (Saldiva et al., 1994) e de idosos (Saldiva et al., 1995) com a poluição atmosférica. Braga et al., 2000, mostraram que acréscimos nos níveis dos poluentes do ar da cidade de São Paulo estão associados ao aumento do número de admissões hospitalares por doenças respiratórias em crianças e adolescentes. Entre estes, o maior aumento se registra entre as crianças com dois anos de idade ou menos. Variações de um interquartil na concentração de PM_{10} ($35 \mu g/m^3$) e de NO_2 ($80 \mu g/m^3$) foram associadas a um acréscimo de 9,4% nas internações por doenças respiratórias.

Os estudos experimentais reforçam os achados epidemiológicos. Saldiva et al., 1992, e Lemos et al., 1994, observaram que exposição crônica à poluição do ar da cidade de São Paulo promove significativa alteração nas propriedades de defesa mucociliar e predisposição à infecção respiratória.

Pereira et al., 1995, mostraram associação entre poluição do ar e hiperresponsividade pulmonar em ratos expostos por 3 meses em condições reais de ar urbano quando comparados com outro grupo de animais mantidos em uma área considerada não poluída no mesmo período. Macchione et al., em 1999 demonstraram que a lesão ao aparelho mucociliar de palatos de rã rã, que mimetiza o aparelho mucociliar do epitélio respiratório, expostos ao PM_{10} coletado em São Paulo teve como principal mecanismo de ação o estresse oxidativo, evidenciado pela depleção de antioxidantes endógenos como a glutathione. Reymão et al. (1997) e Cury et al. (2000) demonstraram o aumento de câncer em ratos expostos as condições reais de poluição. Guimarães et al. (2000) e Ferreira et al. (2000) demonstraram aumento na incidência de micronúcleos em plantas expostas cronicamente ao ar de nossa cidade. Soares et al., 2002, encontrou aumento na frequência de micronúcleos em sangue periférico de camundongos expostos a poluição. Já Batalha et al., em 2002 submeteram ratos saudáveis e bronquíticos crônicos a um concentrador de partículas e observaram vasoconstricção em artérias pulmonares. Também visando a reatividade vascular Lemos et al., *in press*, observaram vasoconstricção em artérias coronárias de camundongos expostos cronicamente à poluição urbana de São Paulo por um período de 4 meses. Os resultados positivos encontrados por Rivero et al. em 2005 também mostraram significativa diminuição da razão lumen/parede tanto em artérias coronárias como em artérias pulmonares além de linfocitose sangüínea após instilação de concentrações de $PM_{2,5}$ em ratos.

1.2 - Poluentes atmosféricos - Legislação Brasileira

Conforme a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº3, de 28/06/1990, considera-se “poluente atmosférico qualquer forma de matéria ou energia com intensidade e em quantidade, concentração, tempo ou características em desacordo com os níveis estabelecidos, e que tornem ou possam tornar o ar impróprio, nocivo ou ofensivo à saúde, inconveniente ao bem-estar público, danoso aos materiais, à fauna e à flora ou prejudicial à segurança, ao uso e gozo da propriedade e às atividades normais da comunidade”.

Através da Portaria Normativa n.º 348 de 14/03/90 o IBAMA estabeleceu os padrões nacionais de qualidade do ar e os respectivos métodos de referência, ampliando o número de parâmetros anteriormente regulamentados através da Portaria GM 0231 de 27/04/76. Os padrões estabelecidos através dessa portaria foram submetidos ao CONAMA em 28/06/90 e transformados na Resolução CONAMA n.º 03/90 (CETESB, 2005).

Os padrões de qualidade do ar são divididos em primários e secundários. Os padrões primários de qualidade do ar estabelecem concentrações de poluentes que, se ultrapassadas, poderão afetar a saúde da população. Podem ser entendidos como níveis máximos toleráveis de concentração de poluentes atmosféricos, constituindo-se em metas de curto e médio prazo. São padrões secundários de qualidade do ar as concentrações de poluentes atmosféricos abaixo das quais se prevê o

mínimo efeito adverso sobre o bem estar da população, assim como o mínimo dano à fauna e à flora, aos materiais e ao meio ambiente em geral. Podem ser entendidos como níveis desejados de concentração de poluentes, constituindo-se em meta de longo prazo (CETESB, 2005).

Os padrões nacionais de qualidade do ar fixados na Resolução CONAMA n.º 03 de 28/06/90 são apresentados na tabela 01.

POLUENTE	TEMPO DE AMOSTRAGEM	PADRÃO PRIMÁRIO $\mu\text{g}/\text{m}^3$	PADRÃO SECUNDÁRIO $\mu\text{g}/\text{m}^3$	MÉTODO DE MEDIÇÃO
partículas totais em suspensão	24 horas ¹	240	150	amostrador de grandes volumes
	MGA ²	80	60	
partículas inaláveis	24 horas ¹	150	150	separação inercial/filtração
	MAA ³	50	50	
fumaça	24 horas ¹	150	100	refletância
	MAA ³	60	40	
dióxido de enxofre	24 horas ¹	365	100	pararosanilina
	MAA ³	80	40	
dióxido de nitrogênio	1 hora ¹	320	190	quimiluminescência
	MAA ³	100	100	
monóxido de carbono	1 hora ¹	40.000	40.000	infravermelho não dispersivo
		35ppm	35ppm	
	8 horas ¹	10.000	10.000	
		9ppm	9ppm	
ozônio	1 hora ¹	160	160	quimiluminescência

1 - Não deve ser excedido mais que uma vez ao ano.

2 - Média geométrica anual.

3 - Média aritmética anual.

Tabela 01. Padrões nacionais de qualidade do ar (Resolução CONAMA nº03 de 28/06/90) (CETESB, 2005)

A legislação brasileira não prevê padrão de qualidade para o material particulado fino ($PM_{2,5}$).

Por ser o terceiro maior centro urbano mundial e por isso apresentar alta chance de comprometimento da qualidade a região RMSP requer um sistema de monitoramento que leve em conta, além do objetivo do acompanhamento dos níveis de poluição atmosférica a longo prazo, a possibilidade de ocorrência de episódios agudos de poluição do ar.

Os critérios para episódios agudos de poluição do ar definidos na Resolução CONAMA nº 03 são apresentados na tabela 02.

PARÂMETROS	ATENÇÃO	ALERTA	EMERGÊNCIA
partículas totais em suspensão ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) - 24 horas	375	625	875
partículas inaláveis ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) - 24 horas	250	420	500
fumaça ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) - 24 horas	250	420	500
dióxido de enxofre ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) - 24 horas	800	1.600	2.100
SO ₂ X PTS ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)($\mu\text{g}/\text{m}^3$) - 24 horas	65.000	261.000	393.000
dióxido de nitrogênio ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) - 1 hora	1.130	2.260	3.000
monóxido de carbono (ppm) - 8 horas	15	30	40
ozônio ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) - 1 hora	400*	800	1.000

* O nível de atenção é declarado pela CETESB com base na Legislação Estadual que é mais restritiva (200 $\mu\text{g}/\text{m}^3$).

Tabela 02. Critérios para episódios agudos de poluição do ar (Resolução CONAMA nº 03 de 28/06/90) (CETESB, 2005)

1.3 - Material Particulado

O material particulado do ar atmosférico consiste de uma mistura complexa de partículas variando tanto em tamanho quanto em composição

química. Vários trabalhos demonstram que as características físicas e químicas do MP variam de acordo com o local de origem. As características químicas do MP são dependentes de um grande número de fatores, incluindo o tamanho das partículas, a fonte de emissão, além da influência das condições atmosféricas, como intensidade luminosa, velocidade dos ventos e temperatura. Apesar da diversidade nas propriedades das diferentes amostras de MP, vários constituintes são freqüentemente identificados incluindo o carbono elementar, vários compostos orgânicos, traços de metais, sulfatos e nitratos, em forma de aerossol, e material biológico (Carnelley e Le, 2001).

O MP pode ser caracterizado por sua origem em antropogenico ou geogenico, em primário ou secundário; pela fonte emissora em produtos de combustão e de tráfego, ou por suas propriedades fisicoquímicas como solubilidade. Por razões práticas, o tamanho da partícula é utilizado para medidas de emissões do MP e para o monitoramento de sua concentração na atmosfera (Englert, 2004).

Definir o tamanho de uma partícula é uma tarefa mais complexa do que aparenta ser em um primeiro momento. Tal dificuldade decorre do fato de que na interpretação dos resultados de qualquer distribuição granulométrica deve-se levar em consideração todos os aspectos associados à determinação deste tamanho, como por exemplo, o comportamento e as propriedades físicas intrínsecas das partículas analisadas (Almeida, 1999; Willeke, 1993). Existem várias formas para determinar o tamanho de uma partícula, mas a adotada pelos órgãos

controladores da qualidade do ar é o do Diâmetro Aerodinâmico Equivalente (diâmetro aerodinâmico). A esfera é a única forma que pode ser descrita ou medida por uma única dimensão. Ao se afirmar, por exemplo, que o diâmetro de uma esfera é de 50mm, esta informação é suficiente para defini-la por completo, em termos de tamanho. O mesmo já não é possível para todas as outras formas. Dizer por exemplo, que um cubo mede 50mm não o define exatamente, pois pode-se estar se referindo a sua dimensão lateral ou diagonal. Entretanto, qualquer uma destas outras formas possui um número de propriedades que pode ser descrita ou definida por uma única dimensão. Exemplos destas propriedades são a massa, o volume, a área superficial, área projetada, taxa de sedimentação, dentre outras. A esfera é, portanto, a única forma que poderia traduzir as características da diversa e desconhecida forma das partículas dispersas na atmosfera. Assim a massa de uma partícula de forma qualquer pode ser convertida na massa de uma esfera, possibilitando assim o cálculo de um valor único ($2r$) para o diâmetro da esfera de mesma massa que a partícula de forma qualquer. O diâmetro aerodinâmico equivalente é o diâmetro de uma esfera de densidade unitária ($\rho_p = 1 \text{ g/cm}^3$), que tem a mesma velocidade terminal de sedimentação da partícula em estudo, corrigida pelo fator de escorregamento de Cunningham (Willeke, 1993). A sedimentação é uma das principais características das partículas da atmosfera uma vez que este é o fator determinante de permanência na atmosfera e de penetração e deposição nas vias aéreas.

O material particulado total em suspensão (PTS) compreende partículas de qualquer tamanho suspensas no ar. Entretanto, as partículas maiores que 30-70 μ m permanecem muito pouco tempo em suspensão antes de serem depositadas. PM₁₀ e PM_{2,5} são partículas com diâmetro aerodinâmico igual ou inferior a 10 e 2,5 μ m, respectivamente. Partículas ultra finas (UF) são aquelas com diâmetro aerodinâmico inferior a 0,1 μ m, também denominadas de PM_{0,1}. A fração PM_{2,5} é também chamada de partícula fina, e as partículas entre 10 e 2,5 μ m são freqüentemente denominadas de partículas grossas. Entretanto, na década passada, o termo partículas grossas foi utilizado para designar partículas maiores que 10 μ m. O PM₁₀ é também chamado de partícula inalável. Entretanto, esta é uma divisão teórica pois, as frações maiores de material particulado contém as frações menores. O PM₁₀ faz parte da fração PTS. O PM_{2,5} faz parte da fração PM₁₀ e UF faz parte do PM_{2,5} (Englert, 2004). Além disto, os efeitos lesivos das partículas sobre a saúde não são dependentes somente de seu tamanho. Zhang et al. (1998a) citados por Dick et al. (2003) demonstraram diferença no potencial inflamatório de três partículas ultra finas de Ti, Ni e Co (UFTi, UFNi e UFCo) com diâmetros aerodinâmico e área da superfície similares. Neste estudo as partículas de Ni e Co levaram a maior aumento de influxo de neutrófilos e de radicais livres no pulmão dos ratos expostos, sendo a resposta à exposição às partículas de Ni maior que a encontrada à exposição de Co. Estes resultados indicaram que além do tamanho, a composição química, o número, a área e a reatividade da superfície das partículas são fatores que determinam sua

toxicidade (Dick et al., 2003). As partículas menores, tendem a ser formadas por processos de combustão e pela conversão de gás em partículas. Como resultado, sua composição é muito complexa e geralmente inclui sulfatos, nitratos e orgânicos (Finlayson-Pitts et al., 1997).

As partículas de carbono elementar são apontadas como possíveis mediadores na resposta biológica à exposição ao material particulado. Estas partículas são tipicamente muito pequenas, menores que $1\mu\text{m}$ em diâmetro, o que aumenta grandemente o poder de penetração nas regiões mais distais do pulmão. Além disto, estas partículas são capazes de carrear outros compostos tóxicos adsorvidos à sua superfície, aumentando sua toxicidade nas vias aéreas (Carnelley e Le, 2001).

Um grande número de compostos orgânicos tem sido identificado em amostras de PM_{10} . A maioria destes compostos incluem alcanos, alcenos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) incluindo ácidos, aldeídos, cetonas, quinonas fenó e ésteres. Grande número destes compostos químicos tem seus efeitos tóxicos comprovados, sendo que alguns são carcinogênicos e são potenciais agentes na toxicidade do material particulado ambiente. Os HPAs e outros compostos orgânicos são geralmente encontrados na fração fina do material particulado ($\text{PM}_{2,5}$) e são os maiores componentes das partículas emitidas pela queima do diesel, uma importante fonte do $\text{PM}_{2,5}$ na atmosfera urbana (Salvi et al., 2000 citados por Carnelley e Le, 2001).

Elementos traço de metais são tipicamente encontrados nas emissões de processos industriais incluindo fundições e usinas geradoras de energia.

O perfil químico dessas emissões pode variar grandemente dependendo da fonte, com alguns elementos únicos dependendo da indústria que originou o particulado (Carnelley e Le, 2001). Vários metais são apontados como agentes potenciais na resposta biológica do MP, incluindo o ferro, cobre, vanádio, zinco e níquel. Traços de metais são tipicamente encontrados na fração $PM_{2,5}$, adsorvidos à superfície de carbono e outras partículas. Outros elementos originados na crosta terrestre são encontrados no material particulado grosso, mas não são apontados por serem os maiores contribuintes para a toxicidade das partículas. Os nitratos e sulfatos são formados por reações químicas secundárias ocorridas na atmosfera. Estes compostos também estão associados à fração fina dos particulados ($PM_{2,5}$). A acidez das partículas contendo nitratos e sulfatos pode ser o fator determinante de seus efeitos no epitélio respiratório (Carnelley e Le, 2001).

Componentes de origem biológica adsorvidos ao MP também são responsabilizados pelos efeitos tóxicos das partículas. Um exemplo são os grãos de pólen que são encontrados na fração grossa de MP e podem induzir um grande número de respostas inflamatórias e alérgicas em indivíduos suscetíveis. As endotoxinas ou componentes da parede celular de bactérias, que são encontradas associadas ao $PM_{2,5}$ podem também induzir hiperreatividade das vias aéreas (Carnelley e Le, 2001).

Devido a natureza complexa e variável do material particulado ambiente, há grande dificuldade em caracterizar o agente que pode ter maior responsabilidade nos efeitos à saúde humana encontrados nos estudos epidemiológicos. A caracterização dos elementos do material

particulado que possuem maior poder tóxico é difícil pois, as amostras de MP são extremamente heterogêneas. Elas variam geograficamente, sua composição é dependente das fontes emissoras que determinam suas características químicas, que por sua vez, estão em constante mudanças ao longo do tempo em que a partículas estão dispersas na atmosfera.

A importância das partículas finas para a saúde tem sido evidenciada tanto em estudos epidemiológicos quanto em estudos experimentais (Schwartz et al.,1996; Dreher, 2000; Hsiao et al.,2000; Pope, 2000). As pesquisas têm demonstrado que a toxicidade das partículas aumenta à medida que seu tamanho diminui. A razão para este aumento de efeitos nas partículas menores pode ser atribuído a três principais fatores. Primeiro, partículas com diâmetro aerodinâmico inferior a $10\mu\text{m}$ conseguem atingir regiões mais distais do pulmão, onde podem exercer seu poder tóxico sobre as células alveolares, como macrófagos, neutrófilos e células epiteliais. A deposição nas regiões mais distais é maior para as partículas menores, como as com diâmetro aerodinâmico inferior a $2,5\mu\text{m}$. Segundo a medida que o tamanho das partículas diminui, a razão entre a superfície da área e o volume (massa) da partícula aumenta. Esta suposição é baseada na equação matemática para a área da superfície ($S.A=4\pi r^2$) e volume ($V=4/3\pi r^3$) das esferas, o que pode ser usado para aproximar as propriedades do material particulado. De acordo com estas equações, um decréscimo de 10 vezes no raio da partícula poderia consequentemente resultar em um aumento de 10 vezes na razão entre a área da superfície e a massa. Isto aumenta grandemente a adsorção de constituintes químicos sobre a

superfície das partículas e aumenta também a superfície de contato entre as partículas e as células do tecido em que são depositadas (Salvi e Holgate, 1999). E finalmente, de acordo como o CEPA/FPAC Working Group (1999) citado por Carnelley e Le (2001), as espécies químicas mais freqüentemente associadas aos efeitos do MP (compostos orgânicos, traços de metais, sulfatos e nitratos) são encontrados predominantemente nas frações finas e ultra finas das partículas ambientes. Em consequência a estas características maior atenção tem sido direcionada para pesquisas sobre os mecanismos de ação das partículas finas e, ainda mais recentemente, para das ultra finas (Carnelley e Le, 2001).

Figura 03. Relação entre as partículas e as estruturas celulares do pulmão. As partículas de 10, 1 e 0,1μm são comparadas com o epitélio brônquico, note-se que as partículas de 1 e 0,1μm não são visíveis na superfície do muco brônquico. À direita as partículas, 10, 1 e 0,1μm, são comparadas ao cílio das vias aéreas (modificado de Donaldson, 2001).

As partículas ultra finas, com diâmetro aerodinâmico menores que 100nm, são muito pequenas, quando comparadas com as estruturas celulares o que pode ser de grande importância para os problemas de saúde, devido a sua penetrabilidade nas vias aéreas (figura 03) (Donaldson, 2001).

1.4 - Epitélio respiratório e o aparelho mucociliar

Quando um poluente penetra nas vias aéreas a primeira barreira que ele encontra é o filme líquido de muco que recobre a superfície epitelial. Este filme de muco deverá agir como barreira física, aderindo e transportando as partículas para o meio externo e, deverá também, agir como barreira química, através da ação de substâncias, nele contidas, que neutralizem os efeitos tóxicos deste contato (Knowles et al., 2002).

O muco respiratório é continuamente produzido, e deve ser eficientemente eliminado, evitando-se, dessa forma, a obstrução das vias de condução e possibilitando a efetiva eliminação das partículas nele depositadas.

Em indivíduos saudáveis o “clearance” das vias aéreas é mantido através de um eficiente sistema de transporte mucociliar (TMC). A eficiência deste transporte é dependente da integridade do epitélio que deverá produzir e manter o muco respiratório com características, físicas e químicas, que possibilitem sua interação com os cílios das células ciliadas do epitélio respiratório (Puchelle et al., 1980). Em situações patológicas,

quando ocorre o aumento da produção de muco, o transporte pela tosse assume importância progressivamente maior (King, 1987).

O epitélio respiratório é pseudoestratificado, ciliado, revestindo desde a traquéia até os bronquíolos. As células que revestem as vias aéreas são classificadas de acordo com sua função, em diferentes tipos, dentre os quais são especialmente importantes para a defesa brônquica as células secretoras e as células ciliadas. As células ciliadas possuem cerca de 200 cílios, com cerca de cinco a sete micrômetros na região da traquéia, tornando-se progressivamente menores nas regiões mais periféricas do pulmão. As principais fontes de secreção pulmonar são as glândulas da submucosa, onde são encontradas as células mucosas e serosas, presentes somente nas vias aéreas cartilaginosas, e células caliceforme (ou “globet cells”), serosas e células de clara presentes no epitélio das vias aéreas. São atualmente descritos dez tipos celulares no epitélio respiratório, incluindo-se células com papel ainda pouco conhecido (“special type” e “brush”) (Jeffery, et al., 1983; Lorenzi, et al., 1991 citados por Yagi, 2002).

Figura 04. Estrutura do epitélio respiratório. 1: célula ciliada; 2: célula secretora; 3: camada gel do muco respiratório; 4: capilares da submucosa; 5: fibras musculares da submucosa (modificado de Morgenroth, 1988 por Yagi, 2002)

Na figura 04, apresentamos um esquema com as principais estruturas do epitélio respiratório.

O meio fluido que reveste o epitélio respiratório é impermeável à água e mede de 2,0 a 5,0 μ m de espessura. Este fluido, ou mais freqüentemente denominado de muco, pode ser dividido em duas fases: a epifase gel, o muco propriamente dito, que é secretada pelas células mucosas glandulares e caliciformes, e a hipofase sol, atualmente denominada de líquido periciliar (LPC), que é produzida pelas células de secreção serosa glandulares e

pelas células de clara e, como por transudação a partir dos vasos que irrigam as vias aéreas (Jiang et al.,1993).

O LPS recobre continuamente as vias aéreas, desde a traquéia até os bronquíolos, ao contrário da epifase gel, fragmentada pelo movimento ciliar (Saldiva,1990). Os mecanismos reguladores da secreção dessas duas fases ainda não estão de todo esclarecidos.

O controle da secreção da LPC é fundamental para a eficiência do transporte mucociliar, de forma a manter os cílios em contato ideal com a hipofase gel. Um aumento da espessura do LPC promove o desacoplamento entre muco e cílio, ao passo que o LPC com espessura reduzida leva a distúrbios de transporte por interferência mecânica com a fase de recuperação do cílio após seu batimento efetivo (Saldiva,1990). A regulação da quantidade do LPC depende de trocas iônicas realizadas pelas células ciliadas. Nestas células estão localizados canais iônicos específicos para sódio, excreção para a luz das vias aéreas e de cloro, reabsorção de fluido da luz das vias aéreas para o interstício (Joris, 1993; Winters, 1997). As células epiteliais são polarizadas anatômica e funcionalmente, o que é fundamental para que exerçam suas funções (Boucher, 1994). Possuem uma membrana apical, que se mantém em contato com a luz, e uma membrana baso-lateral, que mantém contato com o espaço intersticial e vasos sangüíneos. As células são alinhadas lado a lado e são separadas por um espaço intercelular. Próximo ao ápice o espaço intercelular é estreitado por junções firmes, as “tight junctions” que determinam uma difusão seletiva do espaço intercelular (Boucher, 1994). O transporte de solutos através do

epitélio gera gradientes osmóticos que movimentam a água, que ocorre aparentemente através dos espaços intercelulares (Welsh, 1988). Existem dois mecanismos básicos de transporte iônico através do epitélio respiratório: um que determina a capacidade de absorção de líquido e um outro oposto, que determina a secreção de líquidos (Welsh, 1987; Boucher, 1994).

A absorção de líquidos é efetuada através de um canal específico na membrana apical que facilita a entrada de sódio, a favor de gradiente eletroquímico. Uma vez dentro da célula, o sódio sairá pela membrana basolateral, através da bomba Na-K-ATPase. A passagem do Na^+ provoca um desequilíbrio de cargas, gerando energia para a passagem passiva de Cl^- (Barroso, et al.,1992) (Figura 05). Os canais iônicos presentes nas células epiteliais, além de regularem o LPS, provavelmente regulam o grau de hidratação do muco, modulando suas propriedades reológicas (Verdugo, 1983).

O controle da secreção do muco ainda requer estudos para sua melhor compreensão, mas, aparentemente, estímulos colinérgicos, alfa e beta-adrenérgicos, histamina, prostaglandinas, AMP, GMP, e íons cálcio estão envolvidos no controle do mecanismo de secreção (Saldiva, 1990, Boucher, 1994).

Figura 05. Mecanismos de absorção (A) e secreção (B) de íons, água e eletrólitos do epitélio respiratório. (TJ: tight-junction). (modificado de Lorenzi, 1994 por Yagi, 2002).

O movimento ciliar obedece a uma organização rígida, para que o muco seja propelido de forma eficiente na direção correta. Isto é possível porque o retorno do cílio se faz pelo LPC, camada menos viscosa, mais lentamente que a propulsão, diminuindo ao mínimo o movimento retrógrado. Além disto o movimento é coordenado em uma mesma célula e entre células vizinhas. Wong et al. (1993) propõem que esta coordenação ocorre pela transmissão mecânica do impulso gerado pelo batimento de um cílio ao cílio vizinho.

Como consequência de processos irritativos da árvore respiratória, por inalação de gases intoxicantes e fumo, ou de situações em que as funções epiteliais são prejudicadas por deficiências, ou na estrutura ciliar ou nos processos fisiológicos do epitélio, como na Fibrose Cística, em que há uma deficiência nos canais de Cl (Boucher, 1996), o perfil celular do epitélio e glândulas pode sofrer alterações, mudando a composição do muco levando à deficiência no transporte e ao acúmulo do muco. A quantidade de muco aumenta ao mesmo tempo em que a LPC diminui (Saldiva, 1990). A secreção passa a ser de mucopolissacarídeos ácidos e sulfatados, mudando as propriedades físico-químicas do muco que passa a ser um muco mais viscoso, e as células submetidas a este ambiente sofrem também alterações qualitativas. O resultado final desta retenção de muco no trato respiratório é a dificuldade da eliminação de microorganismos inalados, facilitando as infecções (Saldiva, 1990) .

Além das alterações do muco, há agentes que interferem primariamente na função das células ciliadas, lesando-as. O fumo, as infecções viróticas e bacterianas, as baixas temperaturas, hipóxia, gases irritantes e alguns tipos de particulado, são exemplos destas condições.

As vias de condução, desde as vias aéreas superiores até o bronquíolo terminal, são estruturadas anatômica e fisiologicamente para proteger a região alveolar. Além de fornecer um sistema de vigilância imonológico, o epitélio deve condicionar o ar inspirado de tal forma que ao chegar na intimidade das áreas de troca gasosa, esteja devidamente filtrado, aquecido e umidificado (Lorenzi et al., 1991).

O sistema de tubulação aérea dos pulmões é baseado em bifurcações ao longo de 23 gerações de brônquios, o que faz com que a soma das áreas de secções transversais aumente progressivamente (Böhm, 1989). Isso faz com que o fluxo de ar inspirado seja mais lento à medida que se aproxima dos alvéolos, e passe de turbulento a laminar. O ar inspirado vai até os bronquíolos terminais, ao nível da 16ª geração por fluxo de massa. Nas porções mais distais, a movimentação dos gases depende principalmente da difusão, mas, como as distâncias são extremamente pequenas e a difusão das moléculas de gás dentro das vias aéreas é rápida, isto é suficiente para as funções pulmonares. A lentificação do fluxo favorece a redução da penetração de partículas inaladas nas porções mais distais do pulmão (Böhm, 1989).

A inércia das partículas, que lhes dá a tendência de seguir sempre em linha reta, promove colisões com as paredes da árvore respiratória, graças às bifurcações frequentes. Este mecanismo de deposição, impactação inercial, ocorre principalmente nas narinas e vias aéreas superiores e embora seja o principal mecanismo de deposição das partículas grossas, acima de 10µm, tem influência sobre uma ampla faixa de diâmetros de partículas inaladas (Böhm, 1989).

A redução do fluxo de ar nas vias aéreas favorece a deposição das partículas com diâmetro entre 0,5 a 5,0 µm por sedimentação gravitacional. Este é o mais importante meio de deposição de partículas nos alvéolos (Böhm, 1989).

Os movimentos Brownianos fazem com que as moléculas de gases,

nas regiões onde o fluxo é mínimo, deslocem as partículas ao acaso, até que entrem em contato com as paredes das vias aéreas. Por este processo ocorre a deposição principalmente das partículas com diâmetro inferior a $0,1\mu\text{m}$ (Böhm, 1989).

As partículas ultra finas são as que possuem maior probabilidade de atingirem os alvéolos. No entanto, não é só o tamanho das partículas que determina sua capacidade de penetração nas vias aéreas. As partículas de asbesto, por exemplo, medem $300\mu\text{m}$ de comprimento e apenas $0,1\mu\text{m}$ de diâmetro, mas suas formas aerodinâmicas permitem que atinjam a região alveolar (Böhm, 1989).

1.5 - Estresse oxidativo

Segundo Kelly (2003) o termo estresse oxidativo é relativamente novo em biologia. Este termo foi primeiramente proposto por Siens, 1991 e, é hoje, um termo extensivamente utilizado. Em seu livro, "Oxidative stress II", publicado em 1991, Siens define estresse oxidativo como sendo "um distúrbio no balanço entre pro-oxidantes e antioxidantes em favor do primeiro, levando a potencial lesão tecidual". Desde então, inúmeras outras definições foram propostas, todas na tentativa de explicar um processo que envolve essencialmente o fluxo de elétrons de uma molécula para outro sítio biológico. A amplitude deste processo depende da reatividade das moléculas envolvidas. Em circunstâncias normais, os elétrons orbitam em volta do núcleo do átomo em pares, com oposição dos "spins". Quando um átomo possui um elétron não pareado, sua reatividade aumenta e este

átomo é, então, definido como um radical livre. Nos sítios biológicos os radicais livres são potencialmente prejudiciais, visto que eles reagem indiscriminadamente com moléculas vizinhas. Este processo de “roubo de elétrons” leva a oxidação, e muito freqüentemente a inativação das funções da molécula. Se estas reações são numerosas podem causar extensiva lesão celular. A extensão das lesões depende da capacidade da neutralização dos radicais livres pelo sistema de defesa antioxidante do organismo (Kelly, 2003).

A oxidação química ocorre continuamente em condições fisiológicas normais como consequência do metabolismo aeróbico. A célula eucarionte produz energia através da cadeia fosforilativa durante a respiração mitocondrial utilizando o oxigênio captado da circulação e transformando-o em ATP e água. A mitocôndria utiliza 90% do O₂ celular e durante esse processo na passagem pela cadeia de transporte de elétrons, um elétron pode desgarrar-se e ser adicionado de 1 a 3% desse oxigênio transformando-o em radical livre. O metabolismo do oxigênio (respiração), a degradação da catecolamina (monoamina oxidase) ou o “turnover” da monooxigenase (citocromo P450) estão todos envolvidos no metabolismo oxidativo basal da atividade celular. Portanto, resumidamente, os radicais livres são constantemente produzidos e eliminados nos organismos. Em situações normais, eles apresentam ações fisiológicas fundamentais como neutralização de bactérias, desintoxicação de drogas e apoptose de células não desejadas como células com alterações genéticas ou cancerosas. Por serem muito instáveis e normalmente produzidos em pequenas quantidades,

seu clareamento da célula é rápido, geralmente secundário ao decaimento espontâneo ou por ação de antioxidantes naturais. Porém, quando presentes em grande quantidade causam lesões à célula através de dano a macromoléculas como lípides, proteínas, carboidratos e DNA. Então, existe uma variedade de substâncias endógenas para neutralizar as espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas nestes processos fisiológicos, como por exemplo, enzimas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase, a glutathione peroxidase, a glutathione, entre outras, e proteínas como a ferretina e transferrina. Substâncias exógenas, provenientes da dieta alimentar, como o α -tocoferol acetato, ácido ascórbico também são importantes na manutenção do equilíbrio oxidativo no meio celular. Quando as espécies reativas de oxigênio alcançam níveis que superam a capacidade de ação deste sistema de defesa, durante um estado fisiopatológico ou evento toxicológico, ocorrem alterações químicas dos processos biológicos moleculares. Este é o ponto onde o sistema entra em estresse oxidativo (Espey et al., 2000). As ações deflagradas pelos radicais livres por sua vez, também induzem reações auto-catalíticas onde moléculas com as quais eles reagem são auto convertidas a radicais livres propagando e perpetuando a cadeia de danos. As lesões secundárias ao estresse oxidativo contribuem para o aparecimento de doenças degenerativas e inflamatórias como o câncer, doenças cardiovasculares, declínio do sistema imune, disfunção cerebral e catarata, podendo agravar doenças pré-existentes levando a subsequente morte.

A peroxidação lipídica da membranas celular e de organelas, a oxidação de proteínas e a quebra da cadeia de DNA no núcleo são os principais danos celulares resultantes da ação das espécies reativas.

A peroxidação lipídica de membranas é geralmente deflagrada por ações mistas das oxidases do citocromo P-450 no retículo endoplasmático do fígado e de outros órgãos. O dano oxidativo geralmente é ocasionado por ligação covalente direta de ácidos graxos insaturados de membranas lipídicas e proteínas a radicais livres derivados de oxigênio, particularmente o OH^* . A interação radical-lípide interage com peróxidos, que são instáveis e reativos, e deflagram (propagam) a reação catalítica em cadeia que pode resultar em dano extenso de membranas e organelas celulares. Este processo pode ser atenuado se o radical livre for captado por um clareador de radicais livres como a vitamina E embebida na membrana celular, bloqueando a reação em cadeia danosa e descontrolada. No processo de estresse oxidativo são liberados produtos de quebra lipídica onde se incluem ácidos graxos livres, acil carnitina e lisofosfolípidos, produtos catabólicos que acumulam na célula como resultado da degradação lipídica, podendo liberar substâncias secundárias a ativação da fosfolipase A2 e metabólitos inflamatórios do ácido aracdônico de membrana tanto por via da ciclooxygenase (prostaglandinas) como por via lipoxigenase liberando leucotrienos que perpetuam a reação em cadeia. A lesão induz a aumento da permeabilidade celular e conseqüente apoptose.

A modificação oxidativa de proteínas é produzida através da ação oxidativa dos radicais livres em resíduos laterais de amino-ácidos, formação

de proteínas-proteínas de ligação cruzada (ex. mediados por sulfidrilas) em fragmentação dessas proteínas. A modificação oxidativa aumenta a degradação de enzimas críticas pelo complexo multicatalítico, aumentando o dano celular.

A lesão de DNA ocorre secundária a reações com timidina no núcleo e no DNA mitocondrial que produzem quebras de hélices simples no DNA. Esta lesão do DNA foi implicada fisiopatologicamente com o envelhecimento celular, transformações malignas e alterações genotípicas adquiridas.

Os metais de transição foram selecionados na evolução molecular para efetuar grande número de funções biológicas como resultado de suas interações com o oxigênio e suas ações na formação de complexos doador-receptor (coordenação). Estes metais são micronutrientes essenciais utilizados em vários aspectos da função celular normal. Como resultado de sua abundância na natureza, o ferro tem maior participação na fisiologia normal dos sistemas vivos em relação a outros metais de transição. Estas mesmas propriedades químicas que elegeram estes metais como catalisadores de numerosas reações do oxigênio molecular também fazem deles uma ameaça para a vida através da geração de espécies reativas de oxigênio (Ghio et al., 1998). Estas mesmas propriedades químicas que elegeram estes metais como catalisadores de numerosas reações do oxigênio molecular para catalisar as funções homeostáticas e de síntese, O_2^- , o H_2O_2 e o $\cdot OH$ gerados a partir de reações em que estes metais participam (equações 1, 2 e 3), também fazem deles uma ameaça para a vida através da geração de espécies reativas de oxigênio (Ghio et al., 1998).

Consequentemente, os metais de transição devem ser transportados e estocados de forma a prevenir a formação das espécies reativas de oxigênio (Ghio et al., 1998).

Antioxidantes são definidos por seu mecanismo de ação, então podem ser considerados mecanismos antioxidantes qualquer processo que:

- a) previna a formação de radicais livres;
- b) converta os oxidantes em espécies menos tóxicas;
- c) isole os mesmos longe das estruturas celulares vitais;
- d) repare o dano molecular provocado pelos radicais livres.

As substâncias antioxidantes são a primeira linha de defesa contra o estresse oxidativo dos pulmões. Análises cromatográficas de amostras do muco respiratório coletadas através de lavado broncoalveolar, demonstram que este possui concentrações de substâncias antioxidantes de baixo peso molecular similares as do sangue, incluindo glutathione (GSH), ácido ascórbico (vitamina C), ácido úrico e α -tocoferol (vitamina E). O muco respiratório contém também enzimas antioxidantes, tais como a superóxido dismutase e catalase, como também proteínas quelantes de metais como a ceruloplasmina e transferrina (Kelly, 2003).

Em um esforço para prevenir ou minimizar a injúria provocada pelas espécies reativas de oxigênio, investigadores têm avaliado substâncias que previnam sua formação ou que minimizem seus efeitos.

O α -tocoferol (vitamina E), o mais potente tocoferol, é um antioxidante lipossolúvel, secretado para a luz das vias aéreas pelas células alveolares tipo II juntamente com o surfactante. É encontrado nas membranas celulares e fluidos extracelulares, incluindo o fluido que recobre a superfície alveolar, embora sua ação primária esteja localizada nas membranas. A vitamina E possui importante efeito protetor contra a peroxidação lipídica agindo como seqüestrador de radicais peróxil (Gilmour et al., 2002).

O n-Propil galato, um antioxidante sintético, é utilizado pela indústria alimentícia para evitar a oxidação dos alimentos. O n-Propil galato também é reconhecido por proteger algumas células da lesão oxidativa. Vários mecanismos são propostos para explicar a ação do n-Propil galato. Dentre eles podemos citar como um anti-oxidante “chain-breaking” ou ligar-se aos metais de transição, ou agir como seqüestrador do ânion superóxido ou do radical hidroxila, ou ainda, iniciar a sinalização transmembrana ou a rotação de genes específicos. De acordo com Deeble et al. (1988), citados por Reddan et al. (2002), a habilidade do n-Propil galato de seqüestrar radicais livres, reportaram que uma molécula de n-Propil galato reage com dois ânions superóxidos. Esta evidência foi citada para explicar a ação antioxidante do n-Propil galato nos alimentos. A importância do ânion superóxido de gerar radicais livres deve-se a sua capacidade de iniciar a formação de outras espécies reativas de oxigênio potencialmente lesivas (Fridovich, 1978 citado por Reddan et al., 2002). Para McGalhan et al. (1994 a,b), citados por Reddan et al. (2002), o superóxido pode ser

especialmente lesivo quando em combinação com a liberação do ferro proveniente de proteínas armazenadas.

O ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) é um composto orgânico que age como ligante polidentado, formando complexos muito estáveis com diversos íons metálicos. Devido a isso, é usado como anti-coagulante do sangue, pois "inativa" os íons de cálcio, que promovem a coagulação sangüínea. Esta habilidade de "complexar" e assim "inativar" íons metálicos é também usada como antídoto para envenenamento por chumbo. Também tem uso em detergentes e xampus, pois se combina com cálcio e magnésio, evitando que se precipitem com o produto, como acontece com sabão, quando usado com águas duras (ricas em cálcio e magnésio) (Retirado de <http://pt.wikipedia.org/wiki/EDTA>).

1.6 - Poluição e Mecanismos Fisiopatológicos

A maioria dos efeitos do MP sobre a saúde demonstrado em estudos epidemiológicos relata a exacerbação de sintomas respiratórios em indivíduos suscetíveis. A habilidade dos metais de transição e outras espécies químicas em induzir o estresse oxidativo ou gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) no pulmão é atualmente sugerida como o principal mecanismo tóxico do material particulado (Dreher, 2000). Li et al.,1997, demonstraram o aumento da resposta inflamatória caracterizada pelo aumento nos níveis de fator de necrose tumoral (TNF- α) e de óxido nítrico (NO) no lavado broncoalveolar de ratos expostos ao PM₁₀ e também um aumento na permeabilidade da membrana celular no epitélio dos ratos e em

células A549 (células do carcinoma de pulmão humano) também expostas a amostra do PM₁₀. Como foi demonstrada a redução da glutatona nos pulmões a atividade oxidante foi apontada como o mecanismo tóxico do PM₁₀. A exposição de ratos ao “residual oil fly ash” (ROFA) produz uma aguda reação inflamatória pulmonar, evidenciada através do aumento de leucócitos polimorfonucleares no pulmão (Pritchard et al.,1996; Dreher et al.,1997). Becker et al. (1996) em um estudo *in vitro*, correlacionaram o grau de inflamação com o conteúdo de metais de transição do ROFA e radicais livres gerados, onde macrófagos alveolares e células epiteliais foram identificados como os primeiros iniciadores da resposta inflamatória no pulmão, ativando o mecanismo de defesa através da secreção de citocinas e quimiocinas.

Apesar da maioria dos estudos sobre os mecanismos tóxicos das partículas focarem as respostas inflamatórias, outras possíveis respostas a ação das partículas de poluição sobre o sistema biológico também são investigadas.

Um importante efeito do material particulado é sua capacidade genotóxica. O aumento do risco da incidência de câncer de pulmão tem sido demonstrado após exposições crônicas ao MP (Dockery et al.,1993). Os compostos orgânicos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), são as espécies químicas adsorvidas ao MP com conhecida ação genotóxica. Esta classe de compostos tem sido extensivamente estudada e vários deles, incluindo os benzo-pirenos, apresentam potencial mutagênico ou carcinogênico. Vários outros compostos orgânicos presentes na

complexa mistura que é o material particulado, como as emissões de combustão do diesel, ainda não tiveram seu potencial mutagénico testado. Hornberg et al., (1998), observaram a indução de permuta de cromátides irmãs, um indicador de dano genético, em células expostas a concentrações relativamente baixas de PM₁₀ e PM_{2,5}. Este efeito foi evidente para os dois tamanhos de particulado mas foi particularmente proeminente na fração PM_{2,5}. A diferença na toxicidade entre as partículas finas e grossas foi novamente evidenciada recentemente através do monitoramento da citotoxicidade e dos danos ao DNA medidos através do Teste do Cometa (Hsiao et al., 2000). Estes resultados são intuitivos desde que os compostos orgânicos tendem a acumular-se em maior quantidade na fração fina do material particulado. Outros grupos também demonstraram a habilidade dos compostos orgânicos adsorvidos ao MP de gerar danos ao DNA (Binkova et al., 1998; Dreher, 2000). Knaapen et al. (2000) citados por Carnelley e Le (2001) encontraram duas vezes mais de 8-hydroxideoxiguanosina (8-oxodG), uma forma de dano oxidativo ao DNA, em células de pulmão tratadas com extratos de PTS. A formação do 8-oxodG foi inibida com deferoxamina, dando embasamento do envolvimento dos metais na resposta genotóxica do MP.

Vários dos constituintes químicos das partículas ambiente são capazes de induzir uma resposta mutagênica ou genotóxica a moderados níveis de exposição *in vitro*. Entretanto, a genotoxicidade não é considerada o maior mecanismo da toxicidade das partículas ambientais em humanos devido a falta de evidências epidemiológicas convincentes. Primeiro, o

aumento do risco de câncer de pulmão correlacionado a exposição a poluição do ar é considerado pequeno quando comparado ao encontrado em fumantes. Segundo existe grande dificuldade em separar os efeitos do cigarro da exposição à poluição nas populações estudadas (Carnelley e Le, 2001). Os sintomas respiratórios e as exacerbações de doenças preexistentes são os efeitos mais óbvios da exposição ao material particulado. Entretanto, o aumento no risco de problemas cardiovasculares em populações expostas a altos níveis de MP ambiente são também evidenciados em estudos epidemiológicos (Pope, 2000; Samet et al., 2000). O mecanismo para os efeitos cardiovasculares do MP ainda não está totalmente claro. Um possível mecanismo destes efeitos é baseado em mediadores inflamatórios sistêmicos liberados de células epiteliais ou macrófagos do pulmão. Esta resposta inflamatória poderia causar aumento na coagulação sangüínea, resultando no aumento de efeitos cardiovasculares em indivíduos suscetíveis (Seaton et al., 1995). Esta proposta foi confirmada por um estudo que apresentou o aumento da viscosidade do plasma sangüíneo em homens e mulheres expostos aos altos níveis de MP (Peters et al., 1997). O fibrinogênio foi responsabilizado por aumentar a viscosidade do plasma sangüíneo e induzir a agregação de células vermelhas sangüíneas. Estes dois fatores poderiam estar envolvidos no aumento do risco dos efeitos cardiovasculares. Gardner et al., 2000, demonstraram o aumento de fibrinogênio em ratos expostos a altas concentrações de ROFA, mas por outro lado, a exposição a ROFA vulcânica, livre de metais de transição em sua composição, não apresentou

a mesma resposta. Estes resultados indicam que o mecanismo que leva ao aumento do fibrinogênio no plasma sanguíneo é induzido por citocinas ou outros mediadores inflamatórios liberados por mecanismos ativados por metais adsorvidos ao MP.

O grande número de estudos, tanto epidemiológicos quanto experimentais nos mostram claramente os efeitos deletérios da poluição do ar sobre a saúde do homem. Em virtude desta constatação, políticas de controle da qualidade do ar foram implantadas na maioria dos grandes centros urbanos, visando o controle das emissões, estabelecendo níveis de concentração máxima para os poluentes lançados na atmosfera. Na grande maioria dos locais onde a política de controle da qualidade do ar foi implantada, alcançou-se um relativo controle destas emissões, com as concentrações dos poluentes raramente ultrapassando os níveis estabelecidos. Tem-se freqüentemente demonstrado que a exposição a pequenos aumentos na concentração dos poluentes, mesmo dentro dos padrões estabelecidos para controle de qualidade do ar ainda pode estar sendo danosa aos organismos vivos. Assim, a poluição do ar ainda é um grande problema de saúde pública, com altos custos financeiros a sociedade. Miraglia et al. (2005), estimou que os custos dos efeitos da poluição do ar sobre a saúde de idosos e crianças para a cidade de São Paulo são de aproximadamente U\$ 3.222.676 ao ano.

Apesar dos inúmeros estudos tentando identificar os componentes da poluição do ar com maior toxicidade e os mecanismos de ação destes poluentes nos sistemas biológicos, estas são questões que ainda não foram

totalmente definidas. Encontramos grande dificuldade em solucionar tais questões pois os poluentes, e em especial o material particulado disperso na atmosfera, possui grande complexidade, com sua composição variando regionalmente e consequentemente diversificando seus efeitos deletérios sobre a saúde. O que fica claro é que há uma crescente necessidade de intensificar nossa compreensão sobre os mecanismos de ação e de identificar os componentes mais tóxicos dos poluentes. Isto nos permitiria identificar as fontes emissoras com maior relevância e direcionar pesquisas tecnológicas e políticas de controle, visando minimizar estas emissões.

Na tentativa de melhor compreender a complexidade das partículas do ar e seus mecanismos de ação nos sistemas biológicos nós delineamos este estudo experimental para responder a três questões:

Qual a contribuição das partículas emitidas por veículos automotivos movidos a diesel para a saúde dos moradores da cidade de São Paulo?

Substâncias antioxidantes seriam capazes de eliminar ou minimizar os efeitos lesivos dos metais de transição adsorvidos às partículas ao aparelho mucociliar?

Partículas com origem em fontes emissoras diferentes teriam efeitos semelhantes sobre o aparelho mucociliar?

2

OBJETIVOS

2 - OBJETIVOS

2.1 - Objetivo geral

Avaliar os efeitos de diferentes partículas de poluição atmosférica, quanto a origem e quanto a sua composição, sobre o sistema biológico.

2.2 - Objetivos específicos

2.2.1 - Avaliar o impacto da emissão de veículos movidos a diesel na atmosfera urbana de São Paulo.

2.2.2 - Avaliar a toxicidade do material particulado de fonte fixa, o “residual oil fly ash”, ROFA, sobre o aparelho mucociliar de palato de rã, bem como a ação protetora de substâncias antioxidantes sobre esses efeitos.

2.2.3 - Avaliar se a composição determinada pela fonte emissora do material particulado fino é determinante nos efeitos tóxicos sobre o aparelho mucociliar.

3

***MATERIAIS E
MÉTODOS***

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Experimento I

Nosso objetivo nesta fase do trabalho foi estudar o impacto da emissão de veículos movidos a diesel na atmosfera urbana de São Paulo.

Para esta avaliação utilizamos material particulado fino, com diâmetro aerodinâmico equivalente igual e/ou inferior a $2,5\mu\text{m}$, coletado na cidade de São Paulo em dois bioensaios vegetais, o teste de micronúcleo em *Tradescantia pallida* (TRAD-MN) e o teste de inibição de mitose em células meristemáticas da raiz de *Allium cepa* (A. cepa).

3.1.1 - Amostragem e caracterização do Material Particulado Fino ($\text{PM}_{2,5}$)

O $\text{PM}_{2,5}$ foi coletado nos dias 7 e 15 de abril do ano de 2003, através de um amostrador de grande volume (AGV) fabricado pela Energética do Brasil, com fluxo de ar de 1,1 litros por metros cúbicos por minuto durante 24 horas. Ao amostrador está acoplada uma cabeça separadora “inlet” (Tisch Environmental Ins, USA) que permite a separação de partículas com diâmetro aerodinâmico equivalente igual e/ou inferior a 2,5 micrômetros ($\text{PM}_{2,5}$). O AGV estava localizado no teto do prédio da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no cruzamento da Avenida Dr. Arnaldo com a Rua Teodoro Sampaio distando aproximadamente 15 metros de altura do solo. Por razões de segurança o AGV não pôde ser instalado no solo do Campus da Faculdade de Medicina.

As partículas coletadas a aproximadamente 15 metros do solo, não refletem a exposição ao nível da rua mas provavelmente correspondem à exposição de milhões de habitantes de São Paulo que vivem e trabalham em edifícios de vários andares. No dia 7 houve total paralisação do tráfego de ônibus na região em consequência a uma greve e no dia 15 de abril de 2003 o tráfego destes veículos havia retornado ao normal.

Os dados de temperatura, umidade, direção e velocidade do vento e pressão atmosférica foram fornecidos pelo Instituto de Astronomia, Geofísica e Ciências Atmosféricas (IAG) da Universidade de São Paulo.

As partículas foram coletadas em filtros de fibra de vidro, os quais foram secos durante 24 horas em estufa a 50°C antes e após a coleta e pesados em balança analítica antes e após a exposição para determinar a massa coletada e a concentração do $PM_{2,5}$ na atmosfera.

Metade de cada um dos filtros foi enviada ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nuclear (IPEN) para a determinação dos traços dos elementos Arsênio (As), Brômio (Br), Cobalto (Co), Cloro (Cl), Ferro (Fe), Lantânio (La), Magnésio (Mn), Antimônio (Sb), Escândio (Sc) e Tório (Th), determinação da concentração de enxofre (S) pela e dos hidrocarbonetos associados a emissões automotivas, benzeno, tolueno, etil-benzeno e xileno (BTEX).

A determinação dos elementos traços do material particulado coletado sobre os filtros foi feita através da análise com ativação com neutrons. Os filtros contendo as amostras do material particulado e as amostras padrão dos elementos foram irradiadas por um fluxo de neutrons do reator de pesquisas nucleares, IEA-R1, por 0,5 minutos e 16 horas. Após adequado

tempo de decaimento, as amostras irradiadas e as amostras padrão foram medidas usando um detetor hiperpuro Ge acoplado a um analisador multicanal. As concentrações dos elementos foram calculadas por um método comparativo. Filtros não expostos foram também analisados usando as mesmas condições experimentais que as adotadas para a análise dos filtros expostos, contendo $PM_{2,5}$, e as amostras padrão. Os valores dos filtros brancos foram descontados dos valores obtidos das amostras e o resultado expressado em função do volume de ar amostrado durante a coleta do material particulado.

Para a determinação do enxofre (S) foi utilizado a Espectrometria de Fluorescência de Raio-X. Foram utilizadas partes do filtro não exposta para o branco.

A razão entre as concentrações de hidrocarbonetos associados a emissões automotivas, benzeno, tolueno, etil-benzeno e xileno (BTEX), foi determinada após extração com pentano, através da cromatografia gasosa e espectrometria de massa (CG/EM). As análises químicas foram feitas em triplicata e os resultados expressos como média.

3.1.2 - Ensaios Toxicológicos

Para avaliar a toxicidade das partículas os filtros, previamente pesados, foram imersos em água destilada e submetidos a ultrasonicação por 8 horas. Após a extração os filtros foram secados em estufa a 50°C por 24 horas e novamente pesados. A concentração utilizada foi calculada através da diferença entre a massa inicial após exposição dos filtros e a

massa final após a extração. Foram preparadas soluções com duas concentrações do extrato 0,1 e 1,0 mg/l que foram utilizados para a avaliação do potencial genotóxico, através do teste de micronúcleos em *Tradescantia pallida* e do potencial tóxico através do teste de inibição de mitoses em *Allium cepa*.

3.1.2.1 - Teste de micronúcleo em *Tradescantia pallida*

A *Tradescantia pallida* (T. pallida) é uma planta herbácea, prostada, suculenta, de 15 a 25 cm de altura, com folhas e flores roxas e pubescentes, ornamental, nativa da América do Norte e Central (México e Honduras) e classificada em 1975 (USDA, 1997, Loreni, 2001 citados por Sumita, 2002).

A T. pallida é amplamente utilizada para monitoramento de poluição como unidade de detecção de efeitos tóxicos da poluição do ar, por meio do teste do micronúcleo em suas células germinativas (Batalha et al., 1999; Ferreira et al., 2000; Fomin et al., 1999; Grant et al., 1992; Guimarães et al., 2000; Knasmüller et al., 1998; Ma et al., 1984; 1994; Rodrigues et al., 1996;1997) bem como acumuladora de partículas (Sumita et al., 2003) sendo portanto, importante ferramenta tanto para o biomonitoramento quanto para a determinação do potencial genotóxico.

Inflorescências jovens da *T. pallida* (n=125 inflorescências) foram coletadas de plantas cultivadas nos jardins do *campus* da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e mantidas no laboratório de Poluição Atmosférica Experimental da Faculdade de Medicina/USP, por 24 horas, em solução nutritiva de Hoagland (HOAGLAND & ARNON, 1950).

Após este período, as inflorescências foram divididas em oito grupos, e imersas nas soluções teste, durante 8 horas, como a seguir:

1) grupo controle positivo, inflorescências imersas em água destilada contendo formaldeído na concentração de 1:5.000, expostas simultaneamente aos grupos greve ($PM_{2,5}0,1$ e 1);

2) grupo controle positivo, inflorescências imersas em água destilada contendo formaldeído na concentração de 1:5.000, expostas simultaneamente aos grupos não greve ($PM_{2,5}0,1$ e 1);

3) grupo controle negativo, imersas em água destilada, expostas simultaneamente aos grupos greve ($PM_{2,5}0,1$ e 1);

4) grupo controle negativo, imersas em água destilada, expostas simultaneamente aos grupos não greve ($PM_{2,5}0,1$ e 1);

5) grupo $PM_{2,5} 0,1$ Greve, imersas em extrato aquoso de material particulado, coletado no dia de greve, na concentração de 0,1 mg/L;

6) grupo $PM_{2,5} 0,1$ Não Greve, imersas em extrato aquoso de material particulado, coletado no dia de não greve, na concentração de 0,1 mg/L;

7) grupo $PM_{2,5}1,0$ Greve, imersas em extrato aquoso de material particulado, coletado no dia de greve, na concentração de 1,0 mg/L;

8) grupo $PM_{2,5}1,0$ Não Greve, imersas em extrato aquoso de material particulado, coletado no dia de não greve, na concentração de 1,0 mg/L.

Ao final do período de exposição, as inflorescências foram mantidas em solução de Hoagland durante 24 horas, período necessário para a continuidade do processo de meiose e para que as células-mães de grãos

de pólen atinjam a fase de tétrades, fase esta em que é possível a visualização dos micronúcleos.

Em seguida as inflorescências foram fixadas em solução de ácido-acético e álcool, na proporção de 1:3, por 24 horas. Os botões jovens das inflorescências foram dissecados e as anteras maceradas sobre lâmina de vidro, juntamente com uma gota de corante aceto carmin (Batalha et al., 1999) conforme o esquema demonstrado na figura 06. Apenas as preparações contendo tétrades jovens foram consideradas.

Foram quantificados micronúcleos de 300 tétrades por lâmina em aumento de 400X. A contagem dos micronúcleos foi feita em lâminas codificadas antes de seu preparo as quais foram decodificadas somente após a finalização do experimento. Os resultados foram expressos em termos de porcentagem (frequência de micronúcleos).

Figura 06. Esquema de preparo das lâminas do TRAD-MN.

Figura 07. Inflorescências de *Tradescantia pallida* expondo

Figura 08. Tétrade de célula de grão de pólen de *Tradescantia pallida* apresentando micronúcleo (1000X).

3.1.2.2 - Teste de inibição de mitose em *Allium cepa*

Para avaliarmos a toxicidade das partículas utilizamos o teste de inibição de mitose em células meristemáticas primárias da raiz de *Allium cepa* (cebola).

Quando um bulbo de cebola é reidratado ocorre estimulação do crescimento das células, o que permite o crescimento das raízes da planta. Entretanto, quando a reidratação é feita em presença de substâncias tóxicas, a divisão celular dos meristemas radiculares pode sofrer inibição, levando ao retardo no processo de mitose. Estas alterações geralmente impedem o crescimento normal da raiz (Fiskesjö, 1985, 1988, 1995). Através da quantificação do número de células da raiz em fase de anáfase tem-se o índice mitótico.

Após cinco dias de imersão em solução de Hoagland, para a indução do crescimento, as raízes de (n=69) bulbos da *Allium cepa* foram divididos em seis (6) grupos, e imersos em soluções teste, durante 30 horas, como a seguir:

- 1) grupo controle positivo, bulbos imersos em água destilada contendo formaldeído na concentração de 1:10.000;
- 2) grupo controle negativo, bulbos imersos em água destilada;
- 3) grupo PM_{2,5} 0,1 Greve, bulbos imersos em extrato aquoso de material particulado coletado no dia de greve, na concentração de 0,1 mg/L;

4) grupo PM_{2,5} 0,1 Não Greve, bulbos imersos em extrato aquoso de material particulado coletado no dia de não greve, na concentração de 0,1 mg/L;

5) grupo PM_{2,5} 1,0, bulbos imersos em extrato aquoso de material particulado coletado no dia de greve, na concentração de 1,0 mg/L;

6) grupo PM_{2,5} 1,0, bulbos imersos em extrato aquoso de material particulado coletado no dia de não greve, na concentração de 1,0 mg/L.

Após este período de intoxicação foram retiradas as raízes dos bulbos as quais foram fixadas em solução de ácido acético e etanol, na proporção de 1:3, por 24 horas e então hidrolizadas em HCl 1N a 60 graus Celsius durante 7 minutos. As raízes foram lavadas em água e 1 mm de raiz foi separado e fixado em solução de aceto carmim sobre uma lâmina a qual foi recoberta com lamínula. O índice mitótico foi determinado contando-se 300 células em aumento de 1.000x em microscópio ótico e expresso em termos de percentagem.

Figura 09. Esquema de preparo e exposição de bulbos de *Allium cepa*.

Figura 10. Células de raiz de *Allium cepa* mostrando célula na fase de anáfase da mitose.

3.1.2.3 - Análise estatística

Para a análise estatística dos dados foi utilizado equações lineares generalizadas, usando como variáveis dependentes a frequência de micronúcleo ou o índice mitótico, e considerando como variáveis exploratórias o tipo de solução e a concentração, como também o período, greve ou não greve. A interação entre concentração e período de amostragem também foi incluído neste modelo. Foi estabelecido nível de significância de 5%. As análises foram realizadas através da utilização do programa estatístico SPSS v10.0.

3.2 - Experimento II

Nesta fase do trabalho nosso objetivo foi avaliar a toxicidade do material particulado de fonte fixa sobre o aparelho mucociliar, bem como a ação protetora de substâncias antioxidantes sobre esses efeitos. Para tanto, expomos o epitélio ciliado de palatos de rã da espécie *Rana catesbiana* ao “residual oil fly ash”, ROFA, coletado em um precipitador eletrostático de uma usina siderúrgica, quantificando parâmetros morfofuncionais do aparelho mucociliar nas variáveis transporte mucociliar (TMC), frequência de batimento ciliar (FBC), diferença de potencial transepitelial (DP) e as alterações morfológicas desse epitélio. Esses dados serão comparados aos resultados obtidos pela exposição dos palatos igualmente expostos ao ROFA porém tratados previamente com uma de três substâncias com capacidade anti-oxidante, o n-Propyl galato, o DL- α -tocopherol acetato (vitamina E), e o EDTA.

3.2.1 - Caracterização do “Residual oil fly ash” (ROFA) através da ativação com neutrons.

O ROFA foi coletado de um precipitador eletrostático de uma usina siderúrgica e armazenado sob refrigeração a 4°C.

A caracterização da composição do ROFA foi feita pôr ativação com neutrons pelo Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN).

Inicialmente, foram preparados os padrões sintéticos dos elementos a serem utilizados na análise do ROFA. Para tanto foram preparadas soluções diluídas simples ou multi-elementares utilizando as soluções padrão certificadas de Sprex Certiprep. Aliquotas destas soluções padrão foram pipetadas sobre tiras de papel de filtro da marca Whatman nº 4. O pipetador utilizado foi da marca Eppendorf, previamente verificado quanto à sua calibração. Após a secagem à temperatura ambiente em um dessecador, estas tiras de papel foram colocadas em invólucros de polietileno. As massas dos elementos nestes padrões variaram de 0,6 a 1.000 microgramas.

O procedimento de análise por ativação consistiu em irradiar cerca de 100 mg da amostra pesados em invólucro de polietileno, juntamente com os padrões sintéticos no reator IEA-R1 do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) por 8 horas e sob fluxo de nêutrons térmicos de $4 \times 10^{12} \text{ n cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$. As medidas das atividades gama foram realizadas após 4 dias de decaimento usando um detetor de Ge hiperpuro, modelo GX2020, acoplado a um processador integrado de sinais, modelo 1510, ambos da marca Cambera. A resolução do sistema utilizado foi de 0,99 keV para o pico de

121,97 keV do ^{57}Co e de 1,89 keV para o pico de 1332,97keV do ^{60}Co . Os espectros gama obtidos foram processados utilizando o programa de computação VISPECT2, o qual foi desenvolvido no próprio laboratório. Os radioisótopos formados foram identificados pela meia vida e energia dos raios gama e as concentrações dos elementos foram calculadas pelo método comparativo (De Soete et al., 1972). Os resultados foram quantificados na base seca do material. A percentagem de perda de peso obtida na secagem do ROFA por cerca de 15 horas a 85° C foi de 0,5%. A solução de ROFA utilizada foi obtida através da ultrasonicação da mistura de ROFA com Ringer durante 50 minutos.

3.2.2 - Preparo do palato de rã

Vários autores têm utilizado o palato de rã da espécie *Rana castesbiana* para estudar o transporte mucociliar e o efeito de agentes químicos sobre o epitélio das vias aéreas (Rubim e cols.; 1990, Festa e cols.; 1997, Macchione e cols.; 1998). O sistema mucociliar em palato de rã possui um epitélio pseudo-estratificado ciliado com várias características similares ao das vias aéreas de mamíferos (Rubim e cols.; 1990, Festa e cols.; 1997, Macchione e cols.; 1998).

Utilizamos animais da espécie *Rana catesbiana*, adultas, pesando aproximadamente 100g, oriundas do Ranário Lummon Agro-indústria Ltda, localizado na Cidade de Mogi das Cruzes, SP. Em nosso laboratório os animais receberam dieta balanceada e água *ad libitum* de acordo com os procedimentos veterinários de rotina até o momento do sacrifício.

Após anestesia, através de hipotermia, a rã foi rapidamente decapitada, sua mandíbula desarticulada e o palato removido através do corte completo da junção da faringe posterior e esôfago até a pele das costas. O palato removido foi então colocado sobre uma gase embebida com uma mistura de ringer e água destilada na proporção de 1:1 (Ringer) e mantidos em um recipiente de vidro, vedado com filme plástico, e então armazenado em refrigerador a 4°C por dois dias. Nestas condições a integridade da atividade ciliar é mantida (Macchione e cols. 1998; Rubin, 1999).

No terceiro dia, uma amostra de muco foi coletada através da extremidade posterior do palato com estilete e imediatamente imerso em óleo mineral para prevenir a desidratação. A coleta do muco foi feita antes da nebulização, garantindo a integridade do muco (muco autólogo). Todos os experimentos foram realizados no terceiro dia após o sacrifício.

O descarte dos animais foi feito em sacos próprios para descarte de materiais contaminados e enviados para depósito apropriado existente no *Campus* da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.2.3 - Transporte mucociliar in vitro

A determinação do transporte mucociliar foi feita através da medida do deslocamento de uma amostra de muco autólogo colocado sobre a superfície epitelial do palato de rã, usando um microscópio estereoscópio equipado com uma ocular reticulada. O transporte mucociliar (TMC) foi calculado através da divisão da distância percorrida pelo muco autólogo

(6mm) pelo tempo de deslocamento. Para cada tempo de exposição analisado foram realizadas cinco medidas do TMC e os resultados apresentados em forma de médias das cinco medidas. As amostras de muco foram lavadas em éter de petróleo, para retirada do óleo mineral, antes de serem colocadas sobre o epitélio do palato de rã. Os experimentos foram realizados em uma sala com temperatura ambiente $\pm 25^{\circ}\text{C}$. Durante as medidas os palatos foram mantidos dentro de uma caixa de acrílico onde um ambiente com 100% de umidade foi mantido através de um nebulizador ultra-sônico com Ringer (Macchione e col, 1998).

Figura 11. Representação esquemática do transporte mucociliar em palato de rã.
 1: lupa estereoscópica com objetiva e ocular reticulada; 2: fonte de luz externa; 3: suporte de vidro para o palato e rã; 4: nebulizador ultra-sônico; 5: câmara de acrílico; 6: palato de rã (modificado de Nakagawa, 1997)

3.2.4 - Frequência de batimento ciliar

Para a mensuração da frequência de batimento ciliar do epitélio de palato de rã, utilizamos um aparelho composto por uma câmera filmadora (Sony- 3CCD - color vídeo câmara), acoplada a um microscópio ótico (Olympus BX 50), sob o qual foi colocado o palato de rã. Um estroboscópio emitindo “flashes” de luz a uma frequência inicial de 30.30 Hertz foi direcionado para a superfície do epitélio. A imagem do epitélio, iluminado pela luz estroboscópica e capturada pela câmera filmadora foi transmitida para um monitor que permite, então, uma perfeita observação do epitélio e do batimento ciliar. Observando o epitélio, diminuíamos a frequência da luz estroboscópica até não conseguirmos ver o movimento dos cílios (o equipamento possui um programa de computador que permite controlar a frequência da luz emitida), significando que o batimento ciliar estava concordância com a frequência da luz emitida pelo estroboscópio. A frequência foi então anotada e o processo repetido por três vezes em áreas diferentes do epitélio.

3.2.5 - Diferença de potencial transepitelial

A Diferença de Potencial Transepitelial (DP) foi medida através da técnica de Knauf et al, modificada em nosso laboratório. Utilizando-se dois microeletrodos flexíveis (pontes de agar) saturados com KCl (Lacaz-Vieira e Procópio, 1988 citados por Macchione et al., 1998) conectados a duas semi-células de calomelano, sendo uma de referência e outra de teste, ambas

ligadas a um voltímetro aterrado de grande “input”. O eletrodo de referência foi colocado na submucosa e o teste, acima da superfície epitelial na intercessão da região cefálica (Macchione et al.,1998).

3.2.6 - Análise morfométrica

A estereologia estuda conceitos que permitem obter informações sobre dimensões das estruturas, baseando-se em medidas bidimensionais, como, pôr exemplo, cortes histológicos (Weibel, 1963 citado por Macchione et al.,1998). A obtenção de dados volumétricos de estruturas com distribuição isotrópica em um meio a partir de seções bidimensionais do mesmo está baseado no teorema de Delesse (Macchione et al.,1998).

Após a última mensuração do TMC, FBC e DP foi coletada uma amostra do epitélio do palato de rã que foi fixada em solução a 4% de formalina tamponada para processamento em rotina histológica. As lâminas foram coradas em solução de ácido periódico e reagente de Schiff e Azul Alciano (PAS/AB). Este corante cora em vermelho o muco neutro (PAS+) e em azul o muco ácido (AB+) (Jones e Reid, 1978 citados por Macchione et al.,1998).

As variáveis, muco ácido (MA) e muco neutro (MN) armazenados no epitélio, células vazias no epitélio (CV), muco fora do epitélio (MF) e espessura do epitélio (EP) foram avaliadas por meio de técnicas estereológicas. Foram lidos dez campos de cada lâmina, em aumento de 1000x em microscópio ótico binocular contendo em uma das oculares um

retículo coerente de pontos e retas, dotado de 50 retas e 100 pontos, correspondente a área de $1000\mu\text{m}^2$.

Os valores de cada uma das variáveis foram correlacionados ao número total de pontos do retículo que incidiram no epitélio (pontos válidos). A partir do total de pontos válidos e do comprimento da membrana basal do epitélio calculamos a espessura do epitélio (EP).

3.2.7 - Desenho experimental

Os 60 (sessenta) palatos de *Rana catesbiana* foram divididos em seis grupos ($n=10/\text{grupo}$) como a seguir:

- 1) Grupos ROFA, controle positivo, sem pre-tratamento, imerso em Ringer, e posteriormente em ROFA;
- 2) Grupo Ringer, controle negativo: imerso em Ringer durante todo o estudo;
- 3) Grupo propyl50, imerso em Ringer com n-Propyl Gallato (3,45-trihydroxybenzoic acid n-propyl ester; Sigma-Aldrich) na concentração de $50\mu\text{M}$ e posteriormente em ROFA
- 4) Grupo propyl300, imerso em Ringer com n-Propyl Gallato (3,45-trihydroxybenzoic acid n-propyl ester; Sigma-Aldrich) na concentração de $300\mu\text{M}$ e posteriormente em ROFA
- 5) Grupo EDTA, imerso em Ringer com EDTA (concentração de $75\text{g}/1000\text{g}$ de peso) e posteriormente em ROFA

6) Grupo vit E, imerso em Ringer com Vitamina “E” (DL-a-tocopherol acetate for oral use, Art. 5008621000, Merck, Darmstadt, Germany, na concentração de 4mg/mL) e posteriormente.

O desenho experimental foi executado como detalhado a seguir:

Todos os palatos foram submetidos à nebulização com Ringer e a seguir foram feitas as medidas basais do TMC, da FBC e da DP. A seguir os palatos dos grupos, EDTA, propil50, propil300 e vit E, foram imersos em solução de Ringer contendo a respectiva substância do pré-tratamento durante 20 minutos, sendo avaliados o TMC, a FBC e a DP, nos intervalos de 10 e 20 minutos. A seguir, os palatos dos grupos propyl50 e propil300, EDTA, vitE e o grupo controle positivo (grupo ROFA), foram imersos em solução de Ringer contendo ROFA à concentração de 1mg/mL, pôr 100 minutos. Foram feitas medidas do TMC, FBC e DP nos intervalos de 30, 60 e 120 minutos. O grupo controle negativo (Ringer) permaneceu imerso em solução de Ringer e também foi submetido às análises do TMC, FBC e DP nos mesmos intervalos de tempo dos demais grupos. Ao final da exposição foi coletada uma amostra do epitélio dos palatos de rãs de todos os grupos para posterior análise morfométrica (AM). Na figura 12 temos a representação esquemática do protocolo experimental.

Figura 12. Esquema de exposição dos palatos de rãs em soluções de material particulado, $PM_{2.5}$ e solução de ROFA.

3.2.8 - Análise estatística

Para a análise estatística dos dados do TMC, FBC e DP foi utilizada a Análise de Variância para Medidas Repetidas (ANOVA) contendo indicadores de categoria para tratamento como também para o tempo e para a interação entre os tratamentos. O teste “Post Hoc” foi também empregado para as comparações múltiplas. Foi estabelecido intervalo de confiança de 95%. A análise estatística dos dados da análise morfométrica foi realizada através da comparação das médias (“One Way ANOVA”) de cada variável. Foi estabelecido intervalo de confiança de 95%. Todas as análises estatísticas foram realizadas através da utilização do programa estatístico SPSS v10.0.

3.3 - Experimento III

Nosso objetivo neste experimento foi comparar os efeitos sobre o aparelho mucociliar do material particulado fino, de diâmetro aerodinâmico equivalente igual e/ou inferior a 2,5 micrômetros ($PM_{2,5}$), coletado na cidade de São Paulo com o “Residual oil fly ash” (ROFA), proveniente de uma usina siderúrgica. Para tanto, avaliamos o transporte mucociliar (TMC), a frequência de batimento ciliar (FBC), a diferença de potencial transepitelial (DP) e as alterações morfológicas do epitélio (AM) em palatos de *Rana catesbiana*.

3.3.1 - Amostragem do Material Particulado fino ($PM_{2,5}$) e do “Residual oil fly ash” (ROFA)

O material particulado fino ($PM_{2,5}$), foi coletado nos dias 17 de junho, 21, 23 e 24 de julho e dia 21 de agosto do ano de 2003 à semelhança da técnica descrita no experimento I (ítem 4.1.1). Resumidamente, o MP foi coletado através de um amostrador de grande volume (AGV), fabricado pela Energética, Brasil, com um fluxo de ar de 1,1 litros pôr metros cúbicos pôr minuto ($1,1L/m^3/min$) durante 24 horas. Ao amostrador está acoplado uma cabeça separadora (Tisch Environmental Ins., USA) que permite a separação de partículas com diâmetro igual e/ou inferior a 2,5 micrômetros ($PM_{2,5}$). O AGV estava localizado no teto do prédio da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, a aproximadamente 15 metros de altura do solo, a qual esta localizada no cruzamento da Avenida Dr. Arnaldo

com a Rua Teodoro Sampaio, no bairro de Cerqueira Cesar, São Paulo, Capital.

As partículas foram coletadas em filtros de fibra de vidro, os quais foram secados pôr 24 horas em estufa a 50°C e pesados em balança antes e após a coleta. Para a extração, os filtros contendo PM_{2,5} foram imersos em Ringer e água destilada na proporção de 1:1 (Ringer) e submetidos a ultrasonicação por 8 horas. Após a extração os filtros foram secos em estufa 50°C pôr 24 horas e novamente pesados. A concentração utilizada foi calculada através da diferença entre a massa inicial, após exposição dos filtros, e a massa final, após a extração.

O “residual oil fly ash” (ROFA) foi coletado de um precipitador eletrostático de uma usina siderúrgica e armazenado sob refrigeração a 4°C.

3.3.2 - Caracterização do material particulado fino ($PM_{2,5}$) e do “Residual oil fly ash” (ROFA) através da espectrometria de fluorescência de raio-X (FRX)

Para a caracterização da composição elementar do $PM_{2,5}$ e do ROFA, foi utilizado um espectrômetro de fluorescência de raio-X (FRX), modelo EDX 700HS, da Shimadzu Corporation, Japão.

Filtros de $PM_{2,5}$: Foram avaliados 10 amostras de material particulado fino, $PM_{2,5}$, coletados em filtros de polycarbonato, expostos no mesmo local dos filtros utilizados no protocolo experimental. A coleta do material particulado destes filtros foi feita através de um amostrado de pequeno volume tipo Harvard, durante 24 horas. Antes da análise os filtros foram condicionados em dessecador. Utilizamos atmosfera a vácuo para aumentar o poder da análise. Os elementos foram avaliados em forma de óxido, uma vez que estes elementos estão adsorvidos ao material particulado nesta forma. A área varrida pelo raio-X foi de 10mm para todas as amostras e foram realizadas 3 varreduras para cada filtro. Os resultados são apresentados em média do percentual de cada elemento em relação a área total varrida para todos os filtros analisados. Não utilizamos o material particulado coletado em filtro fibra de vidro para análise FRX para determinar sua composição pois este filtro apresenta em sua constituição o elemento bário o qual apresenta o mesmo pico de energia que o vanádio, sendo impossível eliminarmos a interferência deste elemento na quantificação do vanádio.

ROFA: Um grama da amostra do ROFA foi compactado para formar uma pastilha a qual foi lida no FRX, com a mesma metodologia utilizada para os filtros de $PM_{2,5}$ com 3 varreduras da área da amostra. Os valores também foram expressos em percentual em relação a área total varrida pelo FRX.

3.3.3 - Desenho experimental

Todos os 40 palatos de *Rana catesbiana* foram submetidos à nebulização com Ringer e a seguir foram feitas as medidas basais do TMC, FBC e do DP. Objetivamente, os palatos foram imersos em solução de Ringer, por 20 minutos e foram realizadas medidas do TMC, FBC e DP nos intervalos de 10 e 20 minutos. A seguir, os palatos dos grupos $PM_{0,1}$ e $PM_{3,0}$ foram imersos em solução de Ringer contendo $PM_{2,5}$ nas concentrações, 0,1 e 3,0 mg/mL (respectivamente), e os palatos do grupo ROFA foram imersos em solução de ROFA na concentração de 1mg/mL, onde permaneceram por 100 minutos. Foram feitas medidas do TMC, FBC e DP nos intervalos de 10, 30 e 60 minutos. Os palatos do grupo controle, Ringer, permaneceram imersos em solução de Ringer, durante os mesmos 100 minutos e também foram submetidos às análises do TMC, FBC e DP nos mesmos intervalos de tempo dos demais grupos. Ao final da exposição foi coletada uma amostra do epitélio dos palatos de rãs de todos os grupos para posterior análise morfométrica (AM). As técnicas de quantificação funcionais de TMC, FBC e DP bem como as medidas morfométricas do sistema mucociliar foram descritas no Materiais e Métodos do experimento II

(Ítem 4.2). A representação esquemática do protocolo experimental é apresentada na figura 13.

Figura 13. Esquema de exposição dos palatos de rãs em soluções de material particulado, $PM_{2,5}$ e solução de ROFA.

3.3.4 - Análise estatística

Para a análise estatística dos dados do TMC, FBC e DP foi utilizada a Análise de Variância para Medidas Repetidas (ANOVA) contendo indicadores de categoria para tratamento como também para o tempo e para a interação entre os tratamentos. Foi também empregado o teste “Post Hoc” para as comparações múltiplas. A análise estatística dos dados da AM foi realizada através da comparação das médias (“One Way ANOVA”) de cada variável. Foi estabelecido intervalo de confiança de 95%. Todas as análises estatísticas foram realizadas através da utilização do programa estatístico SPSS v10.0.

4

RESULTADOS

4 - RESULTADOS

4.1 - Resultados do Experimento I

4.1.1 - Caracterização do material particulado fino (PM_{2,5})

Em desacordo ao que esperávamos, a concentração do PM_{2,5} foi semelhante nos dois períodos analisados, sendo 47,32µg/m³ no dia de greve de ônibus e 43,01µg/m³ tráfego normal de ônibus, com frequência de 943 ônibus por hora circulando na região de coleta do material particulado. A manutenção da massa total de particulados em suspensão na atmosfera em dias de greve, pode ser atribuída ao aumento de veículos leves, movidos predominantemente à gasolina, os quais circularam em maior número por liberação do sistema de rodízio municipal nesse período em detrimento a ausência de tráfego do ônibus movido à diesel.

Os dias de coleta do material particulado, utilizado neste estudo, não apresentaram diferenças climáticas. As médias de temperatura para os dois dias foram semelhantes, 19,43°C e 20,95°C respectivamente 7 e 15 de abril 2003, a média da umidade relativa para os dois dias foram de 72,69% dia 07 e 79,38% dia 15, a média da velocidade dos ventos foram 1,14 e 1,01 m/s, dias 7 e 15 respectivamente, com direção sudeste como média predominante para ambos os dias, e a pressão atmosférica média foi de 694mmHg e 693,5 mmHg dias 07 e 15 de abril, respectivamente.

Apesar da massa total de particulados se manter a mesma nos dois períodos analisados, os resultados da determinação dos elementos traço

quantificados nos filtros, descritos na tabela 03, indicam um decréscimo dos elementos avaliados no filtro coletado durante a greve de ônibus em relação ao do dia de não greve.

A concentração de enxofre foi menor no material coletado em dia de greve de ônibus ($0,629 \pm 0,02 \mu\text{g}/\text{m}^3$ durante o dia de greve vs. $1,424 \pm 0,08 \mu\text{g}/\text{m}^3$ no dia de não greve).

Coerente com os resultados da análise elementar a análise de orgânicos demonstrou uma redução de 39,3% dos compostos avaliados Benzeno, Tolueno, Etil-benzeno e Xileno para o material coletado em dia de greve de ônibus.

Tabela 03. Concentrações de elementos traço no $PM_{2,5}$ coletados em dia de greve e dia de não greve determinadas por ativação com nêutrons

	Greve (DP)	Não Greve (DP)
As, ng m ⁻³	3,44 ± 0,39	12,91 ± 0,53
Br, ng m ⁻³	8,91 ± 0,32	8,88 ± 0,39
Cl, µg m ⁻³	3,01 ± 0,26	8,88 ± 0,39
Co, ng m ⁻³	0,51 ± 0,04	1,14 ± 0,04
Fe, µg m ⁻³	0,78 ± 0,03	1,15 ± 0,03
La, ng m ⁻³	1,02 ± 1,8	27,5 ± 2,2
Sb, ng m ⁻³	3,53 ± 0,06	8,73 ± 0,08
Sc, ng m ⁻³	0,069 ± 0,010	0,141 ± 0,009
Th, ng m ⁻³	0,144 ± 0,053	0,351 ± 0,050

A **tabela 03** apresenta a concentrações de elementos traço no $PM_{2,5}$ coletados nos dias de greve (07.04.2003) e não greve de ônibus (15.04.2003) na Cidade de São Paulo determinados através da análise pôr ativação com nêutrons. Valores expressos em média ± desvio padrão (M±DP).

4.1.2 - Teste de micronúcleo em *Tradescantia pallida*

A tabela 02 e o gráfico 01 apresentam os resultados da avaliação do potencial genotóxico do material particulado coletado em dia de greve de ônibus em São Paulo em comparação ao material particulado coletado em dia de tráfego normal de veículos, avaliado através do teste de micronúcleos em *Tradescantia pallida*.

A análise estatística indica uma redução significativa de micronúcleos no grupo exposto a solução contendo 1mg/mL de PM_{2,5} coletado durante o período de greve de ônibus quando comparado ao grupo exposto a solução contendo 1mg/mL de PM_{2,5} coletado durante o período de não greve de ônibus ($p=0,038$).

Gráfico 01. Teste de micronúcleos *Tradescantia pallida*

Representação gráfica (médias e erros padrão) da percentagem de micronúcleos medidos em tétrades jovens de *Tradescantia pallida* expostas durante 8 horas a diferentes concentrações de extratos de $PM_{2,5}$ (0,1 e 1 mg/L) e os valores obtidos para o controle negativo (água destilada) e positivo (formaldeído 1:5000 v.v em água destilada).

4.1.3 - Teste de inibição de mitoses em *Allium cepa*

O gráfico 02 apresentam os resultados da avaliação do potencial tóxico do material particulado coletado em dia de greve de ônibus em São Paulo em comparação ao material particulado coletado em dia de tráfego normal de veículos, avaliado através do teste de redução de mitoses em células meristemáticas de raiz de *Allium cepa*.

A análise estatística indica tendência á redução de micronúcleos durante a greve apesar de não atingir significância estatística ($p=0,07$).

Gráfico 02. Índice de mitoses em tecido meristemático de raiz de *Allium cepa*

Representação gráfica (médias e erros padrão) do índice de mitoses (%) em tecido meristemático de raiz de *Allium cepa* expostas durante 30 horas a diferentes concentrações de extratos de PM_{2.5} (0.1 and 1 mg/L) e os resultados obtidos para o controle negativo (água destilada) e controle positivo (formaldeído 1:10000 v.v. em água destilada).

Estes resultados demonstraram que a não circulação de ônibus movido à diesel durante a greve diminui a quantidade dos elementos traços, enxofre e orgânicos quantificados no material particulado atmosférico apesar de sua massa se manter semelhante ao período de não greve. A diminuição destes elementos no MP está associada à queda de sua toxicidade sobre a duplicação celular nos bioensaios vegetais testados.

4.2 - Resultados do Experimento II

4.2.1 - Caracterização do “Residual oil fly ash” (ROFA) através da ativação com nêutrons

Os resultados da análise do ROFA com ativação com nêutrons são apresentados na tabela 04. Observamos a predominância de Fe na composição das amostras de ROFA. Este é um resultado esperado já que esta amostra de ROFA teve origem em uma usina siderúrgica tendo sido coletada antes de ser lançada na atmosfera. O que manteve sua composição homogênea.

Tabela 04 : Análise de elementos traço no ROFA

Elemento	ROFA
As	61,0 ± 1,0
Br	1,482 ± 19,0
Ca*	5,42 ± 0,16
Co	9,96 ± 0,25
Cr	107,7 ± 1,4
Cs	9,96 ± 0,25
Fe*	44,6 ± 0,1
Hf	0,62 ± 0,07
Rb	719,7 ± 1,0
Sb	2,27 ± 1,0
Sc	1,91 ± 0,01
Se	154,91 ± 0,8
Th	1,50 ± 0,06
U	2,28 ± 0,14
Zn	491,9 ± 3,1
La	10,3 ± 0,1
Ce	16,3 ± 0,3
Nd	9,3 ± 1,6
Sm	2,30 ± 0,07

Concentração de elementos traço em ROFA proveniente de usina siderúrgica determinados através da análise por ativação com nêutrons realizados no IPEN ($\mu\text{g g}^{-1}$, *Ca, Fe %).

4.2.2 - Transporte mucociliar in vitro

O gráfico 03 mostra os resultados da análise TMC, sendo valores basais (tempo 0), após exposição ao pré-tratamento, tempos 10, 20 minutos e após a exposição ao ROFA do palatos de rã de todos os grupos.

A análise estatística dos dados mostra que a exposição ao ROFA induz decréscimo do TMC, o qual se intensifica com a duração da exposição ($p < 0,001$). O efeitos da duração da exposição exibem uma interação significativa com os tratamentos avaliados ($p = 0,02$). Os efeitos sobre o TMC das substâncias testadas foram diferentes, com significância estatística ($p = 0,002$), sendo os grupos Ringer e Vitamina E diferentes dos demais grupos.

Gráfico 03: Transporte Mucociliar

Representação gráfica da análise do Transporte Mucociliar (TMC) em milímetros por segundo. ROFA representa os valores do TMC obtidos para o grupo exposto ao “Residual oil fly ash”; propil50 os valores obtidos para o grupo exposto ao n-Propyl Galato na concentração de 50 μM ; propil300 os valores obtidos para o grupo exposto ao n-Propyl Galato na concentração de 300 μM ; EDTA os valores obtidos para o grupo exposto ao EDTA e Ringer os valores obtidos para o grupo exposto ao Ringer.

4.2.3 - Frequência de Batimento Ciliar

O gráfico 04 apresenta os resultados da análise da FBC para todos os grupos e tempos de exposição. Tempo 0 apresenta os valores basais, tempos 10 e 20 minutos, os valores durante a imersão nas soluções de pré-tratamento e tempos 30, 60 e 120 minutos representam os valores obtidos durante a exposição ao ROFA.

A exposição ao ROFA induz a um decréscimo na FBC, iniciando após dez minutos de exposição ao ROFA ($p=0,011$). Este decréscimo não foi observado nos grupos com pré-tratamento com n-Propyl Galato 300 μ M, EDTA e Vitamina E como também no grupo controle negativo, grupo Ringer. Sendo os valores obtidos para os grupos propil-50 e ROFA diferentes dos demais grupos ($p<0,001$).

Gráfico 04: Frequência de Batimento Ciliar

Representação gráfica da análise da Frequência de Batimento Ciliar (FBC) em Hertz. ROFA representa os valores do FBC obtidos para o grupo exposto ao “Residual oil fly ash”; propil50 os valores obtidos para o grupo exposto ao n-Propyl Galato na concentração de 50 μ M; propil300 os valores obtidos para o grupo exposto ao n-Propyl Galato na concentração de 300 μ M; EDTA os valores obtidos para o grupo exposto ao EDTA e Ringer os valores obtidos para o grupo exposto ao Ringer.

4.2.4 - Diferença de Potencial Transepitelial

O gráfico 05 apresenta os resultados da análise da Diferença de Potencial Transepitelial para todos os grupos. Os valores expressos são a diferença dos valores da DP dos tempos 10, 20, 30, 60 e 120 em relação aos valores basais, considerados DP absoluta. Os tempos 10 e 20, são os valores da DP durante a imersão nas soluções contendo as substâncias antioxidantes, grupos propil50, propil300, EDTA e vitE, e solução de Ringer, grupos Ringer e ROFA e , tempos 30, 60 e 120, durante a imersão em solução de Ringer contendo material particulado, ROFA para os palatos de rã de todos os grupos, exceto para os palatos do grupo Ringer, que permaneceu imerso em solução de Ringer.

A análise estatística demonstrou não haver diferença significativa entre os grupos e para o tempo de exposição.

Gráfico 05: Diferença de Potencial Transepitelial

Representação gráfica da análise da Diferença de Potencial Transepitelial (DP) em milivolts. Onde ROFA representa os valores da DP obtidos para o grupo exposto ao “Residual oil fly ash”; propil50 os valores obtidos para o grupo exposto ao n-Propyl Galato na concentração de 50 μM ; propil300 os valores obtidos para o grupo exposto ao n-Propyl Galato na concentração de 300 μM ; EDTA os valores obtidos para o grupo exposto ao EDTA e Ringer os valores obtidos para o grupo exposto ao Ringer.

4.2.5 - Análise morfométrica

A análise estatística das médias das variáveis demonstra que:

- Houve redução significativa de muco neutro no epitélio dos palatos com pre-tratamento com n-Propyl galato na concentração de 300 μ M e dos palatos com pre-tratamento com Vitamina E quando comparados ao grupo ROFA, $p=0,048$ e $p<0,001$ respectivamente, sendo que o grupo com pré-tratamento com vitamina E apresentou redução de MA em relação ao grupo Ringer, $p=0,002$ (gráfico **a**, figura 14).

- Houve redução significativa de muco ácido no epitélio dos palatos tratados com n-Propyl Galato na concentração 300 μ M quando comparado ao grupo ROFA, $p=0,001$. Todos os grupos tratados, grupo propil300, EDTA e vitE, apresentaram redução de muco ácido em relação ao grupo controle negativo, Ringer, com $p<0,001$, $p=0,008$ e $p=0,012$ respectivamente (gráfico **b**, figura 14).

- A variável células vazias, CV, não apresentou diferença estatística entre os grupos (gráfico **c**, figura 14)

- O gráfico **d**, figura 14, apresenta os resultados da variável Espessura do Epitélio. Houve redução significativa do epitélio dos palatos dos grupos propil300, $p<0,001$, e no grupo EDTA, $p=0,003$, em relação ao grupo ROFA.

Figura 14. Análise Morfométrica

Representação gráfica dos resultados da análise morfométrica do epitélio dos palatos de rã de todos os grupos estudados. O gráfico **a** apresenta os valores da variável Muco Neutro em relação ao número de pontos; o gráfico **b** apresenta os valores da variável Muco Ácido em relação ao número de pontos; o gráfico **c** apresenta os valores da variável Células Vazias em relação ao número de pontos; gráfico **d** apresenta os valores da variável Espessura do Epitélio em micrômetros.

4.3 - Resultados do Experimento III

4.3.1 - Caracterização do material particulado fino (PM_{2,5}) e do “residual oil fly ash” (ROFA) através da espectrometria de fluorescência de raio-X (FRX)

Os resultados da determinação comparativa da concentração de elementos traço entre ROFA e PM_{2,5} urbano, feitas através da espectrometria de fluorescência de raio-X são apresentados na tabela 05. O ROFA apresenta composição predominante de ferro (57,729%) enquanto a amostra de PM_{2,5} apresenta composição mais heterogênea. Nas amostras dos filtros de PM_{2,5} encontramos contribuição predominante de enxofre (37,594%±17,933), o ferro contribui com 14,490% (±6,489); silício com 13,142% (±8,567). A análise mostrou a presença de níquel (0,336±0,312) e vanádio (0,260±0,062), metais de transição que juntamente com o ferro, são freqüentemente apontados como iniciadores de processo inflamatório pulmonar via estresse oxidativo.

Tabela 05. Espectrometria de Fluorescência de Raio-X de amostras de material particulado 2,5 e ROFA

Elemento	PM _{2,5} (DP)	ROFA (DP)
Na	12,107 ± 11,555	—
Al	0,833 ± 0,675	3,450 ± 0,091
Si	13,142 ± 8,567	4,772 ± 0,065
P	0,005 ± 0,005	—
S	37,594 ± 17,933	6,884 ± 0,046
K	4,213 ± 1,388	6,319 ± 0,042
Ca	12,108 ± 7,827	10,156 ± 0,050
Ti	1,253 ± 0,639	—
Fe	14,490 ± 6,489	57,729 ± 0,094
Cu	0,740 ± 0,319	—
Zn	2,421 ± 1,496	—
Pb	0,492 ± 0,231	—
V	0,260 ± 0,062	—
Ni	0,336 ± 0,312	—
Zn	—	0,078 ± 0,044
Pb	—	1,503 ± 0,017
Cl	—	6,527 ± 0,003
Mg	—	1,457 ± 0,114
Mn	—	0,624 ± 0,012
Br	—	0,306 ± 0,005
Rb	—	0,195 ± 0,004

Valores da análise da Espectrometria de Fluorescência de Raio-X de amostras de material particulado 2,5µm (médias e desvios padrão) de 10 filtros coletados em São Paulo e da amostra do "Residual oil fly ash" (ROFA) proveniente de usina siderúrgica, expressos em percentual.

A análise para determinação de orgânicos, realizada pela cromatografia gasosa/espectrometria de massa (IPEN), demonstrou não haver compostos orgânicos na amostra de ROFA e na amostra PM_{2,5} encontrou-se apenas tri-metil benzeno.

4.3.2 - Transporte Mucociliar in vitro

O gráfico 06 mostra o resultado obtido para o TMC, sendo, valores basais (tempo 0), durante imersão em Ringer, tempos 10 e 20 e durante a imersão em material particulado, ROFA e PM_{2,5}, dos palatos de rã de todos os grupos.

A exposição ao ROFA e ao PM_{2,5}, na concentração de 3,0 mg/mL induz ao decréscimo do TMC, $p < 0,001$, quando comparado aos grupos Ringer e PM_{2,5} na concentração de 0,1 mg/mL.

Gráfico 06. Velocidade de Transporte Mucociliar

Representação gráfica dos valores da velocidade de transporte mucociliar (TMC). ROFA representa os valores do TMC obtidos para o grupo exposto ao “Residual oil fly ash”; PM0,1, grupo de palatos expostos ao material particulado PM 2,5 na concentração de 0,1 mg/mL; PM3,0 grupo de palatos expostos ao material particulado PM 2,5 na concentração de 3,0 mg/mL e Ringer, grupo controle, os valores obtidos para o grupo exposto ao Ringer.

4.3.3 - Frequência de Batimento Ciliar

O gráfico 07 apresenta os resultados da análise da FBC para todos os grupos e tempos de exposição. Tempo 0 apresenta os valores basais, os tempos 10 e 20, são os valores da FBC durante a imersão em solução de Ringer e, tempos 30, 60 e 120, durante a imersão em solução de Ringer contendo material particulado, ROFA ou $PM_{2,5}$ para os palatos de rã de todos os grupos.

A exposição ao ROFA induz a decréscimo na FBC, iniciando após dez minutos de exposição ($p=0,011$). O decréscimo na FBC não foi observado nos grupos expostos as duas concentrações de PM (0,1 e 3 mg/mL) como também no grupo controle negativo, grupo Ringer. Sendo os valores obtidos para os grupos ROFA diferentes dos grupos Ringer ($p=0,028$) e $PM_{0,1}$ ($p=0,005$).

Gráfico 07. Freqüência de Batimento Ciliar

Representação gráfica da Freqüência de Batimento Ciliar. ROFA representa o grupo exposto ao “Residual oil fly ash”; PM0,1, grupo de palatos expostos ao material particulado $PM_{2,5}$ na concentração de 0,1 miligrama por mililitros; PM3,0 grupo de palatos expostos ao material particulado $PM_{2,5}$ na concentração de 3,0 miligrama por mililitros e Ringer, grupo controle, os valores obtidos para o grupo exposto ao Ringer.

4.2.4 - Diferença de Potencial Transepitelial

O gráfico 08 apresenta os resultados da análise da Diferença de Potencial Transepitelial para todos os grupos. Os valores expressos são a diferença dos valores da DP dos tempos 10, 20, 30, 60 e 120 em relação aos valores basais, DP absoluta. Os tempos 10 e 20, são os valores da DP durante a imersão em solução de Ringer e, tempos 30, 60 e 120, durante a imersão em solução de Ringer contendo material particulado, ROFA e PM_{2,5} para os palatos de rã de todos os grupos.

A análise estatística demonstra que apenas a exposição ao PM_{2,5} na concentração de 0,1mg/mL levou ao aumento da Diferença de Potencial Transepitelial, sendo PM_{0,1} diferente do ROFA ($p=0,034$) e diferente de Ringer ($p=0,009$).

Gráfico 08: Diferença de Potencial Transepitelial

Representação gráfica da Diferença de Potencial Transepitelial ROFA representa os valores do DP obtidos para o grupo exposto ao “Residual oil fly ash”; PM0,1, grupo de palatos expostos ao material particulado $PM_{2,5}$ na concentração de 0,1 miligrama por mililitros; PM3,0 grupo de palatos expostos ao material particulado $PM_{2,5}$ na concentração de 3,0 miligramas por mililitros e Ringer, grupo controle, os valores obtidos para o grupo exposto ao Ringer.

4.2.5 - Análise Morfométrica

A análise estatística das médias das variáveis demonstrou que:

- Houve redução significativa de muco neutro no epitélio dos palatos imersos na maior concentração de $PM_{2,5}$, grupo PM3 quando comparados aos grupos ROFA e Ringer, $p=0,003$ e $p=0,017$, respectivamente, gráfico **a** da figura 15.

- Os resultados mostram redução significativa de muco ácido no epitélio dos palatos do grupo PM0,1 quando comparados ao grupo ROFA, $p=0,004$, gráfico **b** da figura 15.

- Os resultados da variável CV, células vazias dentro do epitélio, demonstram redução nos palatos dos grupos PM, nas duas concentrações, 0,1 e 3,0 mg/mL, com $p<0,05$, quando comparados aos grupos ROFA e Ringer, gráfico **c** da figura 15.

- A variável Espessura do Epitélio, gráfico **d** da figura 15, mostra redução significativa na espessura do epitélio dos palatos do grupo PM3,0 quando comparados aos do grupo ROFA, $p=0,001$.

Figura 15: Análise Morfométrica

A figura apresenta gráficos dos resultados da análise morfométrica do epitélio dos palatos de rã de todos os grupos estudados. O gráfico **a** apresenta os valores da variável Muco Neutro; o gráfico **b** apresenta os valores da variável Muco Ácido; o gráfico **c** apresenta os valores da variável Células Vazias; e o gráfico **d** apresenta os valores da variável Espessura do Epitélio.

5

DISCUSSÃO

5 - DISCUSSÃO

Na cidade de São Paulo a maioria do transporte público é realizado por aproximadamente 17.000 ônibus operando com diesel. A frota diesel de nossa cidade é responsável pela produção de mais de 28% das partículas primárias e por 25% de aerossóis secundários, com diâmetro aerodinâmico inferior a 10 μ m, lançados na atmosfera (CETESB, 2005). A idade e a tecnologia dos motores a diesel da frota que trafega em nossa cidade é muito variável e as emissões geradas por elas não estão sujeitas a controle efetivo. Este cenário, de uma grande frota de veículos operando a diesel sem um efetivo controle de suas emissões, é comum na maioria dos grandes centros urbanos de países em desenvolvimento que apresentam crescimento desordenado. Os setores governamentais desses países encontram-se frente a um dilema: quanto poderia ser investido para o controle da poluição do ar quando outros grandes problemas sociais e econômicos devem também ter investimentos?

Em 2003 uma greve paralisou o tráfego de ônibus na cidade de São Paulo por três dias, do dia 06 ao dia 08 de abril. Coincidentemente o Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental estava, rotineiramente, coletando material particulado fino, PM_{2,5}, no 5º andar da Faculdade de Medicina, no cruzamento de duas grandes vias de tráfego, a Rua Teodoro Sampaio e a Av. Dr. Arnaldo. Tínhamos, portanto, a oportunidade de testar a toxicidade do material particulado lançado na atmosfera da cidade sem os componentes advindos da queima do diesel. Decidimos, então, avaliar os

efeitos da ausência desta fonte emissora de poluição, ônibus movidos a diesel, sobre a composição, mutagenicidade e toxicidade do $PM_{2,5}$ coletado neste dia. Nossa hipótese era que as informações resultantes deste "experimento natural" poderiam ser usadas para avaliar o impacto da emissão de veículos movidos a diesel na atmosfera urbana, dando evidências dos possíveis benefícios do controle destas emissões para a qualidade do ar de nossa cidade.

Com o crescente interesse sobre o impacto das partículas ambientais sobre a saúde humana, maior atenção tem sido direcionada para a contribuição da emissão gerada pelos motores à diesel, especialmente em centros urbanos onde eles contribuem significativamente para a deterioração da qualidade do ar. Os motores a diesel geram até 100 vezes mais partículas do que os motores a gasolina e aproximadamente 80% das partículas desta emissão possuem diâmetro aerodinâmico menor que $0,1\mu m$, sendo rapidamente inaladas. Estima-se que aproximadamente 10% do total de partículas inaláveis ($<10\mu m$) são depositadas na região alveolar dos pulmões (Mudway et al., 2004).

Apesar da pequena quantidade de material disponível, decidimos avaliar as alterações tanto na composição do $PM_{2,5}$ coletado quanto nos efeitos biológicos. Nós acreditamos que as informações resultantes destas avaliações são complementares e nos permitiriam compreender melhor o evento.

Nosso estudo demonstrou que a paralisação da frota de ônibus não alterou a massa de MP emitida. Em contrapartida, apesar da mesma massa, a composição do $PM_{2,5}$ mostrou ser totalmente diferente no período de greve como indicado pela redução na concentração de vários elementos traços, de enxofre e de BTEX. Os efeitos deletérios promovidos pelos poluentes na duplicação celular vegetal também se mostraram diferentes nos grupos experimentais deste protocolo. Quando extratos aquosos dos filtros coletados durante a greve foram usados nos ensaios para avaliar o efeito mutagênico e tóxico, observamos redução na demanda de DNA sem alteração estatística significativa na toxicidade. Analogamente, este resultado positivo em mutagênese, encontrado neste bioensaio, está coerente com estudos prévios que demonstram o potencial mutagênico do material particulado urbano em bactérias e células de mamíferos (Athanasiou et al., 1986; Krishna et al., 1984; Whong et al., 1984).

A observação de que, o potencial mutagênico das partículas ambientais decrescem na ausência da emissão gerada pelos ônibus em consequência da alteração na composição dos poluentes inaláveis em suspensão, indica que um programa visando a redução da emissão da frota de ônibus em nossa cidade poderia ter um impacto positivo na qualidade do ar.

Os resultados obtidos são muito importantes e de impacto imediato no ecossistema, apontando para condutas exeqüíveis da administração pública no sentido de minimizar os efeitos deletérios da exposição a derivados de diesel. Porém, antes de aprofundarmos na discussão de nossos resultados,

é importante ressaltar algumas limitações secundárias ao modelo experimental utilizado. Primeiro, nós utilizamos material particulado coletado durante um evento sobre o qual não tínhamos controle, a paralisação da frota de ônibus da cidade durante uma greve. Isto, além de não nos permitir controle sobre o protocolo de exposição, tornou impossível a reprodução do evento baseada em protocolos experimentais. Segundo, a coleta do material particulado foi realizada apenas em um local da cidade de São Paulo, e nós não podemos ter certeza se as alterações observadas nas amostras das partículas coletadas por nós são representativas para todas as regiões da cidade. Finalmente, a pequena quantidade de material particulado coletado durante o período de greve inviabilizou realizarmos várias séries de ensaios toxicológicos. O quanto as partículas, coletadas por nós na Faculdade de Medicina, traduzem o efeito da ausência de ônibus sobre a qualidade do ar de outras regiões da cidade não foi possível ser definido uma vez que não havia medidas gravimétricas de $PM_{2,5}$ na cidade, portanto não tínhamos filtros representativos das demais regiões para reprodução dos ensaios toxicológicos. Além disso, o tempo de paralisação dos ônibus não foi longo o suficiente para repetirmos as medidas da composição e de toxicidade do $PM_{2,5}$ coletado durante a greve.

As alterações na composição das partículas coletadas no dia de greve foram constatadas quando comparadas à partículas coletadas em dia com condições meteorológicas e concentração de massa semelhantes. Nossos resultados indicam que para a mesma massa de $PM_{2,5}$ as alterações na composição das partículas levaram a uma redução de seu efeito. Este é um

importante tópico e nós acreditamos que nossos resultados reforçam o conceito de que é necessário um maior conhecimento das características físicas e químicas das partículas quando visamos o controle de seus efeitos sobre a saúde e o controle público das emissões e não só a quantificação da massa do MP em suspensão na atmosfera.

As bases biológicas dos efeitos lesivos ao sistema biológico ainda não estão bem estabelecidas, mas, encontramos hoje, grande esforço em pesquisas com o intuito de se definir os mecanismos de ação e identificar os componentes e características do material particulado que medulam estes efeitos. O tamanho da partícula, tanto em relação à sua superfície quanto a capacidade de penetrar nas vias aéreas, a composição das partículas, incluindo acidez e os metais de transição adsorvidos à elas, o conteúdo de hidrocarbonos além da bio disponibilização deste tóxico, são todos fatores considerados críticos para determinar a toxicidade das partículas *in vivo* (Mudway et al., 2004). Se avaliássemos nosso estudo somente da perspectiva da concentração de massa poderíamos concluir erroneamente que o controle das emissões dos ônibus não teria efeito sobre a qualidade do ar.

Os níveis de $PM_{2,5}$ no dia de greve foram altos, aproximadamente $40\mu g/m^3$. Esta concentração de particulado pode ser explicada pelo intenso tráfego de “vans”, que substituíram os ônibus no transporte público. Somado ao aumento do tráfego das “vans”, o rodízio municipal foi suspenso na tentativa de minimizar o efeito da paralisação dos ônibus, o que permitiu a circulação de aproximadamente 20% a mais de veículos leves na cidade.

De fato, estudamos um evento que parou o tráfego de veículos pesados movidos a diesel mas que aumentou o tráfego de veículos leves, movidos a gasolina, etanol e diesel de melhor qualidade.

Como a quantidade de material particulado coletado no dia de greve de ônibus era muito pequena, apenas um filtro, quantidade insuficiente para que pudéssemos fazer vários ensaios toxicológicos, optamos por utilizar dois bioensaios vegetais para avaliar a mutagenicidade e toxicidade das partículas de PM_{2,5}. Estes testes possuem alta sensibilidade e são indicados para avaliar um grande número de indivíduos usando pequenos volumes de amostra a ser testada. Os bioensaios vegetais são ideais para realizar estudos de mutagênese em um curto intervalo de tempo, tanto em testes em laboratórios quanto em “*in situ*”, em estudos de biomonitoramento (Batalha et al., 1999; Ferreira et al., 2000; Guimarães et al., 2000; Ichikawa, 1981; Ma, 1979, 1981; Rodrigues et al., 1997; Watts et al., 1989).

Dentre os testes de mutagênese em plantas, o TRAD-MN é considerado o mais sensível (Ma, 1981; Watts et al., 1989). Este teste é baseado na visualização de segmentos de cromossomos como pequenas estruturas esféricas pretas (micronúcleo) em tétrades jovens em células do grão de pólen. O micronúcleo representa a consequência de defeitos que ocorreram durante a replicação meiótica dos cromossomas das células de grão de pólen. Após exposição a agentes mutagênicos, a frequência na formação de micronúcleos aumenta, demonstrando o grau de demanda cromossomal durante a meiose. Nosso teste com a *Tradescantia* respondeu muito bem, expressando valores basais similares para a frequência de

micronúcleos em duas diferentes ocasiões, respondeu a solução controle positivo, expressando aumento nos valores de micronúcleo para doses muito baixas de formaldeído (gráfico 01) e exibiu aumento na frequência de micronúcleos dose dependente quando expostas ao $PM_{2,5}$ coletado no dia em que não havia greve dos ônibus.

Consideramos a inibição de mitoses em raiz de *A. cepa* um bom parâmetro para estimar a toxicidade celular. A mitose é uma fase de grande sensibilidade ao ambiente externo e, secundária a esse fato, a divisão celular é suspensa quando submetida à substâncias tóxicas. O estudo da divisão celular em células meristemáticas da raiz de *A. cepa* é considerado um indicador sensível de toxicidade (Cotelle et al., 1999). De fato, nossos testes exibiram uma marcada redução do índice de mitose para concentrações muito baixas de formaldeído, nosso controle positivo, e apresentou tendência a redução dose dependente a concentrações crescentes do extrato de $PM_{2,5}$ (gráfico 02).

Baseado em nossos resultados, a paralisação do tráfego de ônibus não influenciou a toxicidade do $PM_{2,5}$, mostrou apenas um efeito marginal (gráfico 02), porém, mostrou mudança no potencial mutagênico (gráfico 01). Neste estudo, nosso objetivo não foi o de explorar a capacidade das partículas urbanas de conter substâncias que causem demanda de DNA, já que esta observação não é nova (Hamada et al., 1983; McClellan, 1986; Sato, et al., 2000). Nós testamos a hipótese de que, uma única fonte emissora influencia o potencial mutagênico das partículas de poluição, em condições reais.

Não objetivamos demonstrar que as partículas resultantes da combustão do óleo diesel contêm substâncias mutagênicas, mas determinar, em condições reais, o quanto a ausência de uma única fonte emissora pode mudar o seu potencial mutagênico.

Há atualmente várias opções tecnológicas que poderiam reduzir dramaticamente a emissão de partículas pelos motores de veículos pesados. Uma das propostas para este fim é o uso de outros combustíveis como o etanol ou o biodiesel, ou mesmo, um óleo diesel com melhor qualidade que, somadas a um efetivo controle da manutenção dos motores, poderiam reduzir em até 200 vezes a emissão de partículas (McClellan, 1986). Como as medidas acima mencionadas são de alto custo financeiro, a aplicabilidade destas propostas torna-se menos exequível perante outras prioridades vigentes nos países em desenvolvimento, tornando pouco atraente aos setores sanitários e governamentais a opção de assumir o preço que determina o benefício do avanço em estratégias para eliminar as emissões do diesel. Nós acreditamos que nosso estudo fornece um argumento sólido em favor da adoção de políticas para o controle das emissões dos ônibus movidos a diesel. Em uma região onde milhões de veículos lançam dezenas de toneladas ao ano de particulados na atmosfera, o controle de poucas centenas de veículos parece-nos ser um procedimento eficiente cujo custo benefício é justificado em um cenário com recursos limitados para investir no controle da qualidade do ar.

A contribuição da poluição do ar para o agravamento de doenças respiratórias é evidenciada tanto por estudos epidemiológicos (Abbey et al.,

1995; Poppe et al., 2002) quanto por estudos experimentais (Cendon et al., 1997; Lemos et al., 1994; Reymão et al., 1997, Saldiva et al., 1992). Vários estudos apontam o material particulado como um dos grandes contribuintes para o agravamento das doenças respiratórias devido a grande quantidade e variedade de elementos e substâncias tóxicas adsorvidos a sua superfície (Pope et al., 1991). Há hoje fortes evidências mostrando que o estresse oxidativo mediado por metais é o maior contribuinte para os efeitos tóxicos das partículas da poluição do ar sobre o aparelho respiratório (Kelly, 2003). Estudos experimentais demonstram que a exposição ao ROFA é altamente tóxica para os pulmões (Dreher et al., 1997) e que extratos de ROFA são capazes de induzir o estresse oxidativo e inflamação no tecido pulmonar (Costa e Dreher, 1997; Kadiiska et al., 1997).

Em estudos prévios, demonstramos que o palato de rã é afetado através de níveis de oxidantes deflagrados em meio inflamatório (Macchione et al., 1998). Na presença de partículas ambientais nós observamos evidências do prejuízo da função mucociliar, como também a depleção de defesas antioxidantes, sugerindo que o estresse oxidativo participa da disfunção mucociliar. Nós concluímos que se a demanda oxidativa foi o principal responsável pela disfunção mucociliar observada em nossos estudos prévios, esta disfunção deveria ser eliminada ou diminuída quando substâncias antioxidantes são introduzidas no modelo. Já na década de 80, estudos observacionais retrospectivos demonstraram uma correlação negativa entre o consumo de alimentos ricos em substâncias antioxidantes e a função pulmonar (Tockman et al., 1986; Morabia et al., 1989; Schawarts

& Weiss, 1990; Strachan et al., 1991; Miedema et al., 1993; Grievink et al., 1998). Em adição a estes estudos epidemiológicos, análises transversais mostraram correlação positiva entre a concentração de antioxidantes provenientes da dieta alimentar no sangue com o agravamento de sintomas de doenças como, fibrose cística, bronquite e doenças obstrutivas crônicas (Bye et al., 1985; Taylor et al., 1986; Homnick et al., 1993; Brown e Kelly , 1994; Schawarts & Weiss, 1994; Winklhofer-Roob et al., 1995; Brown et al., 1996; Ness, et al., 1996; Lepage et al., 1996; Mudway et al., 2000; Wood et al., 2002). O efeito protetor de substâncias antioxidantes frente à exposição a poluentes ficou evidenciada em estudos que mostraram que o aumento no consumo de nutrientes ricos em substâncias antioxidantes (Romieu et al., 1998; Grievink et al., 1999) ou a suplementação alimentar com vitaminas (Chatham et al., 1987) reduz a magnitude do decréscimo da função pulmonar em indivíduos expostos ao ozônio.

Nossos dados apresentaram que ambos o TMC (gráfico 03) e FBC (gráfico 04) foram prejudicados após uma curta exposição ao ROFA. Semelhante resultado foi observado em nosso laboratório em um estudo com o mesmo modelo, palatos de rãs, exposto ao peróxido de hidrogênio e ao material particulado 10 μ m, coletado na cidade de São Paulo (Macchione et al., 1998; 1999). A capacidade do ROFA em causar dano ao pulmão é demonstrada em vários outros modelos animais (Pritchard cols, 1996; Norwood et al., 2001; Guio et al., 2002 a, b). Por ser rico em metais, com baixa concentração de componentes orgânicos, o ROFA tem sido muito utilizado para testar a hipótese de serem os metais de transição os

mediadores dos efeitos das partículas da poluição do ar no meio biológico (Guio et al., 2002 a,b).

Para testarmos nossa hipótese, usamos três diferentes substâncias antioxidantes, a vitamina E, o n-Propil galato e o EDTA. Nossos resultados mostraram que a vitamina E, e também a maior concentração de n-Propil galato foram capazes de proteger o aparelho mucociliar do prejuízo funcional causado pelo ROFA (gráficos 03 e 04). Estes achados apoiam o conceito de que o mecanismo envolvido no prejuízo ao aparelho mucociliar é, em parte, promovido pelo estresse oxidativo.

A habilidade dos metais de transição adsorvidos ao MP fino em causar resposta inflamatória é bem demonstrada tanto em estudos *in vitro* quanto em estudos *in vivo* (Abbas et al., 1994; Carter et al., 1997; Jimenex et al., 2000; Kennedy et al., 1998; Li et al., 1997; citado por Carnelley & Le, 2001).

Os oxidantes poderiam também interferir com a função ciliar através de outros mecanismos como a formação intracelular de grupos sulfidril; depressão do ATP intracelular; diminuição da NAD (nicotinamida adenina dinucleotídeo); aumento do cálcio livre intracelular; e depressão do fluxo glicolítico; alterações no citoesqueleto e na membrana plasmática. Todos estes eventos poderiam prejudicar o batimento ciliar, mesmo antes de um prejuízo pequeno da integridade da membrana plasmática (Macchione et al., 1998). Neste estudo a exposição ao ROFA foi capaz de reduzir o TMC (gráfico 03) e a FBC (gráfico 04) mas os resultados da análise da DP (gráfico 05) não mostraram alteração no transporte iônico transmembrana. Este fato

nos leva a supor que os efeitos lesivos da exposição ao ROFA não foram suficientes para alterar a integridade da membrana das células epiteliais, porém foram capazes de alterar sua função. Propomos que os mecanismos de ação para essas alterações sejam diferentes ou que a metodologia utilizada não foi sensível o suficiente para demonstrar alterações ocorridas ao nível das membranas celulares.

Em nosso estudo, a exposição ao ROFA não alterou morfológicamente o epitélio dos palatos de rã como demonstram os resultados da análise morfométrica (gráficos *a*, *b*, *c* e *d* da figura 14), apesar desta exposição ter levado a disfunção mucociliar (gráficos 03 e 04). Entretanto, os palatos dos grupos tratados com as substâncias antioxidantes demonstraram redução significativa na quantidade de muco (ácido e neutro) e, coerentemente, uma menor espessura do epitélio (gráficos *a*, *b*, *c* e *d* da figura 14). A metodologia utilizada neste estudo não nos permite responder qual o mecanismo fisiológico envolvido na resposta protetora dos antioxidantes. Entretanto, nossos resultados sugerem que, a exposição a substâncias antioxidantes levou a maior liberação de muco das células mucosas para a superfície epitelial o que protegeu o epitélio do prejuízo ao TMC (gráfico 03) e a FBC (gráfico 04) frente a agressão gerada pelo poluente.

Ao chegar às vias aéreas os poluentes, gases e partículas, não entram em contato direto com células do epitélio mas, sim com o fluido que recobre a superfície do epitélio respiratório. Acredita-se que as respostas observadas após a exposição a poluentes do ambiente sejam mediadas

por reações de oxidação ocorridas dentro da interface ar-fluido (Pryor, 1994). As partículas de poluição, diferentemente de gases como o ozônio, são capazes de atravessar a camada de muco e, é provável que, esta travessia altere as características da superfície das partículas em consequência de reações com os componentes de muco, como substâncias com capacidade de neutralizar o efeito oxidativo destas partículas (Kelly, 2003).

Apesar dos resultados obtidos neste estudo agudo estarem em acordo com vários outros estudos apresentando o estresse oxidativo como um importante mecanismo na lesão do epitélio das vias aéreas (Costa e Dreher, 1997; Kadiiska et al., 1997; Li et al., 1996; Macchione et al., 1999), a extrapolação destes dados experimentais para as condições ambientais é difícil. Primeiro, o ROFA, utilizado em nosso estudo, por ter sido coletado antes de ser lançado para atmosfera é um particulado que não é integralmente representativo do encontrado disperso na atmosfera ambiente. Segundo, a dose das partículas inaláveis após diluição no microambiente do epitélio respiratório *in vivo* não corresponde a que utilizamos em nossa investigação. Finalmente, este estudo não nos permite avaliar a interação de todos os sistemas envolvidos nos mecanismos de lesão e de defesa dos sistemas biológicos quando expostos as partículas de poluentes.

Apesar das limitações do nosso estudo, a demonstração de que substâncias antioxidantes inibem os efeitos agudos do ROFA sobre o sistema mucociliar, reforçam o conceito de que substâncias oxidantes,

como os metais de transição, têm um papel importante nos efeitos lesivos ao sistema respiratório induzidos por partículas emitidas pela queima de óleo combustível.

Durante a última década o consenso sobre os efeitos do material particulado disperso na atmosfera sobre a saúde humana aumentou dramaticamente. Fortes evidências epidemiológicas emergiram demonstrando a associação entre a concentração em massa do material particulado ambiental e o aumento da morbidade e mortalidade. Entretanto, como as bases biológicas desses efeitos ainda não estão bem definidas, um crescente esforço de pesquisa esta sendo direcionado no sentido de esclarecer os mecanismos de ação e para identificar quais as características e componentes do material particulado que modulam seus efeitos tóxicos (Mudway, 2004).

Nós demonstramos no estudo anterior que a exposição aguda de palatos de rã ao ROFA levou ao prejuízo do aparelho mucociliar e que este prejuízo foi eliminado quando substâncias antioxidantes, como a vitamina E e o n-Propil galato, foram utilizados como pre-tratamento sugerindo que o mecanismo de lesão ao epitélio ciliado do palato de rã é em parte promovido pelo estresse oxidativo mediado por metais de transição adsorvidos às partículas. Como o ROFA utilizado é um material particulado de fonte fixa, coletado em um precipitador eletrostático, antes de ser lançado para a atmosfera, questionamos o quanto as partículas ambientais, de fonte automotiva, dispersas na atmosfera, seriam capazes de induzir o prejuízo ao aparelho mucociliar. Neste terceiro experimento utilizamos o mesmo

modelo experimental, palatos de rã, para avaliarmos o efeito lesivo de amostras de material particulado fino, $PM_{2,5}$, coletado na cidade de São Paulo, comparado ao ROFA originário de fonte fixa.

Nossos resultados apresentaram que a exposição ao $PM_{2,5}$, de origem de fonte móvel, coletado em São Paulo, como o ROFA, material particulado de origem de fonte fixa, levou ao prejuízo do aparelho mucociliar (gráfico 06).

O prejuízo ao TMC provocado pela exposição aos particulados, ROFA e a maior concentração de $PM_{2,5}$ (gráfico 06), estão de acordo com fortes evidências da literatura sobre os efeitos lesivos da inalação de poluentes do ar de origem de fonte fixa e automotiva. Grande número de trabalhos demonstram o decréscimo da função pulmonar, aumento de sintomas respiratório, aumento da morbidade e mortalidade em populações suscetíveis quando expostas aos poluentes do ar (Dockery e Pope, 1994; Pope et al., 1995; Schwartz, 1994). Estes efeitos também são demonstrados em estudos *in vitro*, em culturas de células de epitélio respiratório (Becker et al., 1996; Carter et al., 1997) como também em estudos *in vivo* (Li et al., 1997; Shukla et al., 2000).

Nós demonstramos que a exposição ao ROFA levou ao prejuízo da FBC e que esta não foi alterada frente a exposição as duas concentrações de $PM_{2,5}$ (gráfico 07). As duas concentrações de $PM_{2,5}$, modularam a secreção de muco, enquanto os palatos do grupo exposto ao ROFA manteve-se como o grupo controle negativo (figura 15, gráficos *a*, *b*, *c* e *d*).

Em nosso estudo, a exposição ao ROFA alterou a frequência de batimento ciliar o que refletiu na velocidade de transporte do muco, mas não alterou a quantidade de muco no epitélio. Por outro lado, os palatos expostos ao $PM_{2,5}$ demonstraram prejuízo do transporte do muco mas não apresentaram redução no FBC. Encontramos no epitélio dos palatos expostos ao $PM_{2,5}$ redução na quantidade de muco e redução na espessura do epitélio. Estes dados sugerem que o prejuízo ao aparelho mucociliar frente a exposição a estes diferentes particulados é mediado por mecanismos de ação diferentes.

Os resultados da análise da diferença de potencial (gráfico 08) mostram alteração da diferença de potencial transepitelial apenas para os palatos do grupo expostos a menor concentração de $PM_{2,5}$ ($PM_{0,1}$). Para tentarmos entender este resultado precisamos olhar atentamente os resultados das outras variáveis. Os dois grupos de palatos expostos ao $PM_{2,5}$ apresentaram redução no conteúdo de muco e apenas os palatos do grupo PM_3 apresentaram redução do epitélio e prejuízo do TMC. Apesar das alterações no conteúdo iônico da superfície epitelial e de espessura do epitélio dos palatos de rã a exposição a menor concentração de $PM_{2,5}$ não levou a alterações funcionais. A eficiência do transporte mucociliar é dependente da atividade ciliar e da viscoelasticidade do muco. O transporte iônico através do epitélio das vias aéreas possui um papel importante na regulação do volume e composição do muco respiratório. Welsh et al., 1983, demonstraram que a exposição à fumaça de cigarro inibiu a atividade de transporte iônico em epitélio de traquéias de cachorros e que este efeito não

é suprimido com a adição de substâncias antioxidantes. Estes autores sugerem que a fumaça de cigarro altera a permeabilidade da membrana apical do epitélio das vias aéreas. Mas, em nosso estudo a alteração da diferença de potencial foi percebida somente na exposição a menor concentração de $PM_{2,5}$ não nos permitindo afirmar que o MP altere o conteúdo iônico da superfície epitelial de palatos de rã. Sugerimos com estes resultados que talvez a metodologia utilizada para determinação desta variável não tenha sido sensível o suficiente para demonstrar alterações ocorridas ao nível das membranas celulares.

Estes resultados, aparentemente controversos, refletem diferentes respostas para a heterogeneidade dos poluentes. Nos demonstramos anteriormente que os efeitos lesivos do material particulado não são dependentes somente do tamanho das partículas mas também de sua composição. A diferença na composição do $PM_{2,5}$ coletado em dia de greve de ônibus foi determinante na redução dos efeitos na demanda de DNA.

A análise de FRX demonstrou diferença na composição do ROFA e do $PM_{2,5}$ utilizados neste estudo. O ROFA, contém composição predominante de ferro enquanto o $PM_{2,5}$ possui composição mais variada, com maior concentração de enxofre e menos ferro que a amostra de ROFA. O vanádio, presente na amostra de $PM_{2,5}$ apesar de em pequena quantidade, não foi encontrado na amostra de ROFA.

As substâncias adsorvidas ao material particulado que mais frequentemente são associadas aos efeitos à saúde (compostos orgânicos,

metais de transição; sulfatos e nitratos) são encontrados predominantemente na fração fina das partículas ambientais (CEPA/FPAC Working Group, 1999 citado por Carnelly & Le, 2001). Devido ao seu pequeno tamanho, o material particulado fino apresenta maior área de superfície o que aumenta a quantidade de elementos e compostos químicos a ele adsorvidos. Vários fatores determinam a natureza dos compostos adsorvidos ao particulado fino. A fonte emissora, condições climáticas e tempo de permanência na atmosfera em que são lançados são fatores determinantes na composição final das partículas (Salvi & Holgate, 1999).

São Paulo é a maior cidade da América do Sul, com mais de 15 milhões de habitantes e com mais de milhões de veículos automotores. Sua altitude e clima tornam difícil a dispersão do ar, assemelhando-a a uma câmara de intoxicação. Como consequência, as amostras de $PM_{2,5}$ obtidas em nosso trabalho refletem a poluição predominante de fonte automotiva. Apesar de, em São Paulo, a poluição do ar só ocasionalmente ultrapassar os padrões de qualidade do ar, vários autores demonstram os efeitos desta atmosfera sobre a saúde (Saldiva, 1992).

O ROFA, utilizado em nosso estudo, por ter sido coletado em um precipitador eletrostático de uma usina siderúrgica, antes de ser lançada para atmosfera, possui composição conhecida e constante. As partículas ambientais, como o $PM_{2,5}$ utilizado neste estudo, representam não somente os poluentes emitidos pelos veículos mas também o produto de reações secundárias, múltiplas e não controladas, ocorridas com elementos que estão dispersos na atmosfera, o que altera sua toxicidade. Alguns destes

componentes são os hidrocarbonetos policíclicoaromáticos, (HPAs), como o trimetil benzeno encontrado nas amostras de $PM_{2,5}$ utilizadas em nosso experimento.

Apesar de existir consenso na literatura referente à capacidade dos metais de transição adsorvidos ao material particulado de causarem danos ao trato respiratório, ainda não existe concordância em qual destes elementos é o mais prejudicial. Logphre et al., 2000, atribuíram ao vanádio a capacidade de modular a expressão do gene mucin em células epiteliais expostas ao ROFA e não ao níquel ou ao ferro. Kennedy et al., 1998, apontam a fração solúvel do cobre e não ao ferro, chumbo e níquel a capacidade em ativar marcadores inflamatórios o que havia sido atribuído ao vanádio por Carter et al. (1997). Dreher et al. (1997) e Kodavanti et al. (1998) demonstraram ser a fração solúvel do níquel a responsável por causar a maioria da lesão pulmonar. Salnikow et al., 2004, investigaram os efeitos do ferro e do níquel em culturas de células do pulmão humano em induzir lesão celular por estresse semelhante à hipóxia e produção de citocinas e concluíram que o pre-tratamento com ferro protege parcialmente as células do efeito do níquel. Ghio e Cohen, 2005, propõem que a quebra da homeostase do ferro ocorrida em consequência à exposição às partículas de poluição é o evento inicial dos efeitos deletérios desta exposição. Este mecanismo seria comum para todas as partículas, incluindo aquelas que não contém metais no momento da inalação e deposição no trato respiratório.

Cabe-nos ressaltar que, como no estudo anterior, o modelo experimental utilizado no experimento III, possui algumas limitações. Utilizamos um modelo que, por se tratar de um explante, não permite a completa interação entre as partículas e o sistema biológico, apesar de ser classicamente aceito para o estudo do aparelho respiratório. As respostas envolvendo estímulos hormonais ou nervosos não podem ser avaliadas por este método. Segundo, a dose de $PM_{2,5}$ utilizada por nós neste experimento, como o ROFA, não corresponde as doses encontradas no microambiente do epitélio respiratório *in vivo* após inalação.

Entretanto, apesar das limitações apresentadas em nosso estudo, nossos resultados demonstram que o prejuízo ao aparelho mucociliar pode ser induzido por diferentes componentes das partículas da poluição. O material particulado urbano, de origem de fonte automotiva (móvel), como o $PM_{2,5}$ de São Paulo, mostrou promover maior prejuízo ao aparelho mucociliar que as partículas de origem de fonte fixa, como o ROFA. As análises da composição do material particulado e os resultados da exposição dos palatos de rã sugerem que a diferença na composição, como o demonstrado aumento na concentração de enxofre e a presença de vanádio, e níquel no $PM_{2,5}$ pode ter um papel importante no prejuízo ao epitélio respiratório.

O material particulado disperso na atmosfera é uma mistura complexa de partículas que variam não somente em tamanho e morfologia, mas também em características físicas, químicas e biológicas. O consenso dos efeitos prejudiciais do material particulado para saúde humana é apoiado

por um grande número de trabalhos epidemiológicos e experimentais mas, a habilidade para definir qual o componente mais importante envolvido em sua toxicidade é dificultado pela sua grande complexidade de composição. A variabilidade na composição das partículas é um fator adicional à dificuldade para determinação do componente da partícula que apresenta maior toxicidade, pois suas características são dependentes da fonte emissora, localização geográfica e mudanças climáticas. Os padrões para monitoramento da qualidade do ar são definidos em função do tamanho da partícula e da concentração em massa. Nós demonstramos neste estudo que a ausência de uma única fonte emissora, os ônibus movidos a diesel, foi capaz de reduzir o potencial mutagênico das partículas dispersas na atmosfera de nossa cidade, apesar de não alterar sua concentração em massa, apontando para a necessidade de maior controle nas emissões destes veículos e ou na melhora do combustível por eles utilizado. Segundo o relatório da CETESB, a partir de março de 2005, a adição de enxofre ao óleo diesel passou de 1.100 ppm para 350 ppm. Teoricamente esta redução na adição de enxofre ao óleo diesel pode ter melhorado sua qualidade mas para podermos quantificar os benefícios desta mudança para a qualidade do ar deverão ser feitos vários estudos no futuro. Para demonstrarmos os benefícios desta mudança para a qualidade do ar será necessário ainda um grande esforço em pesquisas. Nós demonstramos também que a variabilidade na composição das partículas é determinante em seu efeito tóxico sobre os sistemas biológicos. O $PM_{2,5}$ coletado em São

Paulo, por sua maior heterogeneidade, apresentou ser mais tóxico ao aparelho mucociliar que o ROFA.

Ao final, ficamos com a certeza de que o controle da qualidade do ar baseado apenas no tamanho das partículas e sua concentração em massa não traduz a realidade de seus efeitos prejudiciais a saúde. Há a necessidade urgente de aprofundarmos nosso conhecimento da dinâmica composição das partículas dispersas na atmosfera o que poderá melhor direcionar os avanços tecnológicos visando reduzir, a limites realmente aceitáveis, a toxicidade das emissões veiculares.

6 - CONCLUSÕES:

Nós concluimos que:

O material particulado atmosférico de diferentes origens é danoso à saúde e a sua toxicidade é dependente de sua composição.

- A ausência de uma única fonte emissora de diesel na cidade de São Paulo, não alterou a massa de MP emitida.

- Apesar da mesma massa, a composição do $PM_{2,5}$ mostrou ser totalmente diferente, como indicado pela redução na concentração de vários elementos traços, de enxofre e de BTEX.

- A redução na concentração de vários elementos traços, de enxofre e de BTEX levou a redução no dano ao DNA sem alteração estatística significativa na toxicidade.

- A exposição aguda ao ROFA leva ao prejuízo funcional do aparelho mucociliar em palato de rã.

- Substâncias antioxidantes, como a vitamina E e o n-Propil galato, protegem o epitélio de palato de rã dos efeitos deletérios da exposição ao ROFA.

- O estresse oxidativo participa do processo lesivo ao aparelho mucociliar secundário ao ROFA.

- Ambos particulados, $PM_{2,5}$ e ROFA, promovem alteração funcional do aparelho mucociliar.

- Somente o material particulado urbano, de origem de fonte automotiva (móvel), como o $PM_{2,5}$ de São Paulo, promoveu prejuízo estrutural do aparelho mucociliar .

- As análises da composição do material particulado e os resultados da exposição dos palatos de rã sugerem que a diferença na composição, como o demonstrado aumento na concentração de enxofre e a presença de vanádio, e níquel no $PM_{2,5}$ podem ter um papel importante no prejuízo ao epitélio respiratório.

*REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS*

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*:

Abbey D E; Hwang BL; Burchette RJ; Vancuren T; Mills KP. Estimated long-term ambient concentrations of PM10 and development of respiratory symptoms in a nonsmoking population. *Archives of Environmental Health*. 1995; 50(22): 139-151.

Almeida IT. *A poluição atmosférica por material particulado na mineração a céu aberto* [dissertação]. São Paulo: Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, 1999.

Athanasίου K; Viras LG; Siskos PA. Mutagenicity and polycyclic aromatic hydrocarbons analysis of ambient airborne particles collected in Athens, Greece. *Sci. Total Environ*. 1986; 52(3):201-9.

Barroso FC; Lorenzi-Filho G; Carvalho CRR; Pimentel M; Boueri FV; Brbas Filho JV. Transporte de eletrólitos no epitélio respiratório dos portadores de fibrose cística. *Ver. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo*; 1992; 47(2)76-78.

Batalha JRF; Guimarães ET; Lobo DJA; Lichtenfels AJFC; Deur T; Carvalho HA; Alves ES; Domingos M; Rodrigues GS; Saldiva PHN. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the *Tradescantia* micronuclei assay. *Mutat. Res*. 1999; 426: 229-232.

Batalha JR, Saldiva PH, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GG, Koutrakis P, Godleski JJ. Concentrated ambient air particles induce vasoconstriction of small pulmonary arteries in rats. *Environ Health Perspect.* 2002;110(12):1191-7.

Becker S, Soukup JM, Gilmour MI, Devlin RB. Stimulation of human and rat alveolar macrophages by urban air particulates: effects on oxidant radical generation and cytokine production. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996;141(2):637-648.

Binkova B; Lenicek J; Benes I; Vidova P; Gadjdos O; Friend M; Sram RJ. Genotoxicity of coke-oven and urban air particulate matter in *in vitro* acellular assays coupled with ³²P-postlabeling and HPLC analysis of DNA adducts. *Mutation Research.* 1998; 414:77-94.

Böhm GM. Relatório sobre a montagem do Laboratório de Defesa Pulmonar apresentado à Copersucar em 1989.

Boucher RC. Current status of CF gene therapy. *Trends Genet.* 1996;12(3):81-4.

Boucher RC. Human airway transport - part one. *American Journal Respiratory Critical Care Medicine.* 1994;150:271-281

Boucher RC. Human airway transport - part two. *American Journal Respiratory Critical Care Medicine.* 1994;150:581-593.

Braga PC. In vivo observation and counting methods for ciliary motion. In: Braga PC and Allegra L. *Methods in Bronchial Mucology*. New York: Raven Press. 1988; pp. 269-276.

Braga ALF; Pereira LAA; Saldiva PHN. Poluição atmosférica e seus efeitos na saúde humana. In: Sustentabilidade na Geração e Uso de Energia no Brasil: os próximos vinte anos, 2002, Campinas, 2002.

Brown RK, Kelly FJ. Evidence for increased oxidative damage in patients with cystic fibrosis. *Pediatr Res*. 1994;36(4):487-93.

Brown RK, Wyatt H, Price JF, Kelly FJ. Pulmonary dysfunction in cystic fibrosis is associated with oxidative stress. *Eur Respir J*. 1996;9(2):334-9.

Bye AM, Muller DP, Wilson J, Wright VM, Mearns MB. Symptomatic vitamin E deficiency in cystic fibrosis. *Arch Dis Child*. 1985;60(2):162-4.

Carnelley T; Le C. Correlation between chemical characteristics and biological reactivity of particulate matter in ambient air. Environmental Sciences Division Alberta, 2001.

Carter JD; Ghio AJ; Samet JM; Devlin RB. Cytokine production by human airway epithelial cells after exposure to an air pollution particle is metal-dependent. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1997; 146: 180-188.

Cendon SP, Battlehner C, Lorenzi Filho G, Dohlnikoff M, Pereira PM, Conceicao GM, Beppu OS, Saldiva PH. Pulmonary emphysema induced by passive smoking: an experimental study in rats. *Braz J Med Biol Res*. 1997;30(10):1241-7.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). Relatório de qualidade do ar do estado de São Paulo 2002. Série Relatório - Secretaria do Estado do Meio Ambiente. São Paulo: CETESB; 2002. Disponível em: URL:<http://www.cetesb.sp.gov.br/AR>.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). Relatório de qualidade do ar do estado de São Paulo 2003. Série Relatório - Secretaria do Estado do Meio Ambiente. São Paulo: CETESB; 2003. Disponível em: URL:<http://www.cetesb.sp.gov.br/AR>.

CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental). Relatório de qualidade do ar do estado de São Paulo 2005. Série Relatório - Secretaria do Estado do Meio Ambiente. São Paulo: CETESB; 2005. Disponível em: URL:<http://www.cetesb.sp.gov.br/AR>.

Chatham et al., 1987

Ciocco A, Thompson DJ. A follow-up of Donora ten years after: methodology and findings. *Am J Public Health*. 1961; 51:155-64.

Costa DL; Dreher KL. Bioavailable transition metals in particulate matter mediate cardiopulmonary injury in health and compromised animal models. *Environ. Health Perspect*. 1997; 105 (5): 1053-60.

Cotelle S; Masfaraud JF; Férard JF. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia* micronucleus and the *Tradescantia* micronucleus assays. *Mutat. Res*. 1999; 426:167-171.

Crebelli R. Monitoring of urban pollution by mutagenicity assays. *Ann. Ist. Super. Sanità.* 1989; 25: 591-594.

Cury PM; Lichtenfels AJFC; Reymão MSF; Conceição GMS; Capellozi VL; Saldiva PHN; Urban levels of air pollution modify the progression of urethane-induced lung tumors in mice. *Pathol. Res. Pract.* 2000; 196:627-633.

Dick CA, Brown DM, Donaldson K, Stone V. The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhal Toxicol.* 2003;15(1):39-52.

Dockery DW; Pope CA III; Xu X; Spengler JD; Ware JH; Fay ME; Ferris BG; Speizer FA. Na association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med.* 1993; 329:1753-1759.

Dockery DW; Pope CA. Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annu. Rev. Public Health.* 1994;15:107-132.

Donaldson K, Stone V, Clouter A, Renwick L, MacNee W. Ultrafine particles. *Occup Environ Med.* 2001; 58(3):211-6, 199.

Dreher KL. Particulate matter physicochemistry and toxicology: In search of causality - a critical perspective. *Inhalation Toxicol.* 2000; 12(3): 45-57.

Dreher KL; Jaskot RH; Lehmann JR; Richards JH; McGee JK; Ghio A J. Soluble transition metals mediate residual oil fly ash-induced acute lung injury. *J. Toxicol. Environ. Health.* 1997; 50: 285-305.

Englert N. Fine particles and human health – a review of epidemiological

studies. *Toxicology Letters*. 2004; 149:235-242.

Espey MG, Miranda KM, Pluta RM, Wink DA. Nitrosative capacity of macrophages is dependent on nitric-oxide synthase induction signals. *J Biol Chem*. 2000;275(15):11341-7

Farmer PB, Sepai O, Lawrence R, Autrup H, Sabro Nielsen P, Vestergard AB, Wates R, Leuratti C, Jones NJ, Stone J, Baan RA, Van Delft JHM, Steenwinkel MJST, Kyrtopoulos AS, Souliotis VL, Theodorakopoulos N, Bacalis NC, Natarajan AT, Bates AD, Haugen A, Andreassen A, Ovrebo S, Shuker, DEG, Amaning, KSA, Schouft A, Ellul A, Garner RC, Dingley KH, Abbondandolo A, Merlo F, Cole J, Aldrich K, Beare D, Capulas E, Rowley G, Waugh APW, Povey AC, Haque K, Kirsch-Volders M, Van Hummelen P, Castelain P. Biomonitoring human exposure to environmental carcinogenic chemicals. *Mutagenesis*. 1996;11:363-381.

Ferreira MI; Petrenko H; Lobo DJA; Rodrigues GE; Moreira A; Saldiva PHN. In situ monitoring of the mutagenic effects of the gaseous emission of a soil waste incinerator in metropolitan São Paulo, Brazil, using the *Tradescantia* stamen-hair assay. *J. Air Waste Manage. Assoc*. 2000; 50:1852-1856.

Festa E, Guimarães E, Macchione M, Saldiva PHN, King M. Acute effects of uridine 5'-triphosphate on mucociliary clearance in isolated frog palate. *J Aerosol Med*. 1997; 10(1): 25-39.

Finlayson-Pitts B, Pitts JN Jr. *Tropospheric air pollution: ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons, and particles*. American Association for the Advancement of Science. 1997; 276:1045-1052.

Firket J. The cause of the symptoms found in the Meuse Valley during the fog of December, 1930. *Bull. Acad. R. Med. Belg.* 1931; 11:683-741.

Fiskesjö G. Allium test. *Methods Mol Biol.* 1995; 43:119-27.

Fiskesjö G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. *Hereditas.* 1985;102(1):99-112.

Fiskesjö G. The Allium test-an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. *Mutat Res.* 1988;197(2):243-60.

Fomin A; Paschke A; Arndt U. Assessment of the genotoxicity of mine-dump material using the *Tradescantia* stamen hair (Trad-SHM) and the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) bioassays. *Mutat. Res.* 1999; 426:173-181.

Gardner SY; Lehmann JR; Costa DL. Oil fly ash-induced elevation of plasma fibrinogen levels in rats. *Toxicological Sciences.* 2000; 56:175-180.

Ghio AJ, Carter JD, Samet JM, Reed W, Quay J, Dailey LA, Richards JH, Devlin RB. Metal-dependent expression of ferritin and lactoferrin by respiratory epithelial cells. *Am J Physiol.* 1998;274(5 Pt 1):L728-36

Ghio AJ, Silbajoris R, Carson JL, Samet JM. Biologic effects of oil fly ash. *Environ Health Perspect.* 2002 ;110 Suppl 1:89-94. Review

Ghio AJ, Carter JD, Samet JM, Reed W, Quay J, Dailey LA, Richards JH, Devlin RB. *Am. J. Physiol (Lung Cell Mol. Physiol. 18)*. 1998; L728-L736.

Ghio AJ, Silbajoris R, Carson JL, Samet JM. Biologic effects of oil fly ash. *Environmental Health Perspectives*. 2002; 110 (1): 89-102.

Ghio JÁ, Cohen DM. Disruption of iron homeostasis as a mechanism of biologic effect by ambient air pollution particles. *Inhalation Toxicology*. 2005; 17: 709-716.

Gilmour PS, Rahman I, Donaldson K, MacNee W. Histone acetylation regulates epithelial IL-8 release mediated by oxidative stress from environmental particles. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003;284(3):L533-40. Epub 2002 Nov 22 .

Grant WF; Lee HG; Logan DM; Salamone MF. The use of *Tradescantia* and *Vicia faba* bioassays for the in situ detection of mutagens in an aquatic environment. *Mutat. Res.*1992; 270:53-62.

Grievink L, Smit HA, Ocke MC, van 't Veer P, Kromhout D. Dietary intake of antioxidant (pro)-vitamins, respiratory symptoms and pulmonary function: the MORGEN study. *Thorax*. 1998;53(3):166-71.

Grievink L, van der Zee SC, Hoek G, Boezen HM, van't Veer P, Brunekreef B. Modulation of the acute respiratory effects of winter air pollution by serum and dietary antioxidants: a panel study. *Eur Respir J*. 1999;13(6):1439-46.

Guimarães ET; Domingos M; Alves ES; Caldini N Jr.; Lobo DJA; Lichtenfels AJFC; Saldiva, PHN. Detection of the genotoxicity of air pollutants in and

around the city of São Paulo (Brazil) with the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) assay. *Environ. Exp. Bot.* 2000; 44: 1-8.

Hemminki K and Pershagen G. Cancer Risk of Air Pollution: Epidemiological Evidence. *Environ Health Perspect.* 1994;102:187-192.

Homnick DN, Cox JH, DeLoof MJ, Ringer TV. Carotenoid levels in normal children and in children with cystic fibrosis. *J Pediatr.* 1993;122(5pt 1):703-7.

Hornberg C; Maciuleviciute L; Seemayer NH; Kainka E. Induction of sister chromatid exchanges (SCE) in human tracheal epithelial cells by the fractions PM-10 and PM-2.5 of airborne particulates. *Toxicol Letters.* 1998; 96,97: 215-220.

Hsiao WLW, Mo ZY, Fang M, Shi XM, Wang f. Cytotoxicity of PM_{2.5} and PM_{2.5-10} ambient air pollutants assessed by the MTT and Comet assays. *Mutation Research.* 2000; 471:45-55.

Ichikawa S. In situ monitoring with *Tradescantia* around nuclear power plants. *Environ. Health Perspect.* 1981; 37:145-164.

Jiang C; Finkbeiner WE; Winddicombe JH; McCray PB Jr; Miller SS. *Science.* 1993; 262(5132):424-7.

Joris L, Dab I, Quinton PM. Elemental composition of human airway surface fluid in healthy and disease airways. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1993; 148:1633-1637.

Kadiiska MB, Mason RP, Dreher KL, Costa DL, Ghio AJ. In vivo evidence of free radical formation in the rat lung after exposure to an emission source air pollution particle. *Chem. Res. Toxicol.* 1997;10 (10):1104-8.

Kelly FJ. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occupational and Environmental Medicine.* 2003; 60(8): 612-616.

King M. Role of mucus viscoelasticity in clearance by cough. *Eur. J. Respir. Dis.* 1987; 71(153):165-172.

Knasmüller S; Gottmann E; Steinkellner H; Fomin A; Pickl C; Paschke A; God R; Kundi M. Detection of genotoxic effects of heavy contaminated soils with plant bioassays. *Mutat. Res.* 1998; 420:37-48.

Knowles MR, Boucher RC. Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways. *J Clin Invest.* 2002;109(5):571-7.

Kodavanti UP, Jaskot Hauser R, Christiani DC, Meng ZH, McGee J, Ledbetter A, Richards J, Costa DL. Pulmonary responses to oil fly ash particles in the rat differ by virtue of their specific soluble metals.

Koenig JQ, Jansen K, Mart TF, Lumley T, Kaufman J, Trenga CA, Sullivan J, Liu LJS, Shapiro GG, Larson TV. Measurement of offline exhaled nitric oxide in a study of community exposure to air pollution. *Environ. Health Perspect.* 2003; 111:1625 -1629.

Krishna G, Nath J, Ong T. Correlative genotoxicity studies of airborne particles in *Salmonella typhimurium* and cultured human lymphocytes. *Environ. Mutagen.* 1984; 6 (4): 585-92.

Lemos M, Lichtenfels AJF, Amaro E, Macchione M, Martins MA, King M, Böhm G M, Saldiva PHN. Quantitative pathology of nasal passages in rats exposed to urban levels of air pollution. *Environ. Res.* 1994; 66: 96-101.

Lemos M, Mohallem S, Macchione M, Dolhnikoff M, Assunção J, Artaxo P, Godleski J, Koutrakis P, Saldiva P. Chronic exposure to urban air pollution induces structural alterations in murine coronary arteries. (*in press*)

Lepage G; Champagne J; Ronco N; Lamre A; Osberg I; Sokol R; Roy CC. Supplementation with carotenoids corrects increased lipid peroxidation in children with cystic fibrosis. *American Journal of Clinical Nutrition.* 1996; 64:87-93.

Li XY, Gilmour PS, Donaldson K, MacNee W. Free radical activity and pro-inflammatory effects of particulate air pollution (PM₁₀) in vivo and in vitro. *Thorax.* 1996; 51: 1216-22.

Li XY, Gilmour PS, Donaldson K, MacNee W. *In vivo* and *in vitro* proinflammatory effects of particulate air pollution (PM₁₀). *Environ Health Perspect.* 1997; 150(5):1279-1283.

Logan WPD. Mortality in London fog incident. *Lancet.* 1952; 1:336-338.

Lorenzi G, Saldiva PHN. Aspectos funcionais do aparelho mucociliar. In: Paulo Tavares. *Atualização em Fisiologia Respiratória*. 1º Edição. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 1991. p.86-99.

Ma TH. Micronuclei induced by X-rays and chemical mutagens in meiotic pollen mother cells of *Tradescantia* - a promising mutagen system. *Mutat Res*. 1979; 64:307-313.

Ma TH. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube aberration test for in situ monitoring and mutagen screening. *Environ. Health Perspect*. 1981; 37:85-90.

Ma TH, Cabrera GL, Chen R, Gill BS, Sandhu SS, Vanderberg AL, Salamone MF. *Tradescantia* micronucleus bioassay. *Mutat. Res*. 1994;310:221-230.

Ma TH, Harris MM, Anderson VA, Ahmed I, Mohammad K, Bare JL; Lin G. *Tradescantia*- micronucleus (Trad-MCN) tests on 140 health-related agents. *Mutat. Res*. 1984;138:157-167.

Macchione M; Lorenzi-Filho G; Guimaraes ET; Junqueira VB; Saldiva PH. The use of the frog palate preparation to assess the effects of oxidants on ciliated epithelium. *Free Radic Biol Med* 1998; 24(5): 714-21.

Macchione M, Oliveira AP, Gallafrio CT, Muchão FP, Obara MT, Guimaraes ET, Artaxo P, King M, Lorenzi-Filho G, Junqueira VC, Saldiva PH. Acute effects of inhalable particles on the frog palate mucociliary epithelium. *Environ Health Perspect*. 1999;107(10):829-33.

Massad E, Saldiva CD, Cardoso LM, Da Silva R, Saldiva PH, Bohm GM. Acute toxicity of gasoline and ethanol automobile engine exhaust gases. *Toxicol Lett.* 1985; 26(2-3):187-92.

Massad E, Saldiva PHN, Saldiva CD, Caldeira MP, Cardoso LM, de Moraes AM, Calheiros DF, Silva R, Böhm GM. Toxicity of prolonged exposure to ethanol and gasoline autoengine exhaust gases. *Environ. Res.* 1986; 40(2): 479-486.

McClellan RO. Health effects of diesel exhaust: a case study in risk assessment. *Amer. Ind. Hyg. Assoc. J.* 1986; 47:1-13.

Miedema I, Feskens EJ, Heederik D, Kromhout D. Dietary determinants of long-term incidence of chronic nonspecific lung diseases. The Zutphen Study. *Am J Epidemiol.* 1993;138(1):37-45.

Miraglia SG, Saldiva PH, Bohm GM. An evaluation of air pollution health impacts and costs in Sao Paulo, Brazil. *Environ Manage.* 2005; 35(5):667-76.

Morabia A, Sorenson A, Kumanyika SK, Abbey H, Cohen BH, Chee E. Vitamin A, cigarette smoking, and airway obstruction. *Am Rev Respir Dis.* 1989;140(5):1312-6.

Mudway IS, Kelly FJ. Ozone and the lung: a sensitive issue. *Mol Aspects Med.* 2000;21(1-2):1-48. Review.

Mudway IS; Stenfors N; Duggan ST; Roxborough H; Zielinski H; Marklund SL; Blomberg A; Frew A; Sandström T; Kelly FJ. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2004; 423: 200-212.

Natush DFS. Potentially carcinogenic species emitted to the atmosphere by fossil-fueled power plants. *Environ. Health Perspect.* 1978; 22:79-90.

Ness AR, Powles JW, Khaw KT. Vitamin C and cardiovascular disease: a systematic review. *J Cardiovasc Risk.* 1996;3(6):513-21. Review.

Norwood J.Jr., Ledbetter AD, Doerfler D L, Hatch G E. Residual oil fly ash inhalation in guinea pigs: influence of absorbate and glutathione depletion. *Toxicological Sciences.* 2001; 61: 144-153.

Park P, Gilmour M I, Dreher K L, Costa D L. Oxidant generation and lung injury after particulate air pollution exposure increase with the concentrations of associated metals. *Inhal.Toxicol.* 1996; 8: 457-477.

Pereira P, Saldiva PH, Sakae RS, Bohm GM, Martins MA. Urban levels of air pollution increase lung responsiveness in rats. *Environ Res.* 1995; 69(2):96-101.

Peters A, Doring A, Wichmann HE, Koenig W. Increased plasma viscosity during an air pollution episode: a link to mortality? *Lancet.* 1997; 349: 1583-1587.

Pope CA, Dockery DW; Schwartz J. Review of epidemiological evidence of health effects of particulate air pollution. *Inhal Toxicol.* 1995; 7: 1-18.

Pope C All, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K; Thurston G. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long term

exposure to fine particulate air pollution. *Journal of American Medical Association*. 2002; 287(9): 1132-1141.

Pope CA 3rd. Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: biologic mechanisms and who's at risk? *Environ Health Perspect*. 2000;108 Suppl 4:713-23.

Pope CA III; Dockery DW; Spengler JD; Raizenne ME. Respiratory health and PM10 pollution. *Am Rev Respir Dis*. 1991;144: 668-674.

Pritchard RJ, Ghio AJ, Lehmann JR, Winset DW, Tepper JS, Park P, Gilmour M I, Dreher KL; Costa D L. Oxidant generation and lung injury after particulate air pollution exposure increase with the concentrations of associated metals. *Inhal.Toxicol*. 1996; 8: 457-477.

Pryor WA. Mechanisms of radical formation from reactions of ozone and target molecules in the lung. *Free Radic. Biol. Med*. 1994; 17, 451-465.

Puchelle E, Polu JM, Zahm JM, Sadoul P. Role of the rheological properties of brochial secretions in the mucociliary transport at the surface. *Eur. J. Respi. Dis*. 1980;61(111):29-34.

Reddan JR; Giblin FJ; Sevilla M; Padgaonkar V; Dziedzic DC; Leverens VR; Misra IC; Chang JS; Pena JT. Propyl gallate is a superoxide mismutase mimic and protects cultured lens epithelial cells from H₂O₂ insult. *Experimental Eye Research*. 2002; 76:49-59.

Report on Carcinogens, Tenth Edition; U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program, December 2002.

Reymão MSF; Cury PM; Lichtenfels AJFC; Lemos M; Battlehner CN; Conceição GMS; Capelozzi VL; Montes GS; Júnior MF; Martins MA; Böhm GM; Saldiva PHN. Urban air pollution enhances the formation of urethane-induced lung tumours in mice. *Environ. Res.* 1997; 74:150-158.

Rivero DH, Soares SR, Lorenzi-Filho G, Saiki M, Godleski JJ, Antonangelo L, Dolhnikoff M, Saldiva PH. Acute cardiopulmonary alterations induced by fine particulate matter of Sao Paulo, Brazil. *Toxicol Sci.* 2005; 85(2):898-905.

Rivero DH; Lorenzi-Filho G; Pazetti R; Jatene FB; Saldiva PH. Effects of bronchial transection and reanastomosis on mucociliary system. *Chest.* 2001;119(5):1510-5.

Rodrigues GS; Ma TH; Pimentel D; Weinstein LN. *Tradescantia* bioassays monitoring systems for environmental mutagenesis: a review. *Crit. Rev. in Plant Sci.* 1997; 16:325-359.

Rodrigues GS; Madkours AS; Weinstein LH. Genotoxic activity of ozone in *Tradescantia*. *Environ. Exp. Botany.* 1996; 36:45-50.

Romieu I; Meneses F; Ramirez M; Ruiz S; Padilla R; Sienra JJ; Gerber M; Grievink L; Dekker R; Walda I; Brunekreef B; Antioxidant supplementation and respiratory functions among workers exposed to high levels of ozone. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1998; 158 (1): 226–232.

Rubin BK, Ramirez O, King M. Mucus-depleted frog palate as a model for the study of mucociliary clearance. *J Appl Physiol*. 1990;69(2):424-9.

Rubin BK. An *in vitro* comparison of the mucoactive properties of guaifenesin, iodinated glycerol, surfactant, and albuterol. *American College of Chest Physicians*. 1999; 116: 195-200.

Saldiva PH, Lichtenfels AJ, Paiva PS, Barone IA, Martins MA, Massad E, Pereira JC, Xavier VP, Singer JM, Bohm GM. Association between air pollution and mortality due to respiratory diseases in children in Sao Paulo, Brazil: a preliminary report. *Environ Res*. 1994;65(2):218-25

Saldiva PH, Massad E, Caldeira MP, Calheiros DF, Saldiva CD, Nicolelis MA, Bohm GM. Pulmonary function of rats exposed to ethanol and gasoline fumes. *Braz J Med Biol Res*. 1985;18(4):573-7.

Saldiva PH, Pope CA 3rd, Schwartz J, Dockery DW, Lichtenfels AJ, Salge JM, Barone I, Bohm GM. Air pollution and mortality in elderly people: a time-series study in Sao Paulo, Brazil. *Arch Environ Health*. 1995; 50(2):159-63.

Saldiva PH; Clarke RW; Coull BA; Stearns RC; Lawrence J; Murthy GG; Dias 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):1610-7.

Saldiva PHN; King M; Delmonte VLC; Macchione M; Parada MAC; Deliberto ML; Sakae RS; Criado PMP; Silveria PLP; Zin WA; Böhm GM.. Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats. *Environmental Research*. 1992; 57:19-33.

Saldiva, PHN. Aparelho mucociliar: Aspectos funcionais e métodos de estudo. *Jornal de Pneumologia*. 1990; 16(3).

Salnikow K; Li X; Lippmann M. Effect of nickel and iron co-exposure on human lung cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* . 2004; 196: 258-265.

Salvi S, Holgate ST. Mechanisms of particulate matter toxicity. *Clinical and Experimental Allergy*. 1999; 29:1187-1194.

Samet JM; Dominici F; Currier FC; Coursac I; Zeger SL. Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994. *N Engl J Med*. 2000; 343:1742-1749.

Sato M.I.Z; Valente, G.U., Coimbra, C.A., Coelho, M.C.L.S., Sanchez, P.S., Alonso, C.D., Martins, M.T., 1995. Mutagenicity of airborne particulate organic material from urban and industrial areas of São Paulo, Brazil. *Mutat. Res.*, 335: 317-330; 338: 51-57.

Schwartz J, Weiss ST. Dietary factors and their relation to respiratory symptoms. The Second National Health and Nutrition Examination Survey. *Am J Epidemiol*. 1990;132(1):67-76.

Schwartz J, Weiss ST. Relationship between dietary vitamin C intake and pulmonary function in the First National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES I). *Am J Clin Nutr*. 1994;59(1):110-4.

Schwartz J. Air pollution and daily mortality: A review and meta analysis. *Environ Res*. 1994; 64: 36-52.

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

Schwartz J; Dockery DW; Neas LM. Is daily mortality associated specifically with fine particles? *J Air Waste Manag Assoc.* 1996; 46: 927-939.

Seaton A.; MacNee W; Donaldson K; Godden D. Particulate air pollution and acute health effects. *Lancet.* 1995; 345: 176-178.

Shukla A; Timblim C; Berube K; Gordon T; McKinney W; Driscoll K; Vacet P; Mossman BT. Inhaled particulate matter causes expression of nuclear factor (NF)- κ B-related genes and oxidant-dependent NF- κ B activation *in vitro*. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2000; 23: 182-187.

Sies H. *Oxidative stress II*. In: Oxidants and antioxidants. London: Academic Press, 1991.

Soares SRC, Bueno-Guimarães HM, Ferreira CM, Rivero DHRF, De Castro I, Garcia MLB; Saldiva PHN. Urban air pollution induces micronuclei in peripheral erythrocytes of mice *in vivo*. *Environ. Res.* 2002, 92:191-196.

Souza MB, Saldiva PH, Pope CA3rd, Capelozzi VL. Respiratory changes due to long-term exposure to urban levels of air pollution: a histopathologic study in humans. *Chest.* 1998; 113(5):1312-8.

Strachan DP, Cox BD, Erzinciloglu SW, Walters DE, Whichelow MJ. Ventilatory function and winter fresh fruit consumption in a random sample of British adults. *Thorax.* 1991;46(9):624-9.

Sumita NM, Mendes ME, Macchione M, Guimaraes ET, Lichtenfels AJ, de Lobo DJ, Saldiva PH, Saiki M. *Tradescantia pallida* cv. purpurea boom in the characterization of air pollution by accumulation of trace elements. *J Air Waste Manag Assoc.* 2003; 53(5):574-9.

Sumita NM. *Avaliação da poluição ambiental da cidade de São Paulo pela análise elementar em plantas (Tradescantia pallida), por método de ativação com nêutrons* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2002.

Taylor JC, Madison R, Kosinska D. Is antioxidant deficiency related to chronic obstructive pulmonary disease? *Am Rev Respir Dis.* 1986;134(2):285-9.

Thurston G. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long term exposure to fine particulate air pollution. *Journal of American Medical Association.* 2002; 287(9): 1132-1141.

Tockman MS; Khoury MJ; Cohen BH. Milk drinking and possible protection of the respiratory epithelium. *Journal of Chronic Diseases.* 1986; 39: 207-209.

Tokiwa H and Ohnishi Y. Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 1986;17: 23-60.

Tomatis L. Air Pollution and Human Cancer. Berlin:Springer, 1990. *Toxicol Sci.* 1998;43(2):204-12.

Verdugo P; Tam PY; Butler J. Conformational structure of respiratory mucus studied by laser correlation spectroscopy. *Biorheology*. 1983; 20: 223-230.

Watts R; Fitzgerald B; Hell G; Garabedian H; Williams R; Warren S; Franklin L; Lewtas J. Use of bioassay methods to evaluate mutagenicity of ambient air collected near a municipal waste combustor. *J. of the Air Pollution Control Assoc.* 1989; 39:1436-1439.

Welsh MJ. Electrolyte transport by airway epithelia. *Physiol. Rev* . 1987; 67(4): 1143-1184.

Welsh MJ. Production and control of airway secretions. In: Fisman, A. *Pulmonary Diseases and Disorders*. New York, McGraw-Hill Book Company, 1988; vol.1: 113-118.

WHO (World Health organization). Environmental health criteria 188. Geneva, 1997. p333-411.

Whong WZ, Stewart J, Ong T. Development of an in situ microbial mutagenicity test for airborne workplace mutagens: laboratory evaluation. *Mutat. Res.* 1984; 130 (1): 45-51.

Willeke K, Baron PA. Aerosol measurement: principles techniques and applications. In: Van Nostrand Reinhold. New York, 1993.

Winklhofer-Roob BM, Van't Hof MA, Shmerling DH. Response to oral beta-carotene supplementation in patients with cystic fibrosis: a 16-month follow-up study. *Acta Paediatr.* 1995;84(10):1132-6. Erratum in: *Acta Paediatr* 1996;85(1):124.

Winters SL, Yates DB. Interaction between ion transporters and the mucociliary transport in dog and baboon. *J.Appl. Physio.* 1997; 83:1348-1359.

Wong LB, Miller IF, Yeates DB. Nature of the mammalian ciliary metachronal wave. *J Appl Physiol.* 1993;75(1):458-67.

Wood LG, Fitzgerald DA, Gibson PG, Cooper DM, Garg ML. Increased plasma fatty acid concentrations after respiratory exacerbations are associated with elevated oxidative stress in cystic fibrosis patients. *Am J Clin Nutr.* 2002;75(4):668-75. Erratum in: *Am J Clin Nutr.* 2002;76(4):907.

Yagi CSA. *Estudo das propriedades físicas e de transportabilidade do muco respiratório em humanos, obtido através de dois métodos: escarro induzido e coleta direta durante anestesia geral* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2002.

Zhou W and Ye, SH. Effects of two new lubricants on the mutagenicity of scooter exhaust particulate matter. *Mutat. Res.* 1998; 414:131-137.

*De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia ^aL. Freddi, Maria F.Crestana, Marinalva de S.Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Velhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

8

ANEXOS

Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in São Paulo, Brazil[☆]

R. Carvalho-Oliveira,^a R.M.K. Pozo,^a D.J.A. Lobo,^a A.J.F.C. Lichtenfels,^a
H.A. Martins-Junior,^b J.O.W.V. Bustilho,^b M. Saiki,^b I.M. Sato,^b and P.H.N. Saldiva^{a,*}

^aLaboratory of Experimental Air Pollution, Department of Pathology, School of Medicine, Faculty of Medicine, University of São Paulo, Av. Dr. Arnaldo 455, CEP 01246-903 São Paulo, SP, Brazil

^bInstitute of Energetic and Nuclear Research, University of São Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, 2242, CEP 05508-000 São Paulo, SP, Brazil

Received 28 January 2004; received in revised form 28 April 2004; accepted 4 May 2004

Available online 21 July 2004

Abstract

In 2003, a bus strike paralyzed the fleet of buses in São Paulo, Brazil during 3 days, from 6 to 8 of April, the complete interruption of services being achieved on the 7th. We evaluated the effect of the absence of this source of pollution on the composition, mutagenicity, and toxicity of the fine particulate material collected during this period. Particles were sampled in glass fiber filters on days 7 and 15 of April of 2003 (strike and nonstrike days, respectively), using a high-volume sampler. Trace element determinations (As, Br, Co, Cl, Fe, La, Mn, Sb, Sc, and Th) of particulate material samples were carried out by neutron activation analysis. Sulfur determination was done by X-ray fluorescence analysis. The ratio between nonstrike/strike concentrations of hydrocarbons associated with automotive emissions (benzene, toluene, ethyl-benzene, and xylenes; BTEX) was determined by gas chromatography/mass spectrometry. Mutagenesis of testing solutions was determined by means of the *Tradescantia* micronucleus assay in early tetrads of *Tradescantia pallida*. The inhibition of mitosis of the cells of the primary meristema of the root tips of *Allium cepa* was used as an index of the toxicity. Fine particle trace element contents were lower during the strike. The concentrations of sulfur and BTEX were 50% and 39.3% lower, respectively, on the strike day. A significant ($P = 0.038$) reduction of micronuclei induced by fine particles sampled during the strike was observed. No effect of the strike on toxicity was detected. These results indicate that a program aiming to reduce emissions of the bus fleet in our town may impact positively the air quality by reducing the mutagenic potential of ambient particles.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Diesel emissions; Mutagenesis; Air pollution; Environmental toxicology; Ambient particles

1. Introduction

The relationship between air pollution and cancer has been consistently demonstrated by epidemiological studies (Tomatis, 1990; Hemminki and Pershagen, 1994). In a recent study (Pope et al., 2002), risk factor data for approximately 500,000 adults were linked with

air pollution data for metropolitan areas throughout the United States and this indicated that fine particulate and sulfur-oxide-related pollution were significantly associated with lung cancer. In that study (Pope et al., 2002) each 10- $\mu\text{g}/\text{m}^3$ elevation in fine particulates was associated with approximately an 8% increased risk of lung cancer mortality. Ambient air, particularly in densely populated urban environments, contains a variety of known human carcinogens, including organic compounds such as benzo[a]pyrene and benzene, inorganic compounds such as arsenic and chromium, and radionuclides (Natush, 1978), most contained within ambient particles. Coherently, several studies

[☆]This work was made possible by the financial support of CNPq (Brazilian Council of Research) and LIM-HCFMUSP (Institute of the Laboratories of Medical Investigation, Clinical Hospital, School of Medicine, University of São Paulo).

*Corresponding author. Fax: +55-11-3064-2744.

E-mail address: pepino@usp.br (P.H.N. Saldiva).

using extracts of particulate matter sampled in urban centers reported significant mutagenic effects (Tokiwa and Ohnishi, 1986; Crebelli, 1989; Green et al., 1991; Lewtas, 1993; Sato et al., 1995a,b; Farmer et al., 1996; Zhou and Ye, 1998; Batalha et al., 1999). In situ exposure protocols demonstrated a cancer promoter effect of air pollution in mice (Reymão et al., 1997; Cury et al., 2000). In addition the presence of an increased frequency of mutations in plants (Guimarães et al., 2000; Ferreira et al., 2000) and mice (Soares et al., 2003) was evidenced after chronic exposures to “real world” air pollution. These findings are supportive of the concept that low levels of air pollution are able to favor the development of tumors, diesel emissions being one of the sources of ambient pollution more probably associated with the development of malignancies. As a consequence of the aforementioned evidence, diesel particulate matter is presently considered “reasonably anticipated to be a human carcinogen” by the *Report on Carcinogens of the US Department of Health and Human Services* (2002).

In São Paulo the majority of public transportation is provided by approximately 17,000 buses operating on diesel. The diesel fleet in our town produces over 30% of primary particles and 25% of secondary aerosol with an aerodynamic diameter below 10 μm (CETESB, 2002). The age and technology of diesel engines in our town is quite variable and their emissions are not subjected to control. Thus, it is possible that air quality in São Paulo may benefit from a more restrictive control of diesel vehicle emissions, but the magnitude of such a benefit is not clearly known. In fact, the same scenario—large number of diesel vehicles operating without an effective control of emissions—is shared by several large urban centers of developing countries, which face the dilemma of how much money can be spent to control air pollution when other investments are also demanding.

In 2003, a bus strike paralyzed the fleet of buses in São Paulo during 3 days, from 6 to 8 of April, the complete interruption of services being achieved on the 7th. We decided to evaluate the effect of the absence of this source of pollution on the composition, mutagenicity, and toxicity of the fine particulate material collected during this period. We reasoned that the information provided by this “natural experiment” could be of use to evaluate the adverse impact of diesel emissions on urban environments, providing evidence of the possible benefits of controlling diesel emissions.

2. Materials and methods

2.1. Particle sampling and analysis

Particles were sampled on days 7 and 15 of April of 2003 (strike and nonstrike days, respectively). For this

purpose we employed a high-volume sampler (Energética, Brazil) coupled with an inlet (Tisch Environmental Inc., USA) that allows the separation of particles below 2.5 μm (PM_{2.5}) at a flow rate of 1.1 cubic meter per minute during 24 h. Our particle sampler was located on the top of the roof of our Medical School (about 15 m above the soil), which is situated on a cross road with high traffic in São Paulo, downtown. On day 7 of April, there were no buses running in this region, whereas on the 15th of April, the frequency of buses passing in the area was 913 buses/h. Because of security reasons, we could not place our sampler at ground level. Thus, particles collected at this height may not entirely reflect exposure of people at the street level but are probably adequate to mimic exposure of the millions of inhabitants of São Paulo that live and work in multifloor buildings. Particles were collected in glass fiber filters, which were dried for 24 h at 50 °C before and after particle collection for weighing. PM_{2.5} concentrations were 47.32 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ on the strike day and 43.01 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ on the nonstrike day. The selection of the 15th of April for comparative purposes was not done only on the basis of similar PM_{2.5} concentrations. Strike and nonstrike days were separated by only 1 week (i.e., in the same season of the year), mean temperatures were similar (19.43 and 20.95 °C, respectively), and these days were matched with regard to mean relative humidity (72.69% and 70.38%), mean wind speed and direction (1.14 and 1.01 m/s, southwest in both cases), and atmospheric pressure (694 and 693.5 mm Hg).

Half of the filters were used for toxicological studies, whereas the remaining parts were sent for other analyses, being further split for trace element and organic compound analyses. Trace element determinations of the material collected on filters were carried out by neutron activation analysis. Filter samples and elemental standards were irradiated under thermal neutron flux of the IEA-R1 nuclear research reactor for 0.5 min and 16 h. After adequate decay times, the irradiated samples and standards were measured using a hyperpure Ge detector coupled to a multichannel analyzer. Concentrations of elements were calculated by a comparative method. Blanks of filters were analyzed using the same experimental conditions adopted in the analysis of filter samples. Contribution from blank was also discounted and then the final results were expressed as a function of volume of air collected. Sulfur determination was done by X-ray fluorescence analysis, using the nonexposed part of the filters as a blank. The ratio between nonstrike/strike concentrations of hydrocarbons associated with automotive emissions (benzene, toluene, ethyl-benzene, and xylenes; BTEX) was determined after extraction with pentane, by gas chromatography/mass spectrometry. Chemical analyses were done in triplicate and the results expressed as means.

2.2. Toxicological assays

For the evaluation of toxicity, we extracted particles from the filters by ultrasonication (8 h) in distilled water. We avoided the use of organic solvents during the process of extraction since the plant bioassays employed in this study are highly susceptible to these substances. The efficiency of extraction was determined by weighing the filters before and after extraction. The weight of the filters was determined after drying them for 24 h at 50 °C. The extraction efficiencies (mass extracted/total mass) were 0.436 and 0.41 for strike and nonstrike filters, respectively. We prepared two concentrations of extracts, corresponding to 0.1 and 1 mg/L. Blank (distilled water) and controls (formaldehyde in distilled water, 1:5000 v.v.) were also prepared.

Mutagenesis of testing solutions was determined by means of the *Tradescantia* micronucleus assay (TRAD-MN) in early tetrads of *Tradescantia pallida* (Ma, 1979; Batalha et al., 1999; Guimarães et al., 2000). Briefly, young inflorescences of *T. pallida* were obtained from a plant nursery and kept in laboratory for 24 h in Hoagland's solution before treatment. After this period, cuttings were transferred to Becker jars containing the test solutions (negative and positive controls and the two concentrations of particle extracts) for 8 h. As negative control we used distilled water and the positive solution was again a formaldehyde solution, this time at a concentration of 1:10,000 in water. After treatment, the inflorescences were allowed to recover for 24 h in Hoagland's solution and then fixed in 1:3 acetic acid/ethanol solution for 24 h. Inflorescences were dissected and young anthers squashed in a solution of acetocarmine stain on a glass slide. Only preparations containing early tetrads were considered. The number of micronuclei in 300 tetrads per slide was counted at 400× magnification, and the results were expressed as percentage (frequency of micronuclei). The counting of the micronuclei was done in coded slides, which were revealed only after the completion of the experiment.

The inhibition of mitosis of the cells of the primary meristema of the root tips of *Allium cepa* was used as an index of the toxicity of the test solutions. The induction of roots was done in onions immersed in Hoagland's solution for 5 days. After this, roots were immersed in the test solutions for 30 h and then fixed in 1:3 acetic acid/ethanol solution for 24 h. Roots were rinsed in distilled water for 10 min and then hydrolized in 1 N HCl at 60 °C for 7 min. Roots were rinsed in water again and the root tissue was dissected 1 mm from the tip, squashed in a solution of acetocarmine stain on a glass slide, and covered with a coverglass. The mitotic rate was determined by counting 300 cells at a magnification of 1000× in coded slides and expressed as percentage.

Statistical analysis was done by computing general linear equations, using either the micronuclei frequency or the mitotic rate as dependent variable and considering terms accounting for the type and concentration of the test substance solutions and for the strike/nonstrike periods as explanatory variables. An interaction term between concentration and period of sampling was also included in the models. The level of significance was set at 5%. Statistical analysis was done with the aid of the SPSS v10.0 package.

3. Results

Table 1 presents concentrations of the trace elements obtained in the material collected on the filters, showing, as a general rule, a decrease of element concentrations on the days of strike.

The concentration of sulfur was lower on the strike day ($0.629 \pm 0.02 \mu\text{g}/\text{m}^3$ during the strike vs. $1.424 \pm 0.08 \mu\text{g}/\text{m}^3$ on the nonstrike day). Coherent with the results of the elemental analysis, a reduction of 39.3% of BTEX was observed on the strike day.

Table 2 presents the results of the measurements of micronuclei in early tetrads of *Tradescantia* exposed to the two concentrations of PM2.5 extracts and the data obtained for the negative and positive controls. The same results may be graphically inspected in Fig. 1. Statistical analysis indicated a significant ($P = 0.038$) reduction of micronuclei during the strike.

Table 3 and Fig. 2 present the results of the experiments focusing on the toxicity of the aqueous extracts of PM2.5, using the mitotic rate of root tips of *A. cepa* as an estimator of toxicity. Statistical analysis disclosed a nonsignificant ($P = 0.07$) effect of the strike.

Table 1
Concentrations of trace elements in PM2.5 collected on the strike and nonstrike days

Element	Strike days	Nonstrike days
As (ng m^{-3})	3.44 ± 0.39^a	12.91 ± 0.53
Br (ng m^{-3})	8.91 ± 0.32	8.88 ± 0.39
Cl ($\mu\text{g m}^{-3}$)	3.01 ± 0.26	8.88 ± 0.39
Co (ng m^{-3})	0.51 ± 0.04	1.14 ± 0.04
Fe ($\mu\text{g m}^{-3}$)	0.78 ± 0.03	1.15 ± 0.03
La (ng m^{-3})	1.02 ± 0.47	2.33 ± 0.29
Mn (ng m^{-3})	11.9 ± 1.8	27.5 ± 2.2
Sb (ng m^{-3})	3.53 ± 0.06	8.73 ± 0.08
Sc (ng m^{-3})	0.069 ± 0.010	0.141 ± 0.009
Th (ng m^{-3})	0.144 ± 0.053	0.351 ± 0.050

^aContribution from blank of filter was discounted. The uncertainty of the result was evaluated using statistical counting errors of the sample and standard.

Table 2

Means and corresponding standard deviations (SD) of the percentage of micronuclei measured in early tetrads of *Tradescantia* exposed for 8 h to different concentrations of PM2.5 extracts (0.1 and 1 mg/L)

	Group	N	Mean	SD
Nonstrike	Blank	8	3.14	1.73
	0.1 mg/L	10	4.46	3.47
	1 mg/L	14	7.64	5.33
	Formaldehyde	12	7.43	3.99
Strike	Blank	10	3.12	1.72
	0.1 mg/L	10	3.16	1.79
	1 mg/L	23	4.27	2.78
	Formaldehyde	10	6.28	2.27

The results obtained for the negative (distilled water) and positive (formaldehyde 1:5000 v.v. in distilled water) controls are also shown. Statistical analysis indicated a significant ($P = 0.038$) reduction of micronuclei during strike.

Fig. 1. Graphic representation (means and corresponding standard errors) of the percentage of micronuclei measured in early tetrads of *Tradescantia* exposed for 8 h to different concentrations of PM2.5 extracts (0.1 and 1 mg/L). The results obtained for the negative (distilled water) and positive (formaldehyde 1:5000 v.v. in distilled water) controls are also shown. Statistical analysis indicated a significant ($P = 0.038$) reduction of micronuclei during the strike.

4. Discussion

Our study showed that a bus strike in São Paulo, downtown, changed PM2.5 composition, as indicated by reductions in concentrations of some trace elements, sulfur and BTEX. When aqueous extracts of particles collected during the strike were used in assays to

Table 3

Means and corresponding standard deviations (SD) of the mitotic rate (%) of the meristematic tissue of the root tips of *A. cepa* exposed for 30 h to different concentrations of PM2.5 extracts (0.1 and 1 mg/L)

	N	Mean	SD
Blank	14	8.47	4.32
Formaldehyde	8	1.5	2.26
0.1 mg/L nonstrike	11	5.13	2.23
0.1 mg/L strike	7	6.81	1.95
1 mg/L nonstrike	11	4.34	3.97
1 mg/L strike	17	5.51	1.09

Results obtained for the negative (distilled water) and positive (formaldehyde 1:10,000 v.v. in distilled water) controls are also shown. Statistical analysis indicated a nonsignificant ($P = 0.07$) reduction of mitotic rate during strike.

Fig. 2. Graphic representation (means and corresponding standard errors) of the mitotic rate (%) of the meristematic tissue of the root tips of *A. cepa* exposed for 30 h to different concentrations of PM2.5 extracts (0.1 and 1 mg/L). Results obtained for the negative (distilled water) and positive (formaldehyde 1:10,000 v.v. in distilled water) controls are also shown. Statistical analysis disclosed a nonsignificant ($P = 0.07$) effect of the strike.

evaluate mutagenesis and toxicity, a significant reduction in damage to DNA was observed, without significant changes in toxicity. The finding of positive results in a plant bioassay of mutagenesis is coherent with previous reports about the mutagenic potential of urban particles employing bacterial and mammalian cell systems (Krishna et al., 1984; Whong et al., 1984; Athanasiou et al., 1986).

The observation that the mutagenic potential of ambient particles decreased when emissions generated

by buses were absent is indicative that a program aiming to reduce emissions of the bus fleet in our town may impact positively the air quality by reducing the mutagenic potential of ambient particles.

Before moving further in the discussion of our results, it is important to focus first on the limitations of our study. First, we took advantage of a natural experiment, i.e., the immobilization of a large fleet of buses. This means that we could not control for the experimental conditions or even reproduce them based on any protocol. Second, we had particles sampled in one location of our town, and we cannot be sure that the changes observed in the particles sampled by us are representative of the citywide condition. Finally, the amount of PM_{2.5} collected during the strike period was small, limiting the possibility of conducting a large series of toxicological analyses.

The identification of how representative our sample was with respect to other parts of the town was not possible, since gravimetric measurements of PM_{2.5} do not exist in São Paulo, meaning that there were no filters containing PM_{2.5} collected from other regions of our Metropolitan Area. In addition, the length of the strike was not long enough to allow repeated measurements of changes in composition and toxicity of PM_{2.5} collected in the course of the absence of operating buses. We decided to evaluate particles sampled on the 7th of April, when the strike was at its maximum, with virtually no buses operating in the town.

Even with the limited amount of material available to be evaluated, we insisted on having measurements of our sample including estimators of both its composition and its biological effects. We reasoned that by having data on these two perspectives, the strength of our results would increase, since both types of data provide complementary pieces of information.

The changes in particle composition are observed even when compared with a day with an almost equivalent mass concentration and with similar meteorological conditions. Our results indicate that, for the same mass of PM_{2.5}, changes in particle composition may alter its deleterious effects. This is an important topic and we think that our results reinforce the concept that particle speciation is necessary when dealing with health effects and control policies. Viewed only from the perspective of mass, one could conclude that control of the emissions of buses do not influence air pollution by fine particles. Indeed, PM_{2.5} levels on the day of the strike were high, above 40 µg/m³. This high level can be explained by the intense traffic jam that our town experienced with the lack of operating buses. São Paulo has a program that takes out of circulation 20% of the automotive fleet based on a rotation determined by the last digit of the vehicle license (numbers 1 and 2 do not run on Mondays, 3 and 4 on Tuesdays, etc.). During the

strike, all vehicles were allowed to circulate to compensate for the lack of public transportation. In addition, light duty diesel vehicles, such as vans, were also liberated to operate in São Paulo, helping people to get to their jobs. In fact, we are reporting the results of an event that stopped heavy-duty vehicles but increased the traffic of gasoline, ethanol, and light-duty diesel-fueled mobile sources.

Considering the small amount of material available, we decided to employ short-term higher plant bioassays to evaluate particle mutagenicity and toxicity. These assays allow one to evaluate a large number of individuals using low volumes of the test sample, and these assays possess high sensitivity. In fact, plant bioassays are ideally suited to perform short-term studies of mutagenesis, both in laboratory and in situ biomonitoring investigations (Ma, 1979, 1981; Ichikawa, 1981; Watts et al., 1989; Rodrigues et al., 1997; Batalha et al., 1999; Ferreira et al., 2000; Guimarães et al., 2000).

Among the mutagenesis tests based on plants, the TRAD-MN is considered perhaps the most sensitive (Ma, 1981; Watts et al., 1989). Briefly, the test is based on the visualization of segments of chromosomes as small round and dark structures (micronuclei) in early tetrads of pollen mother cells. The micronuclei represent the consequence of defects that occurred during chromosome meiotic replication of the pollen progenitor cells. After exposure to mutagenic agents, the frequency of micronuclei formation increases, allowing the determination of the degree of chromosomal damage during meiosis. Our *Tradescantia* system worked quite well, disclosing similar values of baseline frequency of micronuclei on two separate occasions, expressed similar increased values of micronuclei in very low doses of formaldehyde (Fig. 1), and exhibited a dose–response increase of micronuclei when exposed to PM_{2.5} collected on the nonstrike day.

We considered the inhibition of mitosis in root tips of *A. cepa* an estimator of cellular toxicity. Mitosis is very sensitive to the external environment and mitotic arrest is an event shared by dividing tissues when subjected to injury. The study of root tip dividing cells is considered a sensitive indicator of toxicity (Cotelle et al., 1999). Indeed, our system exhibited a marked reduction of mitotic rate for very low concentrations of formaldehyde, our positive control, and disclosed a dose–response reduction when facing increasing concentrations of PM_{2.5} extracts (Fig. 2).

Based on our results, the stopping of buses did not influence PM_{2.5} toxicity (or have a marginal effect) (Fig. 2) but changed its mutagenic potential (Fig. 1). We did not aim to explore the capacity of urban particles to contain substances that cause damage to DNA, since this observation is not new. However, we tested the hypothesis that a single source—the bus fleet of São

Paulo—influences particle mutagenic potential, in real world conditions.

We aimed not to demonstrate that diesel particles contain mutagenic substances but to determine whether the interruption of a single source has the potential to modify their mutagenic potential, in “real world” conditions. There are presently several technological options that may reduce dramatically the emissions of particles by heavy-duty diesel engines, for example, the use of other fuels such as ethanol or biodiesel, and the use of cleaner diesel and engine control technology may reduce particle emissions up to 200 times (McClellan, 1986). Because the aforementioned measures are costly, it is worth determining in advance the benefit of implementing strategies to achieve cleaner diesel emissions. We think that our study provides a solid argument in favor of directing policies to control the emissions of diesel buses. In a town that houses millions of mobile sources, the control of emissions of a few thousand of them seems to be a cost-effective procedure in a scenario of limited resources to invest in air pollution control.

References

- Athanasios, K., Viras, L.G., Siskos, P.A., 1986. Mutagenicity and polycyclic aromatic hydrocarbons analysis of ambient airborne particles collected in Athens, Greece. *Sci. Total Environ.* 52, 201–219.
- Batalha, J.R.F., Guimarães, E.T., Lobo, D.J.A., Lichtenfels, A.J.F.C., Deur, T., Carvalho, H.A., Alves, E.S., Domingos, M., Rodrigues, G.S., Saldiva, P.H.N., 1999. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the *Tradescantia* micronuclei assay. *Mutat. Res.* 426, 229–232.
- CETESB (State of São Paulo Company of Environmental Sanitation) 2002. Report of air quality in São Paulo, 2002.
- Cotelle, S., Masfaraud, J.F., Férard, J.F., 1999. Assessment of the genotoxicity of contaminated soil with the *Allium/Vicia* micronucleus and the *Tradescantia* micronucleus assays. *Mutat. Res.* 426, 167–171.
- Crebelli, R., 1989. Monitoring of urban pollution by mutagenicity assays. *Ann. Ist. Super. Sanità* 25, 591–594.
- Cury, P.M., Lichtenfels, A.J.F.C., Reymão, M.S.F., Conceição, G.M.S., Capellozi, V.L., Saldiva, P.H.N., 2000. Urban levels of air pollution modify the progression of urethane-induced lung tumors in mice. *Pathol. Res. Pract.* 196, 627–633.
- Farmer, P.B., Sepai, O., Lawrence, R., Autrup, H., Sabro Nielsen, P., Vestergaard, A.B., Wates, R., Leuratti, C., Jones, N.J., Stone, J., Baan, R.A., Van Delft, J.H.M., Steenwinkel, M.J.S.T., Kyrtopoulos, S.A., Souliotis, V.L., Theodorakopoulos, N., Bacalis, N.C., Natarajan, A.T., Bates, A.D., Haugen, A., Andreassen, A., Øvrebo, S., Shuker, D.E.G., Amaning, K.S.A., Schouft, A., Ellul, A., Garner, R.C., Dingley, K.H., Abbondandolo, A., Merlo, F., Cole, J., Aldrich, K., Beare, D., Capulas, E., Rowley, G., Waugh, A.P.W., Povey, A.C., Haque, K., Kirsch-Volders, M., Van Humelen, P., Castelain, P., 1996. Biomonitoring human exposure to environmental carcinogenic chemicals. *Mutagenesis* 11, 363–381.
- Ferreira, M.I., Petrenko, H., Lobo, D.J.A., Rodrigues, G.E., Moreira, A., Saldiva, P.H.N., 2000. In situ monitoring of the mutagenic effects of the gaseous emission of a soil waste incinerator in metropolitan São Paulo, Brazil, using the *Tradescantia* stamen-hair assay. *J. Air Waste Manage. Assoc.* 50, 1852–1856.
- Green, J.L., Laurie Pan, Y.H., Reed, C.A., 1991. Mutagenicity of benzo[a]pyrene bay-region sulfonates. *Carcinogenesis* 12 (7), 1359–1362.
- Guimarães, E.T., Domingos, M., Alves, E.S., Caldini Jr., N., Lobo, D.J.A., Lichtenfels, A.J.F.C., Saldiva, P.H.N., 2000. Detection of the genotoxicity of air pollutants in and around the city of São Paulo (Brazil) with the *Tradescantia*-micronucleus (Trad-MCN) assay. *Environ. Exp. Bot.* 44, 1–8.
- Hemminki, K., Pershagen, G., 1994. Cancer risk of air pollution: epidemiological evidence. *Environ. Health Perspect.* 102, 187–192.
- Ichikawa, S., 1981. In situ monitoring with *Tradescantia* around nuclear power plants. *Environ. Health Perspect.* 37, 145–164.
- Krishna, G., Nath, J., Ong, T., 1984. Correlative genotoxicity studies of airborne particles in *Salmonella typhimurium* and cultured human lymphocytes. *Environ. Mutagen.* 6 (4), 585–592.
- Lewtas, J., 1993. Complex mixtures of air pollutants: characterizing the cancer risk of polycyclic organic matter. *Environ. Health Perspect.* 100, 211–218.
- Ma, T.H., 1979. Micronuclei induced by X-rays and chemical mutagens in meiotic pollen mother cells of *Tradescantia*—a promising mutagen system. *Mutat. Res.* 64, 307–313.
- Ma, T.H., 1981. *Tradescantia* micronucleus bioassay and pollen tube aberration test for *in situ* monitoring and mutagen screening. *Environ. Health Perspect.* 37, 85–90.
- McClellan, R.O., 1986. Health effects of diesel exhaust: a case study in risk assessment. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 47, 1–13.
- Natush, D.F.S., 1978. Potentially carcinogenic species emitted to the atmosphere by fossil-fueled power plants. *Environ. Health Perspect.* 22, 79–90.
- Pope III, C.A., Burnett, R.T., Thun, M.J., Calle, E.E., Krewski, D., Ito, K., Thurston, G.D., 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *J. Am. Med. Assoc.* 287 (9), 1132–1141.
- Report on Carcinogens, 2002. Tenth Edition. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program, December.
- Reymão, M.S.F., Cury, P.M., Lichtenfels, A.J.F.C., Lemos, M., Battlehner, C.N., Conceição, G.M.S., Capellozi, V.L., Montes, G.S., Júnior, M.F., Martins, M.A., Böhm, G.M., Saldiva, P.H.N., 1997. Urban air pollution enhances the formation of urethane-induced lung tumours in mice. *Environ. Res.* 74, 150–158.
- Rodrigues, G.S., Ma, T.H., Pimentel, D., Weinstein, L.N., 1997. *Tradescantia* bioassays monitoring systems for environmental mutagenesis: a review. *Crit. Rev. Plant Sci.* 16, 325–359.
- Sato, M.I.Z., Valente, G.U., Coimbra, C.A., Coelho, M.C.L.S., Sanchez, P.S., Alonso, C.D., Martins, M.T., 1995a. Mutagenicity of airborne particulate organic material from urban and industrial areas of São Paulo, Brazil. *Mutat. Res.* 335, 317–330.
- Sato, M.I.Z., Valente, G.U., Coimbra, C.A., Coelho, M.C.L.S., Sanchez, P.S., Alonso, C.D., Martins, M.T., 1995b. Mutagenicity of airborne particulate organic material from urban and industrial areas of São Paulo, Brazil. *Mutat. Res.* 338, 51–57.
- Soares, S.R.C., Bueno-Guimarães, H.M., Ferreira, C.M., Rivero, D.H.R.F., De Castro, I., Garcia, M.L.B., Saldiva, P.H.N., 2003. Urban air pollution induces micronuclei in peripheral erythrocytes of mice *in vivo*. *Environ. Res.* 92, 191–196.
- Tomatis, L., 1990. Air Pollution and Human Cancer. Berlin, Springer.
- Tokiwa, H., Ohnishi, Y., 1986. Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* 17, 23–60.
- Watts, R., Fitzgerald, B., Hell, G., Garabedian, H., Williams, R., Warren, S., Franklin, L., Lewtas, J., 1989. Use of bioassay

- methods to evaluate mutagenicity of ambient air collected near a municipal waste combustor. *J. Air Pollut. Control Assoc.* 39, 1436–1439.
- Whong, W.Z., Stewart, J., Ong, T., 1984. Development of an in situ microbial mutagenicity test for airborne workplace mutagens: laboratory evaluation. *Mutat. Res.* 130 (1), 45–51.
- Zhou, W., Ye, S.-H., 1998. Effects of two new lubricants on the mutagenicity of scooter exhaust particulate matter. *Mutat. Res.* 414, 131–137.

Anti-oxidants reduce the acute adverse effects of residual oil fly ash on the frog palate mucociliary epithelium[☆]

Regiani Carvalho-Oliveira^a, Mitiko Saiki^b, Ruy C. Pires-Neto^a, Geraldo Lorenzi-Filho^c,
Mariangela Macchione^a, Paulo H.N. Saldiva^{a,*}

^aLaboratory of Experimental Air Pollution, Department of Pathology, University of São Paulo,
Av. Dr. Arnaldo 455, SP CEP01246-903 São Paulo, Brazil

^bDivision of Respiratory Diseases, Heart Institution (INCOR-HC), University of São Paulo, São Paulo, Brazil

^cSchool of Medicine and Institute of Energetic and Nuclear Research, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Received 13 May 2004; received in revised form 6 October 2004; accepted 14 October 2004

Available online 10 December 2004

Abstract

There is evidence indicating that oxidants play a pivotal role in determining air pollution-dependent lung injury. In the present study we explored the role of oxidants present in ambient particles in causing damage to the mucociliary epithelium. We explored the protective effects of pretreatment with three substances (*n*-propyl gallate, DL- α -tocopherol acetate, and EDTA) on the frog palate exposed to residual oil fly ash (ROFA). The parameters analyzed were mucociliary transport (MCT) and ciliary beating frequency (CBF) after 0, 10, 20, 30, 60, and 120 min of exposure. MCT was decreased significantly by ROFA ($P < 0.001$), with a significant interaction effect ($P = 0.02$) between the duration of exposure and treatment with antioxidants. The inhibitory effects on MCT of the substances tested were significantly different ($P = 0.002$); vitamin E was similar to control (Ringer) and different from all other groups. CBF showed no significant effect of duration of exposure ($P = 0.465$), but a significant interaction between duration of exposure and treatments was observed ($P = 0.011$). Significant differences were detected among treatments ($P < 0.001$), with ROFA and *n*-propyl gallate at concentrations of 50 μ M presenting a short-lived increase in CBF, which was not observed in the remaining groups. The results showed that both MCT and CBF were affected within a short period (100 min) of exposure to ROFA and that the presence of antioxidant substances, such as vitamin E (4 mg/mL) and *n*-propyl gallate (300 μ M), protected against the mucociliary impairment induced by ROFA on the frog palate.

© 2004 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Antioxidants; Ciliary beating frequency; Mucociliary transport; Residual oil fly ash

1. Introduction

Epidemiological studies have demonstrated that the inhalation of increased levels of particulate air pollution is associated with a decline in lung function, increased respiratory symptoms, and increased morbidity and mortality in susceptible populations (Dockery and Pope, 1994; Pope et al., 1995; Schwartz, 1994).

Ambient air contains a range of pollutants, the exact combination varying from one microenvironment to the next. Despite the variability in the composition of polluted atmospheres, there is clear evidence that ambient levels of air pollution trigger pulmonary and systemic inflammation (Koenig et al., 2003; Saldiva et al., 2002; Schwartz, 2001; Souza et al., 1998).

The mucociliary apparatus represents the first line of defense of the lungs against inhaled noxious agents by removing particles and chemical species from the airways by means of the continuous transport of the airway mucus to the oropharynx using the mechanical input provided by the coordinated beating of the cilia

[☆]This study was approved by the Ethics Committee of the School of Medicine, University of São Paulo.

*Corresponding author. Fax: +55 11 3968 9972.

E-mail address: pepino@usp.br (P.H.N. Saldiva).

(Macchione et al., 1998, 1999; Rivero et al., 2001). In this context, the mucociliary apparatus represents a point of important interaction between the defenses of the organism and inhaled toxicants, and the result of such contact influences the development of the adverse respiratory effects promoted by air pollution.

Several lines of evidence indicate that oxidants play a pivotal role in determining air pollution-dependent lung injury (Kelly, 2003). Ambient particles are able to induce oxidative stress in biological systems, either directly by the presence of oxidant substances adsorbed onto their surface or by the existence of soluble metals, including transition metals, that are capable of redox cycling (Li et al., 1996). Exposure of phagocytic cells to ambient particles collected from different urban settings causes oxidative stress that correlates with the iron content of the particles (Costa and Dreher, 1997).

We have previously shown that the frog palate preparation is an efficient experimental tool to assess the deleterious effects of oxidant stress on the ciliated epithelium (Macchione et al., 1998). In this experimental system, ambient particles were shown to induce impairment of mucociliary transport (MCT) as well as the depletion of antioxidant defenses (Macchione et al., 1999). In the present study we decided to further explore the role of oxidants present in particles in damaging the mucociliary epithelium by investigating the protective effects of pretreatment with three substances, two of them of known antioxidant capability (*n*-propyl gallate and DL- α -tocopherol acetate) and one a metal chelator (EDTA), on the frog palate exposed to residual oil fly ash (ROFA).

2. Materials and methods

2.1. Characterization of ROFA

ROFA was collected from the electrostatic precipitator of a steel plant. Trace analysis (As, Br, Ca, Co, Cr, Cs, Fe, Hf, Rb, Sb, Sc, Se, Th, U, Zn, La, Ce, Nd, Sm) was carried out by neutron activation (Table 1). The ROFA solution was obtained by ultrasonication (50 min) in Ringer solution mixed with distilled water at a 1:1 proportion to adapt its osmolarity for use in the frog palate.

2.2. Frog palate preparation

Mature frogs (*Rana catesbiana*) weighing approximately 100 g were obtained from the Mogi das Cruzes City vivarium. In our laboratory the animals received a balanced diet and water ad libitum according to routine veterinary procedures until the time for sacrifice.

Using hypothermia as anesthesia, the frogs were rapidly decapitated, their jaws were disarticulated, and

Table 1

Concentrations of trace elements in ROFA determined by neutron activation analysis ($\mu\text{g/g}$, *Ca, Fe%)

Element	ROFA (SD)
As	61.0 $\pm$ 1.0
Br	1482 $\pm$ 19.0
Ca*	5.42 $\pm$ 0.16
Co	9.96 $\pm$ 0.25
Cr	107.7 $\pm$ 1.4
Cs	9.96 $\pm$ 0.25
Fe*	44.6 $\pm$ 0.1
Hf	0.62 $\pm$ 0.07
Rb	719.7 $\pm$ 1.0
Sb	2.27 $\pm$ 1.0
Sc	1.91 $\pm$ 0.01
Se	154.91 $\pm$ 0.8
Th	1.50 $\pm$ 0.06
U	2.28 $\pm$ 0.14
Zn	491.9 $\pm$ 3.1
La	10.3 $\pm$ 0.1
Ce	16.3 $\pm$ 0.3
Nd	9.3 $\pm$ 1.6
Sm	2.30 $\pm$ 0.07

the palates were removed by cutting through from the junction of the posterior pharynx and esophagus to the skin of the back. The excised palates were placed on a piece of gauze saturated with Ringer. The palates were placed on a dish loosely covered with plastic wrap and allowed to stand in a refrigerator at 4 °C for 2 days (Rubin, 1999). On the third day mucus samples were collected from the posterior edge of the palates with a needle and immediately immersed in mineral oil to prevent dehydration. All experiments were performed on the third day. Under these experimental conditions the ciliary activity is maintained (Macchione et al., 1998).

2.3. In vitro mucociliary transport

MCT was determined by measuring the rate of displacement of autologous mucus samples placed on the epithelial surface of the frog palate using a stereoscopic microscopic equipped with a reticulated eyepiece. MCT was calculated by dividing the distance traveled (6 mm) by the elapsed time (s). At least five measurements were made for each dose and duration of the study. The mucus samples were rinsed with petroleum ether to remove the oil prior to their placement on the surface of the palate. The experiments were carried out at room temperature (20 °C). During the measurements of the MCT the frog palate was kept inside an acrylic chamber, with a microenvironment of 100% humidity provided by ultrasonic nebulization of standard Ringer solution (Macchione et al., 1998).

2.4. Ciliary beating frequency

Ciliary beating frequency (CBF) was measured by a modification of the videoscopic technique described by Braga (1988). Briefly, the technique consists of focusing on a group of cilia through a light microscope ($10\times$ objective, $10\times$ eyepiece) connected to a video camera (Sony, Model 3CCD Iris), with the resulting image being sent to a monitor (Sony Trinitron). A stroboscopic light (Machine Vision Strobe, Model 5000, USA) is placed in front of the ciliary epithelium and emits flashes (0–30 Hz). The incident light illuminating the ciliated epithelium is reflected from the cilia packed together and from the thin layer of mucus covering the cilia. This reflection is cyclic, because its direction changes according to the movements of the underlying cilia. By manual control it is possible to define the frequency of ciliary activity when it is the same as the flash frequency and the observer cannot distinguish the ciliary beat.

2.5. Experimental design

Sixty frog palates were submitted to nebulization with Ringer solution for 50 min. After this period, measurements of baseline MCT and CBF were performed. After the baseline determinations, the palates were assigned to six groups and immersed in the following test solutions: negative control, (Ringer group, $n = 10$), $50\mu\text{M}$ *n*-propyl gallate (propyl 50 group, $n = 10$), $300\mu\text{M}$ *n*-propyl gallate (propyl 300 group, $n = 10$), EDTA (EDTA group, $75\text{ g}/1000\text{ g}$ body wt, $n = 10$), vitamin E (vit E group, $4\text{ mg}/\text{mL}$, $n = 10$), and ROFA (ROFA group, $1\text{ mg}/\text{mL}$, $n = 09$). For the propyl 50, propyl 300, EDTA, and vit E groups, additional measurements were performed 10 and 20 min after the palates were transferred to the Ringer solution containing the antioxidant substances. The negative control and ROFA groups were also measured at the same experimental times, but were kept in Ringer solution. This new set of measurements was designed to determine the influence of antioxidants on the parameters of interest, whereas the negative control and ROFA groups gave information about the stability of our measurements when palates submitted to nebulization were transferred to an aqueous medium. After these new baseline determinations, all groups, except the negative control, were transferred to Ringer solution containing ROFA ($1\text{ mg}/\text{mL}$), and CBF and MCT were then determined after 10, 30, and 60 min of exposition to ROFA.

Thus, we made measurements at 10 and 20 min (Ringer or pretreatment with antioxidants) and then at 30 (10 min of exposure to ROFA), 60 (30 min of exposure to ROFA), and 120 min (100 min of exposure to ROFA). Schematic representation of the experimental design is shown in Fig. 1.

Fig. 1. Schematic representation of the experimental protocol. Pretreatment was performed with Ringer, *n*-propyl gallate (50 and $300\mu\text{M}$), EDTA, and vitamin E. Arrows represent the time of MCT and CBF measurements.

2.6. Statistical analysis

The statistical analysis of the results of MCT and CBF was performed using general linear models for repeated measurements containing categorical indicators of treatment as well as a term for duration and treatment interaction. Post hoc tests were also employed (least significant difference) for multiple comparisons. The level of significance was set at 5%. Statistical analyses were performed with the aid of the SPSS v10.0 computer package.

3. Results

Table 2 presents the descriptive statistics of the measurements of MCT determined for all experimental durations and treatments. The same data are depicted graphically in Fig. 2. Exposure to ROFA induced a decrease of MCT, which increased with duration of exposure ($P < 0.001$). The effects of duration of exposure exhibited a significant interaction with the treatments employed ($P = 0.02$). The effects on MCT of the substances tested were significantly different ($P = 0.002$), with the effects of Ringer and vitamin E differing from those of the other groups.

Table 3 and Fig. 3 present the results obtained in terms of CBF measurements. Exposure to ROFA induced a decrease of CBF, which started after 10 min of exposure (Time 30) and lasted until the end (Time 120) of our measurements ($P = 0.011$). This decrease was affected by the different treatments employed ($P < 0.001$), with ROFA and propyl 50 differing from the remaining groups.

4. Discussion

The contribution of air pollution to the severity of respiratory diseases has been repeatedly reported in both epidemiological (Abbey et al., 1995; Pope et al., 2002)

Table 2
Descriptive statistics of mucociliary transport (mm/s) for all experimental groups

	Time (min)	Mean	SEM	95% Confidence interval	
				Lower bound	Upper bound
ROFA pretreatment	0	0.53	0.41	0.45	0.62
	10	0.47	0.30	0.41	0.53
	20	0.46	0.03	0.40	0.52
ROFA	30	0.42	0.035	0.35	0.48
	60	0.35	0.04	0.28	0.42
	120	0.24	0.04	0.17	0.32
Propyl 50 pretreatment	0	0.49	0.04	0.41	0.57
	10	0.47	0.03	0.41	0.53
	20	0.45	0.03	0.39	0.51
ROFA	30	0.44	0.03	0.37	0.50
	60	0.41	0.03	0.34	0.47
	120	0.32	0.04	0.25	0.39
Propyl 300 pretreatment	0	0.47	0.04	0.39	0.55
	10	0.43	0.03	0.37	0.48
	20	0.43	0.29	0.37	0.49
ROFA	30	0.47	0.03	0.41	0.54
	60	0.39	0.03	0.32	0.45
	120	0.31	0.04	0.24	0.38
EDTA pretreatment	0	0.49	0.04	0.42	0.57
	10	0.42	0.03	0.37	0.48
	20	0.41	0.03	0.35	0.47
ROFA	30	0.44	0.03	0.37	0.50
	60	0.39	0.03	0.32	0.45
	120	0.33	0.03	0.26	0.40
Vit E pretreatment	0	0.48	0.04	0.41	0.56
	10	0.53	0.03	0.47	0.59
	20	0.49	0.03	0.43	0.55
ROFA	30	0.58	0.03	0.51	0.64
	60	0.42	0.03	0.36	0.49
	120	0.41	0.04	0.33	0.48
Ringer pretreatment	0	0.57	0.04	0.49	0.64
	10	0.56	0.03	0.50	0.61
	20	0.55	0.03	0.49	0.61
ROFA	30	0.53	0.03	0.46	0.59
	60	0.42	0.03	0.46	0.59
	120	0.51	0.04	0.44	0.59

and experimental studies (Cendon et al., 1997; Lemos et al., 1994; Reymão et al., 1997; Saldiva et al., 1992). Particulate air pollution has been reported to contribute to pulmonary disease in many studies because it contains a higher proportion of various toxic metals and acid sulfur species (Pope et al., 1991). There is now a substantial body of evidence showing that oxidative stress mediated by metals is a major contributor to the toxic effects of the particulate air pollution on the

Fig. 2. Box plot representing the values of MCT (in mm/s) determined for all experimental treatments and times 20, 30, 60, and 120. Abbreviations used: MCT, mucociliary transport; ROFA, residual oil fly ash; propyl 50, *n*-propyl gallate 50 μ M; propyl 300, *n*-propyl gallate 300 μ M; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; vit E, DL- α -tocopherol acetate.

respiratory apparatus (Kelly, 2003). Experimental studies have demonstrated that exposure to ROFA is highly toxic to the lungs (Dreher et al., 1997) and that ROFA extracts are able to induce oxidative stress and inflammation in pulmonary tissue (Costa and Dreher, 1997; Kadiiska et al., 1997).

In previous studies, we demonstrated that the frog palate is affected by levels of oxidants in the range expected to occur in the inflammatory milieu (Macchione et al., 1998). In the presence of ambient particles, we observed evidence of impaired mucociliary function, as well as depletion of antioxidant defenses, suggesting that oxidative stress plays a role in mucociliary dysfunction. We reasoned that if the oxidant damage was the main factor responsible for the mucociliary dysfunction observed in our previous studies, this dysfunction should be abolished or diminished when antioxidant substances are added to the model. Our data showed that both MCT (Table 2) and CBF (Table 3) were impaired after a short exposure to ROFA. Similar effects have been observed in our laboratory in the same model exposed to H_2O_2 and PM_{10} (Macchione et al., 1998, 1999). The capacity of ROFA to cause lung injury is remarkable in animal models (Pritchard et al., 1996; Norwood et al., 2001; Ghio et al., 2002a, b). Since ROFA is rich in metals, with few organic components, it has been particularly useful as a surrogate for testing the hypothesis that metals mediate the biological effects of air pollution particles (Ghio et al., 2002a, b).

Our results showed that the presence of antioxidant substances, such as vitamin E, and also of the higher

Table 3
Descriptive statistics of ciliary beating frequency (Hz) for all experimental groups

	Time (min)	Mean	SEM	95% Confidence interval	
				Lower bound	Upper bound
ROFA pretreatment	0	14.78	0.58	13.63	15.94
	10	16.36	0.44	15.48	17.23
	20	16.10	0.53	15.03	17.16
ROFA	30	14.16	0.40	13.37	14.96
	60	14.76	0.39	13.98	15.55
	120	14.59	0.43	13.72	15.46
Propyl 50 pretreatment	0	15.57	0.55	14.47	16.67
	10	15.93	0.42	15.09	16.76
	20	16.26	0.50	15.25	17.27
ROFA	30	16.98	0.38	16.23	17.74
	60	15.98	0.37	15.23	16.73
	120	15.59	0.41	14.77	16.42
Propyl 300 pretreatment	0	14.58	0.55	13.48	15.67
	10	13.58	0.42	12.74	14.41
	20	13.92	0.50	12.91	14.93
ROFA	30	14.12	0.38	13.36	14.87
	60	15.24	0.37	14.50	15.99
	120	14.81	0.41	13.98	15.63
EDTA pretreatment	0	13.84	0.52	12.88	14.88
	10	14.42	0.40	13.62	15.21
	20	14.23	0.48	13.27	15.20
ROFA	30	14.65	0.36	13.93	15.37
	60	14.10	0.36	13.39	14.81
	120	14.92	0.39	14.13	15.70
Vit E pretreatment	0	13.48	0.55	12.75	14.94
	10	14.56	0.42	13.72	15.39
	20	14.56	0.50	13.55	15.57
ROFA	30	15.41	0.38	14.67	16.16
	60	14.86	0.37	14.12	15.61
	120	14.65	0.41	13.83	15.48
Ringer pretreatment	0	14.48	0.55	13.39	15.58
	10	14.31	0.42	13.48	15.15
	20	14.05	0.50	13.31	15.06
ROFA	30	13.74	0.38	12.98	14.49
	60	13.78	0.37	13.03	14.53
	120	13.95	0.41	13.13	14.78

dosage of *n*-propyl gallate protects against the mucociliary impairment induced by ROFA. These findings support the concept that the mechanisms involved in mucociliary impairment are at least in part mediated by oxidative stress.

Although the results obtained in this acute investigation are in agreement with many experimental studies showing that oxidative stress is an important mechanism of injury on the airway epithelium

Fig. 3. Box plot representing the values of CBF (in Hz) determined for all experimental treatments and times 20, 30, 60, and 120. Abbreviations used: CBF, ciliary beating frequency; ROFA, residual oil fly ash; propyl 50, *n*-propyl gallate 50 μ M; propyl 300, *n*-propyl gallate 300 μ M; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; vit E, DL- α -tocopherol acetate.

(Costa and Dreher, 1997; Kadiiska et al., 1997; Li et al., 1996; Macchione et al., 1999), the extrapolation of these experimental data to the field of ambient conditions is difficult. First, ROFA is probably a much more potent toxic agent than regular ambient aerosol (Ghio et al., 2002a,b). Second, the dose of inhaled particles after dilution in the microenvironment surrounding the respiratory epithelium in vivo does not correspond to that employed in our investigation. The first interface that a pollutant encounters when it enters the airway is the lung-lining fluid. This fluid consists of secretions from the underlying lung and resident immune cells, as well as plasma-derived substances. Studies with bronchoalveolar lavage have shown that lung-lining fluid contains a range of low-molecular-weight antioxidants similar to that of blood plasma, including reduced glutathione, ascorbic acid, uric acid, and α -tocopherol (vitamin E) (Kelly, 2003). Despite the limitations, the demonstration that antioxidants inhibit the acute, deleterious effects of ROFA on the mucociliary system reinforces the concept that oxidants play a role in determining respiratory effects induced by particles produced by oil combustion.

Acknowledgments

This work was made possible by the financial support of CNPq (Brazilian Council of Research) and LIM-HCFMUSP (Institute of the Laboratories of Medical Investigation, Clinical Hospital, School of Medicine, University of São Paulo).

References

- Abbey, D.E., Hwang, B.L., Burchette, R.J., Vancuren, T., Mills, K.P., 1995. Estimated long-term ambient concentrations of PM₁₀ and development of respiratory symptoms in a nonsmoking population. *Arch. Environ. Health* 50, 139–151.
- Braga, P.C., 1988. In vivo observation and counting methods for ciliary motion. In: Braga, P.C., Allegra, L. (Eds.), *Methods in Bronchial Mucology*. Raven Press, New York, pp. 269–276.
- Cendon, S.P., Battlehner, C., Lorenzi, G.F., Dohnikoff, M., Pereira, P.M., Conceição, G.M., Beppu, O.S., Saldiva, P.H.N., 1997. Pulmonary emphysema induced by passive smoke: an experimental study in rats. *Braz. J. Med. Res.* 30 (10), 1241–1247.
- Costa, D.L., Dreher, K.L., 1997. Bioavailable transition metals in particulate matter mediate cardiopulmonary injury in healthy and compromised animal models. *Environ. Health Perspect.* 105 (Suppl. 5), 1053–1060.
- Dockery, D.W., Pope, C.A., 1994. Acute respiratory effects of particulate air pollution. *Annu. Rev. Public Health* 15, 107–132.
- Dreher, K.L., Jaskot, R.H., Lehmann, J.R., Richards, J.H., McGee, J.K., Ghio, A.J., 1997. Soluble transition metals mediate residual oil fly ash-induced acute lung injury. *J. Toxicol. Environ. Health* 50, 285–305.
- Ghio, A.J., Silbajoris, R., Carson, J.L., Samet, J.M., 2002a. Biologic effects of oil fly ash. *Environ. Health Perspect.* 110 (Suppl. 1), 89–102.
- Ghio, A.J., Suliman, H.B., Carter, J.D., Abushama, A.M., Folz, R.J., 2002b. Overexpression of extracellular superoxide dismutase decreases lung injury after exposure to oil fly ash. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 283, L211–L218.
- Kadiiska, M.B., Mason, R.P., Dreher, K.L., Costa, D.L., Ghio, A.J., 1997. In vivo evidence of free radical formation in the rat lung after exposure to an emission source air pollution particle. *Chem. Res. Toxicol.* 10 (10), 1104–1108.
- Kelly, F.J., 2003. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. *Occup. Environ. Med.* 60 (8), 612–616.
- Koenig, J.Q., Jansen, K., Mart, T.F., Lumley, T., Kaufman, J., Trenga, C.A., Sullivan, J., Liu, L.J.S., Shapiro, G.G., Larson, T.V., 2003. Measurement of offline exhaled nitric oxide in a study of community exposure to air pollution. *Environ. Health Perspect.* 111, 1625–1629.
- Lemos, M., Lichtenfels, A.J.F., Amaro, E., Macchione, M., Martins, M.A., King, M., Böhm, G.M., Saldiva, P.H.N., 1994. Quantitative pathology of nasal passages in rats exposed to urban levels of air pollution. *Environ. Res.* 66, 96–101.
- Li, X.Y., Gilmour, P.S., Donaldson, K., MacNee, W., 1996. Free radical activity and pro-inflammatory effects of particulate air pollution (PM₁₀) in vivo and in vitro. *Thorax* 51, 1216–1222.
- Macchione, M., Lorenzi-Filho, G., Guimaraes, E.T., Junqueira, V.B., Saldiva, P.H., 1998. The use of the frog palate preparation to assess the effects of oxidants on ciliated epithelium. *Free Radical Biol. Med.* 24 (5), 714–721.
- Macchione, M., Oliveira, A.P., Gallafrio, C.T., Muchão, F.P., Obara, M.T., Guimaraes, E.T., Artaxo, P., King, M., Lorenzi-Filho, G., Junqueira, V.C., Saldiva, P.H., 1999. Acute effects of inhalable particles on the frog palate mucociliary epithelium. *Environ. Health Perspect.* 107 (10), 829–833.
- Norwood Jr., J., Ledbetter, A.D., Doerfler, D.L., Hatch, G.E., 2001. Residual oil fly ash inhalation in guinea pigs: influence of absorbate and glutathione depletion. *Toxicol. Sci.* 61, 144–153.
- Pope III, C.A., Dockery, D.W., Spengler, J.D., Raizenne, M.E., 1991. Respiratory health and PM₁₀ pollution. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144, 668–674.
- Pope, C.A., Dockery, D.W., Schwartz, J., 1995. Review of epidemiological evidence of health effects of particulate air pollution. *Inhal. Toxicol.* 7, 1–18.
- Pope III, C.A., Burnett, R.T., Thun, M.J., Calle, E.E., Krewski, D., Ito, K., Thurston, G., 2002. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long term exposure to fine particulate air pollution. *J. Am. Med. Assoc.* 287 (9), 1132–1141.
- Pritchard, R.J., Ghio, A.J., Lehmann, J.R., Winset, D.W., Tepper, J.S., Park, P., Gilmour, M.I., Dreher, K.L., Costa, D.L., 1996. Oxidant generation and lung injury after particulate air pollution exposure increase with the concentrations of associated metals. *Inhal. Toxicol.* 8, 457–477.
- Reymão, M.S.F., Cury, P.M., Lichtenfels, A.J.F., Lemos, M., Battlehner, C.N., Conceição, G.M.S., Capelozzi, V.L., Montes, G.S., Júnior, M.F., Martins, M.A., Böhm, G.M., Saldiva, P.H.N., 1997. Urban air pollution enhances the formation of urethane-induced lung tumors in mice. *Environ. Res.* 74, 150–158.
- Rivero, D.H., Lorenzi-Filho, G., Pazetti, R., Jatene, F.B., Saldiva, P.H., 2001. Effects of bronchial transection and reanastomosis on mucociliary system. *Chest* 119 (5), 1510–1515.
- Rubin, B.K., 1999. An in vitro comparison of the mucoactive properties of guaifenesin, iodinated glycerol, surfactant, and albuterol. *Am. Coll. Chest Physicians* 116, 195–200.
- Saldiva, P.H., Clarke, R.W., Coull, B.A., Stearns, R.C., Lawrence, J., Murthy, G.G., Dias, E., Koutrakis, P., Suh, H., Tsuda, A., Godleski, J.J., 2002. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 165 (12), 1610–1617.
- Saldiva, P.H.N., King, M., Delmonte, V.L.C., Macchione, M., Parada, M.A.C., Deliberto, M.L., Sakae, R.S., Criado, P.M.P., Silveria, P.L.P., Zin, W.A., Böhm, G.M., 1992. Respiratory alterations due to urban air pollution: an experimental study in rats. *Environ. Res.* 57, 19–33.
- Schwartz, J., 1994. Air pollution and daily mortality: a review and meta analysis. *Environ. Res.* 64, 36–52.
- Schwartz, J., 2001. Air pollution and blood markers of cardiovascular risk. *Environ. Health Perspect.* 109 (Suppl. 3), 405–409.
- Souza, M.B., Saldiva, P.H., Pope III, C.A., Capelozzi, V.L., 1998. Respiratory changes due to long-term exposure to urban levels of air pollution: a histopathologic study in humans. *Chest* 113 (5), 1312–1318.