

Cristiane Degobbi Coelho

**Análise dos contaminantes biológicos presentes
no material particulado (PM_{2,5}) de amostras da
região metropolitana de São Paulo**

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

Área de concentração: Patologia
Orientador: Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento
Saldiva

São Paulo
2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Cristiane Degobbi Coelho

**Análise dos contaminantes biológicos presentes
no material particulado (PM_{2,5}) de amostras da
região metropolitana de São Paulo**

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

Área de concentração: Patologia
Orientador: Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento
Saldiva

São Paulo
2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Coelho, Cristiane Degobbi

Análise dos contaminantes biológicos presentes no material particulado (PM_{2,5})
de amostras da região metropolitana de São Paulo / Cristiane Degobbi Coelho. --
São Paulo, 2009.

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

Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia.

Orientador: Paulo Hilário Nascimento Saldiva.

Descritores: 1.Poluição do ar 2.Fungos 3.Endotoxinas 4.Material particulado
5.Inflamação 6.Interleucinas

USP/FM/SBD-191/09

*Aos queridos Gisleine,
Fernando, Priscila e Danilo,
pelo apoio nesses anos.*

Agradecimentos

Ao Professor Paulo Hilário Nascimento Saldiva, meu orientador e, certamente, umas das pessoas mais inteligentes e generosas que já conheci. Obrigada pelas idéias e conselhos valiosos que me incentivaram a terminar a tese e que continuarão a me impulsionar no futuro.

Ao Professor Walderez Gambale, uma grande referência para mim em fungos contaminantes. Obrigada por abrir as portas do laboratório e por incentivar os trabalhos feitos e ainda a serem realizados na área.

À Adriana, minha mentora no laboratório de Micologia. Obrigada por ter sido uma ótima professora, além de amiga.

Ao Maurinho, por estar sempre pronto a ajudar e transmitir seus conhecimentos, que mais parecem os de um livro completo de Micologia.

À Professora Claudete, Georgea, Ériques, Luciana, Mineiro, Débora, Satiko, Fabiana, Fernanda e todos que passaram pelo Laboratório de Micologia, por me considerarem como parte da equipe. Trabalhar ao lado de vocês realmente tornou o projeto mais prazeroso.

A todos do laboratório do laboratório de Fungos Patogênicos, em especial ao Julian, por ter me auxiliado no projeto e me inspirado pela garra como pesquisador.

Ao pessoal do LIM05 que torceu pelo projeto, especialmente:

À Regiani, pelo auxílio no projeto. Além de ter sido uma ótima conselheira, mostrou-se um exemplo a ser seguido pelo trabalho em equipe;

À Dolores, pelo auxílio e conselhos no final da tese.

Ao laboratório do Departamento de Ciências Atmosféricas USP/IAG/ACA, pelo fornecimento de dados meteorológicos.

Ao pessoal do LIM20, especialmente:

À minha prima Fernanda, que me apresentou o laboratório e esteve presente em todos os momentos que precisei. Obrigada pelos auxílios no projeto, intelectuais e, porque não, espirituais.

À Fernanda Arantes, pelo auxílio no projeto e pelas colocações divertidas, indispensáveis no final da tese.

Ao Davi e Luis do biotério. Sem vocês os experimentos com animais teriam sido inviáveis.

Aos meus pais Gisleine e Fernando e irmã Priscila por serem meu porto seguro e por torcerem sempre.

Ao meu marido Danilo, pelo apoio, pelos ensinamentos e conselhos. Obrigada pelas lições de vida.

Aos meus amigos de fora do laboratório, que sempre torceram pelo projeto.

Sumário

Lista de Abreviaturas e siglas	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Resumo	
Summary	
Introdução	1
- <i>Poluição atmosférica e material particulado</i>	1
- <i>PM 2,5 e composição química</i>	5
- <i>Concentrador de partículas</i>	8
- <i>Componentes biológicos</i>	9
Endotoxina e resposta inflamatória	10
Endotoxina associada ao material particulado urbano e a partículas ambientais concentradas	11
Fungos - caracterização e relação com fatores abióticos	17
Fungos, material particulado e poluição	25
- <i>Influência dos elementos químicos nos contaminantes biológicos</i>	27
- <i>Metodologias para análise de fungos e bactérias</i>	29
Técnicas para identificação de biomassa total – bactérias	30
Técnicas para identificação de esporos e biomassa total – fungos	31
Objetivos	36
Métodos	38
- <i>1º parte - Boston</i>	38
Área de estudo	38
Identificação dos fungos anemófilos	42
Análise estatística	44
- <i>2º parte: São Paulo</i>	44
Amostrador de ar AVG	44
Localização das amostras	45
Amostras de endotoxinas	46
Amostras de material particulado	51
Dados meteorológicos	52
Extração do PM _{2,5} a partir de filtros de fibra de vidro	52
Inibição de endotoxinas na amostra	53
Desenho experimental	54
Lavado broncoalveolar	55
Análise de citocinas	57
Análise estatística	58
Resultados	59
<i>Resultados Boston</i>	59
<i>Resultados São Paulo</i>	73

Discussão	91
- <i>Discussão resultados São Paulo</i>	95
Conclusões	110
- <i>Conclusões Boston</i>	110
- <i>Conclusões São Paulo</i>	111
Referências	112

Lista de Figuras

Figura 1 - Distribuição percentual da qualidade do ar na Região Metropolitana de São Paulo. Fonte: CETESB, 2008 -----	3
Figura 2 - Endotoxina - um potente agente inflamatório presente na parede celular de bactérias gram-negativas -----	10
Figura 3 - Produção de anticorpos específicos para ovalbumina por cobaias expostas a ovalbumina, ovalbumina+glucanos, ovalbumina+endotoxina, ovalbumina+endotoxinas+glucanos -----	25
Figura 4 - Fotomicrografia de esporos fúngicos (demarcados em “b” e “c”) na atmosfera de Brisbane-----	28
Figura 5 - Disposição dos amostradores de ar no telhado da Universidade de Harvard -----	38
Figura 6 - As coletas a partir de amostrador de ar para PM _{2,5} e portas desviadas para caracterização do PM _{2,5} , fungos e endotoxina. O filtro de fibra de vidro foi utilizado para modelo de instilação em animais -----	45
Figura 7 - Câmara de armazenamento de filtros de policarbonato a 4°C para análise de endotoxinas -----	47
Figura 8 - Cascata enzimática ocorrida no teste LAL para detecção de endotoxinas -----	49
Figura 9 - Método de contagem de esporos fúngicos em câmara de Neubauer após extração a partir filtros de fibra de vidro -----	53
Figura 10 - Instilação de fungos e material particulado em ratos machos Wistar-----	55
Figura 11 - Método de contagem de leucócitos em câmara de Neubauer a partir de suspensão do lavado broncoalveolar -----	56
Figura 12 - Concentração de fungos coletados pelo amostrador de ar Andersen em período de 5 horas durante a primavera e verão na cidade de Boston, MA -- -----	63

Figura 13 - Concentração de fungos coletados pelo amostrador de ar Personal Burkard em período de 5 horas durante a primavera e verão na cidade de Boston, MA -----	64
Figura 14 - Concentrações de esporos fúngicos coletados pelo amostradores de ar Recording Burkard e filtros MCE durante primavera e verão na cidade de Boston, MA -----	68
Figura 15 - Concentrações de fungos coletados através de cultura e contagem total de esporos em filtros MCE na cidade de Boston, MA -----	71
Figura 16 - Regressão de Pen/Asp versus umidade relativa na cidade de São Paulo -----	75
Figura 17 - Regressão de <i>Cladosporium sp</i> versus umidade relativa na cidade de São Paulo -----	75
Figura 18 - Regressão de Ascósporos sem pigmentação versus umidade relativa na cidade de São Paulo -----	76
Figura 19 – Regressão da contagem total de fungos versus umidade relativa na cidade de São Paulo -----	77
Figura 20 – Regressão de PM _{2,5} versus umidade relativa na cidade de São Paulo -----	79
Figura 21 – Modelo de regressão entre contagem total de fungos versus o fator 1 na cidade de São Paulo -----	81
Figura 22 – Modelo de regressão dos gêneros Pen/Asp versus massa de PM _{2,5} na cidade de São Paulo -----	82
Figura 23 – Modelo de regressão do gênero <i>Cladosporium</i> versus o fator 1 na cidade de São Paulo -----	83
Figura 24 – Modelo de regressão de basidiósporos hialinos versus o fator 1 na cidade de São Paulo -----	84
Figura 25 – Modelo de regressão de endotoxinas versus temperatura atmosférica na cidade de São Paulo -----	85
Figura 26 – Contagem total de leucócitos a partir do lavado dos grupos A, B e C -----	86

Figura 27 – Contagem macrófagos a partir do lavado dos grupos A, B e C ---	87
Figura 28 – Contagem linfócitos a partir do lavado dos grupos A, B e C -----	87
Figura 29 – Contagem eosinófilos a partir do lavado dos grupos A, B e C ----	88
Figura 30 – Contagem neutrófilos a partir do lavado dos grupos A, B e C -----	88
Figura 31- Concentração de IFN a partir do lavado dos grupos A (100 µg de PM _{2,5} ; 21x10 ⁴ esporos/mL), B (100 µg de PM _{2,5} ; 60x10 ⁴ esporos/mL) e C (filtro branco)-----	89
Figura 32- Concentração de TNF a partir do lavado dos grupos A (100 µg de PM _{2,5} ; 21x10 ⁴ esporos/mL), B (100 µg de PM _{2,5} ; 60x10 ⁴ esporos/mL) e C (filtro branco)-----	89
Figura 33- Concentração de IL-6 a partir do lavado dos grupos A (100 µg de PM _{2,5} ; 21x10 ⁴ esporos/mL), B (100 µg de PM _{2,5} ; 60x10 ⁴ esporos/mL) e C (filtro branco)-----	90
Figura 34- Concentração de IL-4 a partir do lavado dos grupos A (100 µg de PM _{2,5} ; 21x10 ⁴ esporos/mL), B (100 µg de PM _{2,5} ; 60x10 ⁴ esporos/mL) e C (filtro branco)-----	90

Lista de tabelas

Tabela 1- Resultados de estudos de efeitos sinérgicos de endotoxina associada ao material particulado -----	13
Tabela 2 - Métodos para amostragem de esporos-----	31
Tabela 3 - Análise de amostras de fungos de acordo com método de coleta--	32
Tabela 4 – Métodos de extração de ergosterol e (1-->3)-β-D-Glucano -----	33
Tabela 5 - Layout de distribuição de amostras para detecção de endotoxinas nas placas -----	50
Tabela 6 - Fungos encontrados no Concentrador de Partículas antes da concentração (“upstream”) e depois da concentração (“downstream”) a partir de metodologias de cultura e contagem total -----	60
Tabela 7 - Gêneros e grupos encontrados a partir de amostradores de ar de curta duração Andersen e Personal Burkard na cidade de Boston, MA -----	65
Tabela 8 - Gêneros e grupos encontrados a partir de amostradores de ar de longa duração Recording Burkard e filtros MCE na cidade de Boston, MA ----	69
Tabela 9 - Gêneros e grupos encontrados a partir de filtros MCE (cultura e contagens totais de esporos) na cidade de Boston, MA -----	72
Tabela 10 - Principais gêneros ou grupos encontrados a partir de filtros MCE na cidade de São Paulo -----	78
Tabela 11 – Modelos de Regressão Linear Múltipla entre fungos, umidade, temperatura, massa de PM _{2,5} e componentes principais na cidade de São Paulo- -----	84
Tabela 12 –Comparação entre os principais gêneros de fungos encontrados na cidade de São Paulo e dados de outros estudos -----	98

Lista de abreviaturas e siglas

Al – Alumínio

As- Arsênio

Ba – Bário

Br – Bromo

CAPs- Concentrated Ambient Particles

CETESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental

Ca- Cálcio

Co- Cobalto

Cr – Cromo

Cu – Cobre

DP- desvio padrão

DPOC – Doença pulmonar obstrutiva crônica

IFN – Interferon

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

ELISA - Enzyme linked immuno sorbent assay

EPA – Environmental Protection Agency

EU – Unidades de Endotoxina

Fe- Ferro

La- Lantânio

LAL- Limulus amebocyte lysate

LBA – Lavado broncoalveolar

LPS - Lipopolissacarídeo

MCE – filtro de Mixed Cellulose Ester

Mo- Molibdênio

Mg – Magnésio

Mn- Manganês

Na – Sódio

Ni- Níquel

Pb- Chumbo

PBS – Tampão fosfato-salino

Pen/Asp – Gêneros *Penicillium/Aspergillus*

PM_{2,5} – Material Particulado de diâmetro inferior a 2,5µm

PM₁₀ – Material Particulado de diâmetro inferior a 10 µm

ppm – Partes por milhão

PROCONVE - Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos

Automotores

Rb- Rubídio

S- Enxofre

Sb – Antimônio

Sc- Escândio

Si – Silício

T_H1 – T helper tipo 1

T_H2 – T helper tipo 2

Ti – Titânio

TNF – Fator de necrose tumoral

UFC – Unidades formadoras de colônia

U- Urânio

V- Vanádio

Resumo

Coelho, CD. *Análise dos contaminantes biológicos presentes no material particulado (PM_{2,5}) de amostras da região metropolitana de São Paulo*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009, 126p

INTRODUÇÃO: A poluição do ar traz diversos efeitos à saúde e, em particular, o material particulado menor do que 2,5 µm (PM_{2,5}), está associado ao aumento das taxas de morbidade e mortalidade devido a doenças cardiorespiratórias. A maioria dos estudos foca apenas na composição química do material, porém os componentes do bioaerossol podem ser responsáveis por aproximadamente 22% da massa total. **OBJETIVOS:** Nesse estudo, objetivamos determinar a contribuição relativa de fungos e endotoxinas (constituente da parede celular de bactérias gram-negativas) no PM_{2,5} e verificar possíveis efeitos inflamatórios locais devido à exposição a fungos e PM_{2,5} em ratos. **MÉTODOS:** O estudo foi dividido em três partes: 1) comparação de metodologias de coleta de fungos em amostradores de ar de curta e longa duração realizada em ambiente externo e em ambiente de concentrador de partículas ambientais em Boston, MA. 2) Coleta de 4 tipos de filtros a partir de amostrador de ar de PM_{2,5} utilizados para análise separadamente de fungos, quantificação de endotoxinas, análise de elementos químicos e extração para instilação em ratos em São Paulo. Dados meteorológicos também foram coletados. 3) Instilação intratraqueal de PM_{2,5} e fungos originários da atmosfera de São Paulo em ratos machos Wistar divididos em 3 grupos: A (administração de 6,3x10² esporos/µg de PM_{2,5}), B (18x10² esporos/µg de PM_{2,5}) e C (controle – instilação a partir de extração de filtro branco). O sacrifício foi feito após 24 horas da exposição, depois da retirada do lavado broncoalveolar para contagem total e diferencial de leucócitos, além de quantificação de citocinas de respostas T_H1 e T_H2. **RESULTADOS:** O estudo de comparação de metodologias mostrou que, entre os amostradores de ar de curta duração, Personal Burkard recuperou maior diversidade e concentração do que Andersen (p<0,05). Entre os amostradores de longa duração, Recording Burkard mostrou-se o melhor em termos de diversidade e concentração de esporos do que filtros MCE (p<0,05). Também observamos que os fungos representaram relevante porção do PM_{2,5}, chegando a concentrações de 2159 esporos/µg em ambiente de Concentrador de Partículas alocado em Boston, MA. A segunda parte do estudo mostrou novamente que os fungos representam porção relevante do PM_{2,5} alcançando valores médios de até 1345 esporos/µg de PM_{2,5} a partir de coletas da atmosfera de São Paulo. Da mesma forma, endotoxinas foram obtidas em concentrações médias de 5,52 EU/µg de PM_{2,5}. Os modelos de regressão linear múltipla mostraram que a contagem total de fungos, de basidiósporos hialinos e de *Cladosporium sp* foi correlacionada positivamente com a presença do fator Ba/Ca/Fe/Zn/K/Si no PM_{2,5} (p<0,05). Os gêneros *Penicillium/Aspergillus* foram correlacionados positivamente à concentração de material particulado na atmosfera (p<0,05). Os ascósporos sem pigmentação foram correlacionados positivamente à umidade (p<0,05). As endotoxinas foram correlacionadas apenas à temperatura atmosférica (p<0,05).

O modelo de instilação em animais mostrou que a administração de $6,3 \times 10^2$ esporos/ μg de $\text{PM}_{2.5}$ foi responsável por um aumento na concentração de TNF e IFN no lavado broncoalveolar ($p < 0,05$). Não foi observado o mesmo efeito quando a concentração de esporos foi de 18×10^2 esporos/ μg de $\text{PM}_{2.5}$. Não foram observadas diferenças sgnificativas contagem total e diferencial de leucócitos. **CONCLUSÕES:** Fungos e endotoxinas são responsáveis por fração relevante do $\text{PM}_{2.5}$. Esses contaminantes biológicos podem estar associados não apenas a fatores meteorológicos, mas também a elementos químicos presentes no Material Particulado, especialmente a elementos sinalizadores de tráfego de veículos e ressuspensão da crosta. Exposições a diferentes concentrações de fungos associados ao $\text{PM}_{2.5}$ em ratos não sensibilizados podem levar a diferenças em respostas inflamatórias agudas, porém os mecanismos responsáveis por tais resultados devem ser objeto de estudos futuros.

Descritores: Poluição do ar, fungos, endotoxina, material particulado, inflamação, interleucinas.

Summary

Coelho, CD. *Analysis of biological contaminants in Particulate Matter (PM_{2.5}) of Sao Paulo*. [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009, 125p"

INTRODUCTION: It is well known that air pollution is associated with health effects, particularly, particulate matter (PM) is correlated with increment in morbidity and mortality by cardiorespiratory diseases. A lot of studies have focused on chemical characterization of PM, although components of bioaerosols may comprise nearly 22% of the total mass. **OBJECTIVES:** The aims of this study were to determine the relative contribution of fungi and endotoxin (component of cell wall in gram-negative bacteria) in PM_{2.5} and verify acute local inflammatory response due to fungi and PM_{2.5} exposure in rats. **METHODS:** The study was divided in 3 parts: 1) Comparison among short and long term samplers located outdoor and in Ambient Particle Concentrator located in Boston, MA. 2) Sampling of 4 different filters types analyzed for fungi, endotoxin, chemical composition and extraction for instillation experiments in Sao Paulo. Meteorological data were also collected. 3) Intratracheal instillation of PM_{2.5} and fungi in male Wistar rats, divided in 3 groups: A (administration of 6.3×10^2 spores/ μg of PM_{2.5}), B (administration of 18×10^2 spores/ μg of PM_{2.5}) and C (control – blank filter). The animals were sacrificed 24 hours after exposure to collect bronchoalveolar lavage. Total and differential counts of leukocytes as T_{H1} and T_{H2} cytokines quantification were assessed. **RESULTS:** Sampling techniques comparisons showed that, the short term sampler Personal Burkard was able to collect more diversity and concentration of spores than Andersen sampler ($p < 0.05$). The long term sampler Recording Burkard was also able to collect more diversity and concentration of spores than MCE filters ($p < 0.05$). We also observed that fungi contribution to PM_{2.5} was relevant, representing up to 2159 spores/ μg of PM_{2.5} in Ambient Particle Concentrator located in Boston, MA. The second part of the study demonstrated again that fungi represent a relevant portion of PM_{2.5}, reaching average values of 1,345 spores/ μg of PM_{2.5} in Sao Paulo atmosphere. Also, endotoxin concentrations reached averages values of 5.52 EU/ μg of PM_{2.5}. Multiple linear regression models showed that total fungi counts, hyaline basidiospores and *Cladosporium sp* were correlated with factor Ba/Ca/Fe/Zn/K/Si ($p < 0.05$). The genera *Penicillium/Aspergillus* were correlated with PM_{2.5} mass ($p < 0.05$). Colorless ascospores were correlated with relative humidity ($p < 0.05$). Endotoxin was correlated only with temperature ($p < 0.05$). Instillation results showed that administration of 6.3×10^2 spores/ μg of PM_{2.5} was responsible for an increase in TNF and IFN in bronchoalveolar lavage ($p < 0.05$). The same pattern wasn't observed when 18×10^2 spores/ μg of PM_{2.5} was administered. No significant differences were observed leucocytes total and differential counts. **CONCLUSIONS:** Fungi and endotoxin represent a relevant fraction of PM_{2.5}. These biological contaminants can be associated not only with meteorological parameters, but with elementary composition, especially elements of traffic and crustal resuspension. Acute exposure of non sensitized

rats to different concentrations of fungi associated to PM_{2.5} might trigger different inflammatory responses, although the specific mechanisms remain unknown and further research is needed.

Descriptors: Air pollution, fungi, endotoxins, particulate matter, inflammation, interleukins.

Introdução

- Poluição atmosférica e material particulado

A “poluição” é o acúmulo de resíduos no meio ambiente, podendo acarretar em danos à saúde. Podemos considerar que a interferência do homem na poluição atmosférica foi iniciada há 800 mil anos antes de Cristo, a partir da descoberta do fogo (1). No entanto, as mudanças mais drásticas observadas no ambiente começaram a partir da Revolução Industrial iniciada na segunda metade do século XVIII, sendo que os primeiros estudos que correlacionaram aumento de poluição à mortalidade são datados do século XX.

O episódio londrino de 1952 é a referência mais clássica nessa área de estudo devido ao “fog” originado pela inversão térmica ter ocasionado um aumento no nível de material particulado e enxofre resultando em um incremento de 4000 no número de mortes. No entanto, o primeiro relato publicado ocorreu em 1931 na Bélgica em uma área fortemente ocupada por indústrias. A ausência de ventos também originou um “fog” em dezembro de 1930 e posterior óbito de mais de 60 pessoas. Além dos relatos de aumento dos sintomas respiratórios, o estudo de 10 necrópsias mostrou alterações no sistema respiratório (2).

A partir principalmente desses e outros episódios de similar magnitude, houve uma movimentação por parte de países americanos e europeus com a finalidade de reduzir emissões de poluentes e estabelecer limites máximos de exposição. Algumas tentativas de estabelecer padrões foram introduzidas desde a década de 60, porém somente com a criação da agência de proteção ambiental americana (EPA) na década de 70 e a publicação do “Clean Air Act” em 1990, houve um controle mais efetivo sobre os padrões de qualidade do ar. Entre outros poluentes, o documento definiu níveis máximos de exposição ao material particulado com diâmetro menor do que 2,5 micrômetros ($PM_{2,5}$) e diâmetro menor do que 10 micrômetros (PM_{10}). No que se refere ao $PM_{2,5}$,

objeto do presente estudo, foram definidos padrões máximos diários de exposição de $35\mu\text{g}/\text{m}^3$ e valores anuais medianos de $15\mu\text{g}/\text{m}^3$ (3).

No Brasil, medidas de redução de emissão de material particulado e outros poluentes vêm sendo implementadas desde a década de 70 pela Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB) com programas como “Operação Inverno” de 1976 (em que foram implementadas medidas preventivas e corretivas de redução da emissão de poluentes primários – emitidos diretamente pela fonte), Programa de Controle da Poluição do Ar por Veículos Automotores (PROCONVE) de 1986 (em que ficaram estabelecidos padrões máximos de emissão de poluentes por veículos novos, que passaram a otimizar a queima de combustível e adicionar álcool à gasolina), “Operação Rodízio” (que atualmente é realizada no ano todo) e, mais recentemente, o projeto “Respira São Paulo” divulgado em 2007 pela Secretaria de Saúde, em que ficaram estabelecidas, entre outras medidas, orientações para manutenção de motores e fiscalização mais efetiva da emissão de fumaça preta em rodovias do estado de São Paulo (4). Em 2008, foi regulamentado pelo Decreto 50232, o programa I/M no município de São Paulo, onde ficou estabelecida a inspeção veicular, incluindo veículos movidos a diesel e a gasolina registrados no município (5).

Em termos nacionais, não existe um limite máximo para exposição ao $\text{PM}_{2,5}$, apenas para PM_{10} , com padrões diários de $150\mu\text{g}/\text{m}^3$ e média anual de $50\mu\text{g}/\text{m}^3$. Doses diárias que variam de 0 a $50\mu\text{g}/\text{m}^3$ são enquadradas em níveis bons, >50 a $150\mu\text{g}/\text{m}^3$ em níveis regulares, >150 a $<250\mu\text{g}/\text{m}^3$ são considerados como qualidade inadequada, ≥ 250 a $<420\mu\text{g}/\text{m}^3$, como má qualidade e $\geq 420\mu\text{g}/\text{m}^3$ como péssima (4). A figura 1 mostra os padrões encontrados até 2007:

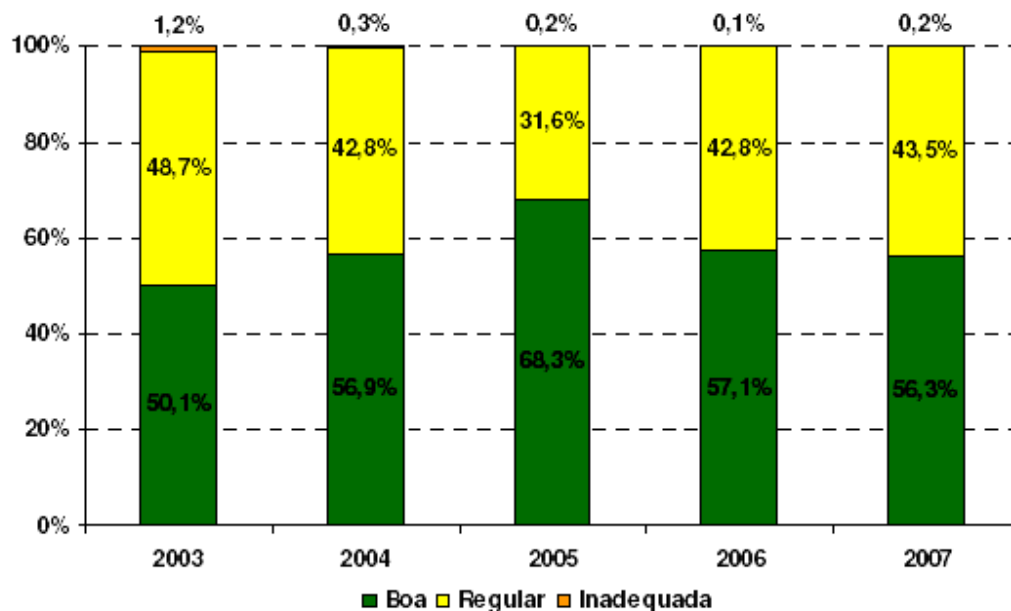


Figura 1. Distribuição percentual da qualidade do ar na Região Metropolitana de São Paulo. Fonte: CETESB, 2008

Material particulado e efeitos na saúde

O material particulado apresenta-se como uma mistura complexa de poluentes constituídos de fumaças, poeiras e todo tipo de material sólido e líquido que se encontra em suspensão na atmosfera. Na região metropolitana de São Paulo, acredita-se que em torno de 40% do material particulado seja emitido por veículos automotores, especialmente veículos a diesel e 25% são provenientes da ressuspensão da poeira (4). Incineradores e termelétricas também são responsáveis por parte da emissão (6).

As principais frações estudadas são as finas ou $PM_{2,5}$, $PM_{2,5-10}$ (diâmetro entre $2,5\mu m$ and $10\mu m$) e PM_{10} (inclui todos os diâmetros até $10\mu m$). Estudos envolvendo diferentes tamanhos de partículas são importantes devido à infiltração em regiões distintas do pulmão. PM_{10} atinge regiões do trato respiratório superior, enquanto $PM_{2,5}$ é capaz de atingir regiões alveolares (7).

Além disso, dependendo do diâmetro, as partículas apresentam variação na composição, sendo PM_{10} principalmente gerado por processos mecânicos e $PM_{2,5}$, por fontes de combustão (8).

Existe uma correlação positiva entre exposições agudas (9) e crônicas (10-12) ao material particulado atmosférico e risco de efeitos na saúde como remodelamento (11) e inflamação das vias aéreas (13, 14), exacerbação da asma (9, 15, 16), possíveis alterações no sistema reprodutor (17), aumento de doenças cardiopulmonares e morte por câncer, sendo os últimos dois fatores associados principalmente ao $PM_{2,5}$ (10, 12, 18-21). Um incremento de apenas $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de $PM_{2,5}$ já foi associado a um aumento de 8% a 18% no risco de mortalidade por doenças cardiopulmonares (22). Um estudo mais recente do mesmo grupo de pesquisa realizou uma estimativa anual e demonstrou que uma redução de $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de $PM_{2,5}$ em dois períodos de estudo seria responsável por um aumento da expectativa de vida em torno de 0,61 anos, sendo este valor uma média entre cidades avaliadas nos Estados Unidos (23).

Além dos esforços para determinação dos valores máximos aceitáveis de exposição, existem estudos focados nas susceptibilidades individuais e composição elementar (8). Diferenças na composição química podem alterar resposta inflamatória in vitro (24, 25) e padrões de mortalidade (26, 27). Dessa forma, apesar de ter-se notado uma redução da concentração do material particulado na região metropolitana de São Paulo nos últimos anos (figura 1) em níveis considerados aceitáveis em mais de metade dos casos, estudos nacionais recentes ainda mostram que a poluição é responsável por efeitos adversos.

Modelos animais com exposições prolongadas de ratos de 6 dias alocados em câmaras de exposição à poluição atmosférica de São Paulo mostraram aumento de secreção do muco ácido nas regiões proximal e medial da cavidade nasal, apesar das medições de $PM_{2,5}$ em média terem sido $46,49 \mu\text{g}/\text{m}^3$ e de NO_2 e “black carbon” serem consideradas dentro do padrão aceitável (28). Além

disso, ratos expostos cronicamente às câmaras apresentaram aumento da espessura da parede das artérias das circulações coronária e pulmonar (29).

Experimentos anteriores realizados nas mesmas câmaras mostraram alterações no sistema reprodutor de fêmeas de 10 dias de idade, mantidas por 4 meses em exposição (30). Também foram demonstradas alterações no sistema reprodutor de machos expostos nas câmaras, com diminuição de contagem de células germinativas e concentração do esperma, sendo também observada uma diminuição no nascimento de machos (31).

Além de modelos animais, estudos observacionais também demonstram efeitos adversos. Em um deles, verificou-se associação entre os níveis de material particulado e o aumento em 5% nas internações por infarto do miocárdio em indivíduos acima de 64 anos (32). Resultados semelhantes, dependentes do sexo foram encontrados por Martins *et al.*, 2006 (33).

Dessa forma, os efeitos da poluição ainda são observáveis apesar das políticas públicas de contenção de poluentes, sendo que se estima perda e comprometimento de mais de 28.000 vidas devido aos seus efeitos e são gastos mais de 3 milhões de dólares com saúde devido a doenças causadas pela poluição somente na região de São Paulo (34).

- *PM 2,5 e composição química*

Vários estudos que objetivam caracterizar a composição química do material particulado em diferentes cidades e suas correlações com impactos na saúde (26, 35-44).

Variáveis como fonte, localização geográfica e fatores meteorológicos são importantes determinantes da composição relativa do material particulado. Um estudo realizado a partir de coletas de material particulado em diferentes cidades brasileiras ilustra de forma interessante essa temática. Foram coletados materiais a partir da atmosfera de São Paulo (Capital), Cubatão e Araraquara. Ovos recém fecundados de *Gallus domesticus* foram expostos a diferentes

concentrações e os resultados mostraram que, dada uma mesma concentração, a taxa de mortalidade e baixo peso ao nascer foram maiores nos embriões expostos ao material particulado de Cubatão, conhecida por ser um pólo petroquímico. Alguns elementos químicos, como o Urânio (que sabidamente origina efeitos deletérios no embrião) foram encontrados apenas nas amostras originárias dessa cidade (45). Outro estudo que coletou amostras apenas na Região Metropolitana da cidade de São Paulo demonstrou o efeito da composição na alteração de sistemas biológicos. $PM_{2,5}$ foi coletado em dia de greve de ônibus e após, demonstrando diferenças na constituição de elementos traço entre os dias. *Tradescantia pallida* foi exposta a concentrações determinadas de material particulado e mostrou-se uma redução do potencial mutagênico no dia de greve (46).

É possível identificar os principais componentes químicos do material particulado associados a impactos na saúde como carbono orgânico e elementar e metais de transição/metais.

Carbonos orgânicos e/ou elementares são produtos da combustão e são associados e alterações no diâmetro arterial, estresse oxidativo e variabilidade na taxa cardíaca. Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são responsáveis por possível participação em processos mutagênicos e anormalidades cromossômicas, também possuindo importância indireta no estresse oxidativo (47).

Como metais estão envolvidos em reações de redox, eles são indutores de radicais livres responsáveis pela maioria do estresse oxidativo observado nos pulmões e coração. Além disso, podem ser responsáveis por hiperreatividade das vias aéreas, inflamações e necrose nos pulmões, sendo o tipo de metal importante no processo (47). Por exemplo, o Vanádio já foi descrito como importante indutor de reações inflamatórias nos pulmões (24, 48) e o Zinco, como indutor de injúrias nos pulmões e de alterações hematológicas (48). Outros estudos ainda acrescentam os fatores níquel/vanádio e alumínio/sílica a efeitos inflamatórios, principalmente aumento de neutrófilos no lavado

broncoalveolar de cães expostos a $PM_{2,5}$ concentrado (49). O fator Cr/Al/Si/Ti/Fe/Cu já foi correlacionado a um aumento da liberação de IL-6 e IL-8, sendo que Fe e Si foram correlacionado à liberação de IL-6 e Cr à liberação de IL-8 (38).

Apesar de não considerado um metal, o Bromo também já foi descrito como indutor de respostas inflamatórias, com aumento dos níveis de neutrófilos no lavado broncoalveolar e paredes de pulmões de ratos normais e com bronquite crônica expostos a $PM_{2,5}$ concentrado (24) e, em lavado broncoalveolar de cães, quando considerado em conjunto com chumbo (49).

Dessa forma, é recente na literatura a preocupação com a identificação da composição química.

A partir de medidas de composição do material também é possível realizar inferências a respeito de possíveis fontes de emissão. Fuga et al (50), em 2008, realizaram um estudo de biomonitoramento a partir de líquens e encontraram variações na composição química de elementos traços acumulados dependente da localização da amostragem (sendo a região metropolitana de São Paulo comparada a regiões menos poluídas). Líquens coletados em regiões menos poluídas apresentaram menor concentração de As, Co, Cr, Fe, La, Mo, Na, Sb, Sc, U e Zn. Altas concentrações de Ba foram encontradas em região de pólo petroquímico e altas concentrações de Mn também foram ligadas a emissões industriais. O Br e Zn foram correlacionados não somente às indústrias, mas também ao tráfego intenso de veículos e o Co foi associado especificamente a indústrias metalúrgicas. Apesar de não ter sido estabelecida uma relação causal, associações significativas entre mortalidade em adultos acima de 45 anos por doenças cardiopulmonares e Co, Fe, Mn e Na foram encontradas. De forma geral, Mn, Cu, Zn, V, Ni e Br são considerados produtos de combustão de fontes antropogênicas, (V e Ni específicos de combustão de óleos) e outros elementos, como o Si, Ca, Mg e Al, são considerados ressuspensão da crosta (44, 51, 52). Os elementos de ressuspensão podem estar relacionados à baixa umidade e alta temperatura (44).

- *Concentrador de partículas*

A toxicidade do material particulado e efeitos de sinergia podem ser estudados através da concentração do material e identificação de componentes químicos e biológicos associados.

O Concentrador ambiental idealizado a princípio em Harvard representa uma boa forma de condução desse tipo de experimento, dado que é capaz de concentrar partículas ambientais (PM_{2,5}) em aproximadamente 30 vezes (53) e permite a realização de estudos controlados.

Clarke et al (49), em 2000, realizaram experimentos com cães e observaram uma maior variabilidade na resposta biológica quando os animais eram expostos ao PM_{2,5} concentrado (CAPs) a partir da atmosfera de Boston. Os aumentos da porcentagem de neutrófilos do lavado broncoalveolar, da contagem de células sanguíneas periféricas, neutrófilos e linfócitos circulantes foram associados ao fator alumínio/sílica. O aumento de neutrófilos circulantes e macrófagos no lavado foram associados ao fator vanádio/níquel. A diminuição de células vermelhas e níveis de hemoglobina foram associados ao fator enxofre. Um estudo conduzido em Detroit demonstrou a maior retenção de elementos químicos provenientes da combustão (lantânio, vanádio, enxofre e manganês) em ratos previamente expostos a ovalbumina, quando comparados ao grupo controle. Além disso, eosinófilos e proteínas foram encontrados no lavado apenas de ratos alérgicos (54). Outro estudo realizado pelo mesmo grupo observou efeitos similares em ratos previamente sensibilizados por ovalbumina, mas não encontrou diferenças em ratos previamente sensibilizados por endotoxina (55).

Estudos utilizando voluntários mostraram resultados mais conflitantes. Em um deles, foram selecionados adultos asmáticos e não-asmáticos e os resultados de testes cardiovasculares mostraram variações, porém não significativamente diferentes entre os grupos (56). Mais tarde, o mesmo grupo

selecionou idosos saudáveis e com doença pulmonar obstrutiva crônica. Surpreendentemente, os efeitos cardiovasculares foram maiores no grupo de indivíduos saudáveis. A pequena amostra (13 indivíduos com DPOC e 6 no grupo controle) pode explicar em parte os resultados (57)

Até o momento, apenas um estudo caracterizou a concentração de endotoxinas associadas ao CAPs (sendo os resultados apresentados em maior detalhe no item "Endotoxina associada ao material particulado urbano e a partículas ambientais concentradas") e nenhum caracterizou fungos.

- Componentes biológicos

Os estudos de análise de composição da fração biológica do material particulado são raros, porém com elevado grau de importância recente. Isso porque o material microbiológico pode ser carregado pelo material particulado, tendo suas propriedades aerodinâmicas e antigênicas modificadas, habilitando a penetração em regiões alternativas do pulmão (58-60). Esse tópico assume extrema importância dado que partículas de origem biológica podem corresponder de 22% a 30% do particulado total (61, 62) e 5 a 10% do material ressuspenso (60).

Estimativas mostram que fragmentos de plantas e componentes microbiológicos podem corresponder a 56×10^{12} grama na emissão global de $PM_{2,5}$ por ano (63) e que existe uma tendência de aumento da concentração dos componentes biológicos com o aumento da emissão de material particulado (64). Já foi demonstrado inclusive que alérgenos de pólen podem ser adsorvidos no $PM_{2,5}$ (59), apesar da sua maior importância em estudos que envolvem PM_{10} , incluindo pesquisas de efeito de sinergia entre pólen e material particulado na hospitalização de crianças por asma (65).

Apesar da importância reconhecida do tópico, existem poucos estudos em que é feita a caracterização dos componentes biológicos na área (66, 67) e futuras pesquisas são necessárias.

Endotoxina e resposta inflamatória

Endotoxina é um constituinte da parede celular externa de bactérias gram-negativas (figura 2) sendo um potente agente indutor de sintomas e respostas inflamatórias nas vias respiratórias (68-70). É comum que a denominação lipopolissacarídeos (LPS) seja encontrada na literatura, porém algumas diferenças podem ser apontadas. LPS é constituído de lipídio A, oligossacarídeo e antígeno – O. A endotoxina corresponde ao material de ocorrência natural constituído de LPS e outros componentes celulares (70), com atividade biológica associada à região do lipídeo A (71-73).

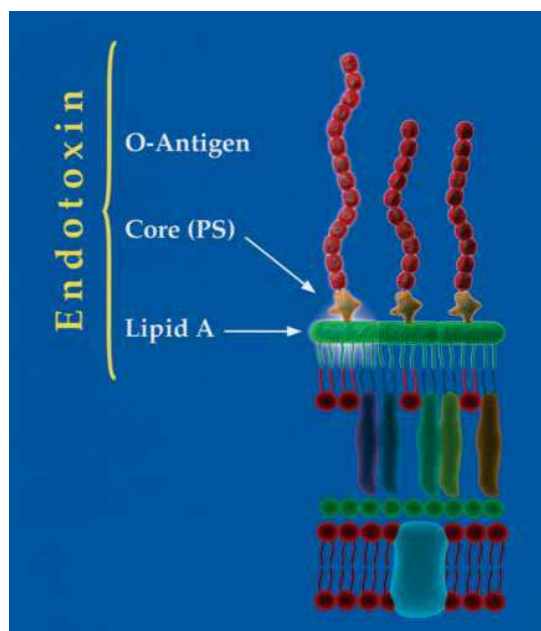


Figura 2. Endotoxina - um potente agente inflamatório presente na parede celular de bactérias gram-negativas. Fonte: Liu, 2002

Ao contrário dos estudos referentes ao material particulado, a maioria dos estudos envolvendo endotoxinas vêm sendo conduzidos em ambientes internos e por tal motivo, serão abordados nessa seção.

Dependendo da dose inalada, a endotoxina pode ser responsável por injúrias agudas no pulmão em modelos murínicos (74), sintomas como irritação das vias respiratórias, alterações na respiração, febre (75), tosse, espirros (76) e obstrução progressiva das vias aéreas (77). É hipotetizado que exposição à endotoxina resulte em exacerbação da asma (78, 79).

Não é determinada de forma enfática a dose responsável pela respostas imunológicas do tipo T_H1 or T_H2 (80, 81), porém fatores genéticos (82) e ambientais possam auxiliar na resposta a essa questão. Alguns estudos sugerem que baixas doses induzem respostas do tipo T_H2 (83, 84), envolvendo a liberação de eosinófilos, interleucinas como IL-5 e IL-13, via de sinalização TLR4 (83), decréscimo de liberação de intérferon (IFN- γ) e aumento da função fagocitária (84). Porém, altas doses vêm sendo relacionadas à indução de respostas T_H1 com aumento de IFN γ e IL-12 (83).

Estudos envolvendo atopia e asma em crianças encontraram aumento de problemas respiratórios, incluindo falta de ar em crianças de risco (85-87) e sintomas clínicos em asmáticos (88), porém existe uma discussão da possível característica transitória desses efeitos (87). A ação protetora da endotoxina suprimindo a via T_H2 é controversa e vêm sendo revisada na literatura (89-91).

Os níveis de endotoxina variam amplamente em ambientes internos e externos sendo que altas temperaturas, números de pessoas na residência e presença de animais são fatores importantes em ambientes internos e sazonalidade, em ambientes externos (92-94).

Endotoxina associada ao material particulado urbano e a partículas ambientais concentradas.

Como o material particulado e endotoxina isoladamente são capazes de induzir uma ampla gama de respostas inflamatórias, estudos recentes focaram na caracterização dos níveis de endotoxina associados ao $PM_{2,5}$ e PM_{10} correlacionando com efeitos sinérgicos. Carty et al (95), em 2003, analisaram a

concentração de endotoxina associada ao $PM_{2,5}$ em ambiente externo de Monique, Alemanha e constataram que altos níveis eram correlacionados a altas temperaturas e decréscimo da umidade relativa. Aparentemente, o conteúdo de endotoxina associado ao PM é mais elevado em estações mais quentes e ao PM_{10} quando comparado ao $PM_{2,5}$ (69, 96-99), sendo a concentração no PM_{10} até dez vezes maior do que nas frações finas (100). No entanto, estudos com resultados contrários também podem ser encontrados na literatura (101).

A região geográfica também é área de interesse nesse campo de estudo. Amostras do Sudeste da Califórnia mostraram que regiões agrícolas apresentavam as menores concentrações de PM_{10} (em média $20\mu\text{g}/\text{m}^3$), porém concentrações médias de endotoxina (em média 18,9 EU/mg de PM). Em áreas montanhosas desérticas, apesar do baixo valor do PM_{10} (em média $21,1\mu\text{g}/\text{m}^3$) o conteúdo de endotoxina foi o mais elevado (média de 30 EU/mg). Para as concentrações maiores de PM_{10} , os níveis de endotoxina tenderam a se concentrar no terceiro quartil. O material particulado e a endotoxina foram mais correlacionados no verão (102). Em outro estudo de comparação entre regiões agrícolas e industriais na primavera, o conteúdo de endotoxina associado ao material particulado foi maior nas áreas agrícolas, talvez explicado pela influência de fontes de vegetação (99).

Efeitos sinérgicos também são estudados e a maioria dos experimentos é realizada em cenário de inalação, instilação traqueal ou estímulo direto de macrófagos utilizando modelos animais. Um resumo dos resultados está listado na tabela 1.

Tabela 1 - Resultados de estudos de efeitos sinérgicos de endotoxina associada ao material particulado

Estudos sobre endotoxina associada ao material particulado	
Autores	Resultados
Dybing et al	Aumento de resposta de TNF α e IL-6 ao PM não foi atribuída à endotoxina.
Huang et al	Endotoxina foi responsável por 36% da produção de TNF- α após exposição ao PM _{2,5} e 24% após exposição ao PM ₁₀ .
Steerenberg et al	Conteúdo de endotoxina não foi correlacionado à liberação de imunoglobulinas, citocinas, mudanças histopatológicas nos pulmões e contagem total de células no pulmão.
Osornio- Vargas et al	A associação de endotoxina ao PM resultou em aumento da produção de TNF- α e IL-6.
Schins et al	A maior concentração de endotoxina associada ao PM coincidiu com maior liberação de IL-8 e TNF- α .
Imrich et al e Long et al	Macrófagos sensibilizados por LPS tiveram resposta amplificada de liberação de TNF- α após exposição ao PM.
Ning et al	Endotoxina associada ao PM geraram produção 30 vezes maior de proteína-2 (MIP-2).
Bonner et al	Metais e endotoxinas presentes no PM ativaram a produção de IL-1 β e PDGF.
Monn et al e Becker et al	Endotoxina associada ao PM induziu maior produção de TNF- α , IL-6 e IL-8.
Alexis et al	Contaminantes biológicos associados ao PM aumentaram a expressão de TNF- α mRNA, mCD14, CD11b/CR3 e HLA-DR.
Dong et al	Endotoxina levou ao aumento da resposta do TNF- α após exposição ao PM.
Becker et al	Houve inibição da produção de citocinas em resposta ao PM devido à adição de anti-CD14.

Imrich et al (103), em 1999, constaram que macrófagos sensibilizados com LPS apresentaram uma resposta amplificada ao TNF- α após exposição a partículas ambientais concentradas (CAPs) e urbanas. Outro estudo demonstrou que endotoxina associada a CAPs geraram quase 30 vezes mais liberação de proteína inflamatória (MIP-2) quando associada a CAPs do que em exposição única à endotoxina (104). Estudos conduzidos em três regiões do México mostraram que metais e endotoxina juntos eram capazes de induzir a liberação do fator de crescimento derivado de plaquetas [(PDGF)-que auxilia na proliferação de células do mesênquima] através da ativação de IL-1 β ou

ativação direta (105). Mais tarde, o mesmo grupo encontrou diferenças de concentrações de metais e endotoxina associados ao PM₁₀. Evidências indiretas poderiam apontar para metais como indutores de efeitos tóxicos e endotoxina como indutora da maioria das respostas inflamatórias (106) sendo esses resultados similares àqueles alcançados por Monn et al (107), em 1999. O papel da endotoxina tornou-se mais claro quando os autores constataram que o PM₁₀ do Sudeste induzia as maiores liberações de TNF- α e IL-6 e parte desse efeito era devido à endotoxina, já que a adição de rENP (um inibidor de endotoxina) levou à redução da resposta. Ainda, a concentração de endotoxinas nas amostras referidas foi duas vezes maior do que a encontrada no Nordeste (97). Em outro estudo, o conteúdo de endotoxina encontrado na fração inalável foi até dez vezes maior nas áreas rurais, que também induziram maior liberação de IL-8 e TNF- α após instilação traqueal em pulmões de ratos (99).

Um estudo recente avaliou a resposta imunológica de indivíduos saudáveis expostos a PM₁₀ inalado (~0.65 mg/indivíduo) associado a contaminantes biológicos. Os resultados mostraram aumento da expressão de TNF- α mRNA em macrófagos purificados expostos a PM_{2.5-10+} (PM associado ao material biológico), porém não foi encontrada associação após inalação de PM_{2.5-10-} (PM aquecido para inativação dos contaminantes biológicos). Além disso, a fagocitose por monócitos foi modificada, com aumento de mCD14 (associado a respostas mediadas por LPS), CD11b/CR3 (associado à defesa do hospedeiro) e HLA-DR (associado à apresentação de antígeno) - (108). Esses resultados podem ser complementados por Huang et al (69), em 2002, que atribuíram à endotoxina 36% da produção de TNF- α em macrófagos de camundongos em PM_{2.5} e 24% (considerando medições diretas de endotoxinas) em PM₁₀. Anteriormente, Dong et al (109), em 1996, mostraram que a utilização de sulfato de polimixina B (um inativador de endotoxina) foi capaz de inibir completamente a produção de citocinas (incluindo TNF- α) por macrófagos alveolares de ratos após a exposição e partículas urbanas. Um dado

interessante mostrou que não foi encontrada endotoxina ou liberação de citocinas após exposição ao diesel. Esses dados sugerem que toda a atividade de liberação de citocina ocorreu devido à endotoxina associada às partículas urbanas. Resultados similares com inibição de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 and IL-8) após neutralização completa (107) ou parcial (110) da endotoxina associada a partículas inaláveis e urbanas foram encontrados.

Outros autores sugerem que não apenas LPS, mas também bactérias gram-positivas e gram-negativas são responsáveis pela estimulação de macrófagos alveolares expostos ao PM. Apesar de apenas 30% das bactérias isoladas serem gram-negativas houve uma resposta preferencial ao grupo, que apresentou papel relevante em baixas concentrações de partículas. Apenas quando foram oferecidas altas concentrações de partículas, houve um número suficiente de células gram-positivas capazes de promover resposta de citocinas. Apenas uma bactéria gram-negativa pode ser necessária para ativar 100 macrófagos, quanto resultando em liberação de IL-6 in vitro, mas é necessário 3 vezes mais bactérias gram-positivas para gerar mesmo efeito (111). Mais tarde, o mesmo grupo verificou que macrófagos expostos a PM perdiam atividade de citocinas quando sensibilizados por anticorpos anti-CD14, sugerindo que endotoxina estava associada a respostas inflamatórias ao PM_{2.5} e PM₁₀ (112). Outros estudos que envolveram endotoxina associada a polietileno mostraram aumento de liberação de citocina mediada por macrófagos (IL-1 β , TNF α and IL-6) in vitro (113). Também foi demonstrado que a atividade de macrófagos in vitro é na maior parte mediada por materiais insolúveis presente em CAPs, incluindo endotoxina adsorvida, porém o estado de ativação das células determina a resposta a um componente específico (103). Esses resultados são similares a outros que mostraram maior atividade de LPS quando adsorvida a partículas em suspensão ou fração insolúvel do material do que no sobranadante de PACs e PM₁₀ (103, 114) com um incremento de 50 vezes na produção de IL-6, TNF α , e MCP-1 e fagocitose de macrófagos devido à endotoxina associada ao material particulado (114).

Em contraste com esses resultados, um estudo de coleta de $PM_{2,5}$ e PM_{10} conduzido em cidades européias encontrou significância estatística na liberação de $TNF\alpha$ e IL-6 por macrófagos alveolares após sensibilização por PM_{10} (que também apresentava maior concentração de endotoxina associada), porém esses resultados não foram atribuídos à endotoxina, dado que a adição de sulfato de polimixina B não levou à alteração de liberação de citocinas. Deve-se ressaltar que os autores constataram que altas concentrações de endotoxinas coincidiam com alta liberação de IL-6, porém não foi encontrada proporcionalidade direta. Além disso, não foi excluída a possibilidade de efeitos de interação da endotoxina com outros componentes pró-inflamatórios (98). Esses resultados corroboram parcialmente outro estudo em que endotoxina associada ao $PM_{2,5}$ e PM_{10} não foi correlacionada à liberação de imunoglobulinas (IgE, IgG1, and IgG2a), citocinas (IL-4, IL-5, IFN- γ , e $TNF-\alpha$), mudanças histopatológicas e contagem total de células nos pulmões de camundongos após sensibilização com ovalbumina (96).

Estudos comparativos realizados em ambientes internos e externos são menos freqüentes, porém dois podem ser encontrados na literatura. Um estudo pequeno in vitro conduzido em Boston utilizou amostras pareadas de $PM_{2,5}$ para estimular macrófagos alveolares de ratos. Houve aumento da produção de $TNF-\alpha$ em ambos os casos, apesar de mais significativa quando as partículas eram provenientes de ambientes internos. A resposta foi amplificada quando foi realizada sensibilização dos macrófagos com LPS, sugerindo que condições pró-inflamatórias possam exacerbar os efeitos de exposição ao $PM_{2,5}$ (115). Em outro estudo, houve aumento de produção de citocinas por monócitos humanos quando expostos apenas ao material particulado proveniente de ambiente externo, com atividade pró-inflamatória relacionada à endotoxina (107).

Fungos - caracterização e relação com fatores abióticos

Fungos pertencem a um Reino extremamente extenso, sendo atualmente conhecidas 72.065 espécies de acordo com o “Dictionary of fungi”, 8^o edição (116). Apesar dos fungos habitarem quase todos os tipos de ecossistemas, incluindo mares e lagos, a maioria dos fungos produz esporos ou conídios (denominações dependentes da fase do ciclo de vida) transportados pelo ar, sendo então denominados anemófilos. Os esporos são transportados de forma passiva e podem viajar longas distâncias (117). Fungos anemófilos representam uma relevante porção dos componentes biológicos presentes na atmosfera e são fatores de risco, principalmente para alergias e asma (118, 119), sendo mais de 80 gêneros envolvidos em tais respostas (120).

Diferentemente das bactérias, cujo enfoque dos estudos é dado à endotoxina, fungos apresentam diversos agentes, como glucanos e alérgenos sendo os últimos específicos para cada espécie e geradores de respostas diferenciadas. Devido a isso, metodologias de identificação de esporos e colônias foram escolhidas nesse estudo e o histórico desses microrganismos será tratado de forma mais específica.

Os principais fungos anemófilos pertencem às classes dos Ascomycetos, Basidiomycetos, ao grupo artificial dos deuteromicetos (ou fungos imperfeitos) e, em menor importância, à classe dos Zigomicetos, representados principalmente por *Absidia sp*, *Rhizopus sp* e *Mucor sp*. Os Mixomicetos (apesar de não serem considerados fungos verdadeiros) serão também abordados nos resultados. Esses fungos também são conhecidos como gelatinosos, já que são organismos amebóides. Habitam geralmente regiões úmidas e cascas de árvores. A maioria dos estudos envolvendo esses últimos fungos é encontrada no âmbito agrícola, dado que são celulolíticos e podem levar a uma deterioração de vegetais amplamente utilizados para fins comerciais (121). A relação desses últimos com alergia é menos estudada, porém existem relatos de testes cutâneos positivos para Mixomicetos (122).

Os ascomicetos não são os mais evidentes na natureza, mas correspondem ao maior grupo de espécies, sendo que a maioria produz esporos aerolisáveis, produzidos em grupos de 8 nos asci. Apesar disso, pouco se sabe sobre os mecanismos de alergenicidade, dado que poucos crescem em cultura ou em materiais caseiros (117). No entanto, é possível se inferir que os alérgenos tenham algum grau de similaridade com dos deuteromicetos, dado que pertencem ao estágio teleomórfico dos mesmos – correspondente ao estágio de reprodução sexuada (123). Além disso, um estudo mostrou que testes cutâneos positivos foram encontrados a partir de extratos de ascomicetos cultiváveis coletados a partir da atmosfera de Michigan (124).

Os basidiomicetos incluem os cogumelos, “puffballs”, “smuts” e “rusts”, sendo os dois últimos, patógenos de plantas. Os basidiósporos são as formas sexuais produzidas em grupos de quatro em lamelas expostas ao meio externo. No caso de “puffballs”, o basídio se desenvolve dentro de um corpo de frutificação, expondo os esporos apenas quando completamente maduros. Nesse caso, a liberação ocorre em “nuvens” principalmente durante chuvas (117).

Apesar de terem sido ignorados por vários anos, os basidiomicetos estão cada vez mais sendo reconhecidos e identificados em estudos que envolvem aerobiologia e alergias. Dentre os gêneros mais comuns em amostras e que possuem extratos associados a respostas atópicas e a ataques asmáticos estão *Coprinus sp* (125), *Ganoderma sp* (126) e “puffball” *Calvatia sp* (127). Estudos indicam que 25-30% dos indivíduos que apresentam alergias respiratórias são sensíveis aos basidiomicetos (128), considerados componentes principais em alguns estudos de gravidade da asma e rinite alérgica (129, 130).

Dado que deuteromicetos pertencem ao estágio anamórfico dos ascomicetos e basidiomicetos, não serão tratados como grupo taxonômico, mas como um grupo funcional de fungos que produzem conídios (ou mitósporos) assexuadamente, geralmente a partir de uma hifa especializada, o conidióforo. Apenas como forma de simplificar a nomenclatura, todos os propágulos

provenientes de fungos serão tratados como esporos. Existem diversas chaves de classificação adotadas para os fungos anemófilos, sendo boas referências as encontradas em (131) e (117). Esse grupo de fungos é classicamente identificado e relacionado à deflagração de alergias e asma, inclusive em ambientes internos. Os gêneros de maior importância na literatura incluem *Cladosporium sp*, *Alternaria sp*, *Penicillium sp* e *Aspergillus sp*, sendo os alérgenos mais bem conhecidos os provenientes de *Cladosporium herbarum* (Cla h 1 e Cla h 2), *Alternaria alternata* (Alt a 1) e *Aspergillus fumigatus* (Asp f 1) (132). Dos gêneros citados, *Alternaria* é o mais correlacionado com o desenvolvimento, persistência e severidade da asma, sendo que até 70% dos pacientes alérgicos a fungos possuem teste cutâneo positivo para esse gênero (119). Nos países europeus, a sensibilização ao *Cladosporium sp* e *Alternaria sp* flutua entre 3 e 30%, sendo que a porcentagem apenas de *Cladosporium sp* pode chegar a 75% do total em ambiente externo, através de metodologia de contagem total de esporos (133).

Os fungos citados são amplamente distribuídos no mundo e dados de coletas de fungos anemófilos na atmosfera de cidades brasileiras, apesar de mais raros, são realizados desde 1941 e confirmam a relevância desses gêneros (134). Na cidade de São Paulo, os fungos de maiores prevalências são *Aspergillus*, *Candida*, *Cephalosporium*, *Cladosporium*, *Fusarium*, *Hormiscium*, *Monilia sitophila* (atualmente *Crysonilia*), *Penicillium*, *Rhizopus*, *Rhodotorula* (135), *Alternaria*, *Epicoccum*, *Aureobasidium*, *Trichoderma* e *Phoma* (134) e em Botucatu, São Paulo, outros ainda apresentam destaque como *Helminthosporium* (ou *Dreschlera*) (136). Os principais gêneros reportados são parecidos com aqueles encontrados em regiões no Nordeste do país, como na cidade de Recife, Pernambuco (137). Em Natal, Rio Grande do Norte, dois gêneros adicionais, *Curvularia* e *Rhizopus*, assumem importância (138) e em Fortaleza, Ceará também se pode destacar gêneros adicionais como *Drechslera* e *Absidia* (139). Apesar do padrão de frequência de certos gêneros de fungos no Brasil, estudos em diferentes cidades, como Presidente Prudente,

São Paulo, mostraram importância de outros gêneros, como *Monascus*, *Neurospora*, *Trichotecium* e *Cryptococcus*, não frequentes em outros estudos (140).

Vale ressaltar que a importância desses fungos cultiváveis, em sua maioria deuteromicetos, no cenário brasileiro não deve ser ignorada, porém apenas dois estudos recentes no Brasil realizaram coleta e identificação de esporos totais, abrangendo fungos cultiváveis e não cultiváveis, ou seja, trazendo à tona a importância da classificação de outras classes que compreendem ascomicetos e basidiomicetos, já mencionados como indutores de respostas inflamatórias. Mezzari et al (141), em 2002, realizaram coletas com o amostrador de ar Rotorod na atmosfera da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Os resultados mostraram que os ascósporos foram mais relevantes nas amostras (correspondendo a 50,49%) do que os deuteromicetos de maior importância em estudos prévios brasileiros: *Cladosporium* (17.86%) e *Aspergillus/Penicillium* (15.03%). Foram encontrados picos, principalmente de ascósporos e *Cladosporium* em março, agosto e novembro. Após a tomada dos dados, testes cutâneos e de IgE específica para os extratos de espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria* e *Helminthosporium* foram analisados em indivíduos atópicos e controle. Enquanto não houve resultados positivos para o grupo controle, 15,38% dos indivíduos atópicos apresentaram sensibilização a pelo menos um dos extratos analisados (142). O segundo estudo brasileiro que atentou para coleta de esporos totais, foi realizado a partir de amostras provenientes do amostrador Burkard em Caxias do Sul, Rio Grande do Sul. As maiores concentrações foram encontradas no verão e as menores, no inverno. Os membros dos deuteromicetos representaram em torno de 40% do total, sendo *Cladosporium* o gênero mais marcante, representando 32,9% da contagem total. Os autores atribuem tal prevalência à vegetação farta da região e condições climáticas do sul do país, principalmente na primavera e verão, que apresenta altas temperaturas e baixa

umidade. Os ascósporos representaram em torno de 20% do total, assim como os basidiósporos, sendo *Coprinus* o principal gênero dentre os últimos (143).

Nota-se então que existem variações sazonais e dependendo das condições atmosféricas, ocorrem mudanças na concentração e na diversidade de esporos no ar. Por exemplo, ascósporos ficam protegidos nos ascos em períodos de seca, para somente serem lançados no ar durante períodos de umidade (144). Dessa forma, amostras coletadas após chuvas intensas apresentam uma tendência de possuírem uma alta quantidade dos mesmos (117). Haard et al (145), em 1970, estudaram espécies de basidiomicetos e notaram que muitas espécies apresentavam padrões de liberação com picos durante a noite, enquanto outras espécies mostraram picos durante o início da manhã. No entanto, inúmeros cogumelos pequenos apresentavam picos de 24-48 horas, após o início da liberação. Ainda, fenômenos com as chamadas “plumas de esporos” podem ocorrer e correspondem ao aumento drástico da concentração ambiental em períodos curtos de tempo, por exemplo, em 2 horas. A pluma pode estar positivamente correlacionada com o aumento da temperatura, ponto de saturação e pressão do ar, que levam a tempestades após o fenômeno (146). Ainda nesse contexto, Dales et al (68) , em 2004, verificaram que dias com tempestades em Ontário podem influenciar pouco na concentração de poluentes e pólen na atmosfera, porém podem levar a um aumento de quase duas vezes na quantidade de esporos no ar e no número de atendimentos emergenciais de crianças asmáticas em hospitais. No entanto, existe uma dificuldade inerente à predição de esporos durante chuva, já que não atua apenas como agente dispersor e aerolizante, mas também como agente de remoção, aumentando a densidade das partículas e levando à deposição (120).

Algumas espécies adquirem padrões sazonais, como é o caso do ascomiceto *Venturia sp*, que se desenvolve nas superfícies de folhas e adota padrões de liberação na primavera, quando as plantas ainda se apresentam jovens e vulneráveis. Outros, no entanto, são liberados durante o ano todo,

como é o caso do *Cladosporium sp*, que no entanto apresenta padrão de liberação mais acentuado em tempo seco (147). Da mesma forma, certos Mixomicetos são liberados o ano todo, porém especialmente após chuvas (121). Ainda, esporos como os provenientes dos deuteromicetos *Alternaria*, *Helminthosporium/Drechslera*, também são mais abundantemente liberados em períodos secos, especialmente durante ventos fortes (132). Estudos brasileiros mostraram que a maioria dos gêneros recolhidos apresentava maior padrão de liberação no outono e inverno, onde existe aumento da pressão atmosférica, queda da temperatura, queda de índices pluviométricos e umidade relativa (134). Mais tarde o mesmo grupo depositou um olhar mais detalhado sobre os diferentes gêneros e demonstrou que o aumento da temperatura e umidade relativa do ar podem levar a aumento de *Epicoccum* e *Aureobasidium* e o aumento apenas da umidade relativa pode levar ao aumento de *Penicillium* e *Aspergillus* (148). Dessa forma, não existe uma regra universal para padrões de liberação de esporos fúngicos.

Outras variáveis como padrões de poluição (assunto tratado com maiores detalhes em tópico adiante), radiação solar e velocidade dos ventos também podem afetar a distribuição. A radiação solar pode apresentar efeitos deletérios sobre alguns fungos, porém outros, como *Alternaria* e *Cladosporium*, podem ter sua liberação aumentada em condições de alta radiação (149). Ainda, estudos controlados conduzidos com *Alternaria* mostraram que, mesmo que haja uma queda da viabilidade ou metabolismo dos esporos devido à exposição à luz ultravioleta, não existe diminuição da liberação de alérgenos (150), o que também ressalta a importância da utilização de metodologias que amostram esporos independentemente da viabilidade. Pode existir uma correlação positiva entre a velocidade do vento e a liberação de esporos, especialmente de deuteromicetos como *Aspergillus* e *Penicillium*, cujos esporos são relativamente pequenos e se arranjam em cadeias originadas a partir extremidade do conidióforo (151). Alguns autores brasileiros encontraram uma correlação positiva entre velocidade do vento e liberação de esporos (148),

enquanto outros estudos conduzidos em Porto Alegre e na praia de Pelotas, Rio Grande do Sul, não acharam tal associação (141, 152).

Fungos e respostas inflamatórias

Apesar da exposição a fungos ser passível de deflagração dos quatro tipos de respostas de hipersensibilidade, usualmente aquela que caracteriza a reação alérgica é a resposta tipo I mediada por IgE e compreende duas fases. A primeira fase ocorre minutos após a exposição ao antígeno e é caracterizada pela liberação de mediadores pré-formados. Reações tardias ocorrem 3 a 4 horas após a exposição e envolvem infiltrados celulares. No entanto, a alergia a fungos não é tão definida quanto alergia a outros antígenos e normalmente, o diagnóstico é difícil, mesmo porque dificilmente os indivíduos são sensíveis a apenas uma espécie (123).

Muitos alérgenos de fungos apresentam atividades de protease, podendo ser um fator a mais na indução de resposta T_H2 (119).

Estudos in vitro demonstraram que extratos de *Alternaria alternata*, *Aspergillus fumigatus* e *Cladosporium herbarum* são capazes de induzir a liberação de IL-6 e IL-8 (153, 154).

Estudos utilizando medidas de biomassa, como o (1-3) β -D-Glucano podem ser encontrados. Beijer et al (155), em 2003, demonstraram uma resposta de diferenciada de liberação de citocinas identificadas através de amostras sanguíneas entre indivíduos atópicos e não-atópicos em residências com alta e baixa concentrações de glucanos. Em residências com altas concentrações de glucanos, houve maior liberação de TNF- α , porém não houve diferença na liberação de IL-4 e IFN- γ . Entre os não-atópicos, a razão IFN- γ /IL-4 foi maior no grupo exposto a altas concentrações de glucanos, sugerindo resposta T_H1 . Apesar da importância dos resultados, os autores reconhecem que não é possível estabelecer uma relação causal entre mofo e resposta inflamatória, dado que as condições de crescimento dos mesmos são similares

às condições de crescimento de bactérias em ambientes internos, podendo haver então um efeito de amplificação da resposta devido à exposição simultânea a ambos os agentes. Um estudo complementar demonstrou aumento de TNF- α e IL-6 no fluido nasal de crianças que freqüentavam escolas com alta quantidade de mofo (156). Apesar de terem sido conduzidos em ambientes internos, esses estudos demonstram a importância dos fungos na participação em mecanismos de liberação de citocinas pró-inflamatórias.

Em grupo pequeno de trabalhadores que lidam com lixo, Sigsgaard et al (157), em 2000, encontraram aumento da produção TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 na análise sanguínea após exposição in vitro a altas doses de (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucanos, demonstrando mecanismo pró-inflamatório.

Modelos animais também ajudam a esclarecer os mecanismos de resposta inflamatória. Young et al (158), em 2006, observaram além de outras respostas, o aumento da produção de TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12p70 no lavado broncoalveolar após um dia da administração do glucano em ratos.

Estudos que demonstraram resposta T_H2 após exposição a (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucanos de *Sclerotinia sclerotiorum*, *Cladosporium herbarum*, *Penicillium chrysogenum* e de leveduras em camundongos previamente sensibilizados por ovalbumina podem ser encontrados na literatura e ressaltam a importância do mecanismo de resposta alérgica em indivíduos previamente sensibilizados por outros agentes (159, 160) .

Ainda, o (1 \rightarrow 3)- β -D-Glucano pode agir sinergicamente com endotoxinas na produção de resposta inflamatória (161). Resultados de estudos com modelos animais mostram que pode existir uma resposta modular complexa, como elucidada na figura 3:

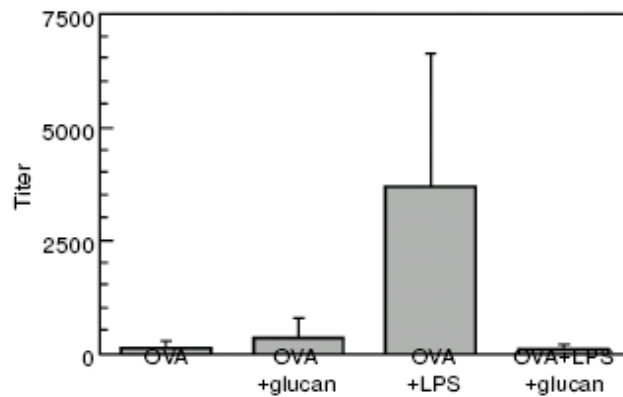


Figura 3. Gráfico de produção de anticorpos específicos para ovalbumina por cobaias expostas a ovalbumina, ovalbumina+glucanos, ovalbumina+endotoxina, ovalbumina+endotoxinas+glucanos. Fonte: Rylander et al., 1998

A revisão da literatura mostra em vários momentos que fungos, bactérias e outros componentes do material inalável podem atuar individualmente ou sinergicamente de forma a levar a mecanismos de resposta inflamatórias diferenciados, com supressão, amplificação e modificação da razão T_H1/T_H2 . Estudos que realizem a medição de diversos componentes e de respostas inflamatórias são importantes na resposta a essa questão recente e ainda não solucionada.

Fungos, material particulado e poluição

Existe uma ampla gama de estudos que atentam para a contribuição relativa da endotoxina associada ao material particulado, porém poucos são os estudos que possuem os mesmos objetivos em se tratando de fungos.

Esporos de fungos podem variar entre 1 e 30 μ m, sendo mais freqüentemente associados a partículas PM_{10} (162). No entanto, esporos menores, como provenientes de gêneros importantes como *Aspergillus sp*, *Cladosporium sp* e *Penicillium sp*, fragmentos, como material citoplasmático e paredes celulares (60, 163) e ainda, micotoxinas como as provenientes de

Stachybotrys chartarum - deuteromineo possivelmente associado a casos de hemorragia pulmonar em crianças (164) – podem ser encontrados no $PM_{2,5}$ ou ainda em partículas menores (165). Estudos já demonstraram que existe uma correlação positiva entre geração de material particulado e contagem total de fungos e de *Penicillium/Aspergillus*, sendo esse efeito fortemente influenciado pela temperatura (66).

Um estudo realizado na Amazônia estimou a contribuição relativa de fungos e compostos derivados presentes na atmosfera e no material particulado. No caso de esporos ativamente liberados em tempo úmidos (i.e., ascósporos e basidiósporos), foi considerado que a contribuição de fungos no PM_{10} é devida principalmente a esporos e não seus solutos (que contribuíam apenas em 5 a 10%). Em períodos noturnos, a contribuição relativa chegou a 45%, em períodos diurnos, foi estimada contribuição de 25% e, em média, foi estimado 35%. Ainda, cálculos realizados a partir de coletas do estudo e coletas em outras regiões do mundo mostraram uma estimativa de emissão total de esporos na atmosfera de 50×10^{12} gramas por ano (63).

Em Cubatão, São Paulo, após análise de duas áreas impactadas por diferentes níveis de poluição, houve uma correlação de 58% dos gêneros de fungos, valor considerado baixo. *Alternaria alternata*, *Aspergillus candidus*, *A. restrictus*, *Cladosporium cladosporioides* e *Periconia atropurpurea* foram isolados exclusivamente a partir de áreas poluídas, enquanto *Aspergillus zonatus*, *A. versicolor* e *Nigrospora oryzae* foram isolados apenas nas regiões menos afetadas pela poluição. Ainda, espécies não-esporulantes em meio de cultura foram encontradas em valores mais altos em regiões mais poluídas (166), concordando com estudos anteriores conduzidos em Santos, São Paulo por Purchio et al (167).

- *Influência dos elementos químicos nos contaminantes biológicos*

Apesar de freqüentes na literatura os estudos que classificam os efeitos da poluição atmosférica, em especial do material particulado sobre a saúde, assim como a participação da composição nos mecanismos de resposta alérgica, inflamatória e tóxica, também poucos são os estudos que avaliaram a correlação entre os componentes do material particulado em relação a possíveis efeitos de estímulo ou inibição. As pesquisas são ainda mais raras em se tratando de componentes biológicos.

Por exemplo, é possível que metais presentes no material particulado, como chumbo, zinco e cádmio sejam depositados na vegetação, levando a efeitos deletérios sobre a microflora filoplana, reduzindo assim, a quantidade e diversidade, além de modificar a morfologia. Aparentemente, bactérias e leveduras são mais susceptíveis a esses elementos do que fungos filamentosos (168).

Um estudo conduzido por Adhikari et al (66), em 2006, encontrou resultados de correlação negativa entre zinco e basidiósporos, com defasagem de 6 dias para a liberação de esporos. Mastalerz et al (169), em 1998, encontraram menor concentração de fungos da ordem Mucorales em material particulado com alta concentração de chumbo. Ainda, foi perceptível a adesão de material citoplasmático liberado por pólen e fungos às partículas, sendo sugerida uma maior disponibilidade do bioaerossol com o aumento de material derivado da combustão e crosta no ar (figura 4). Um estudo conduzido durante o inverno em Taiwan demonstrou uma correlação positiva entre o fungo do gênero *Cladosporium* e hidrocarbonetos, sabidamente provenientes de queima de combustíveis fósseis (170).

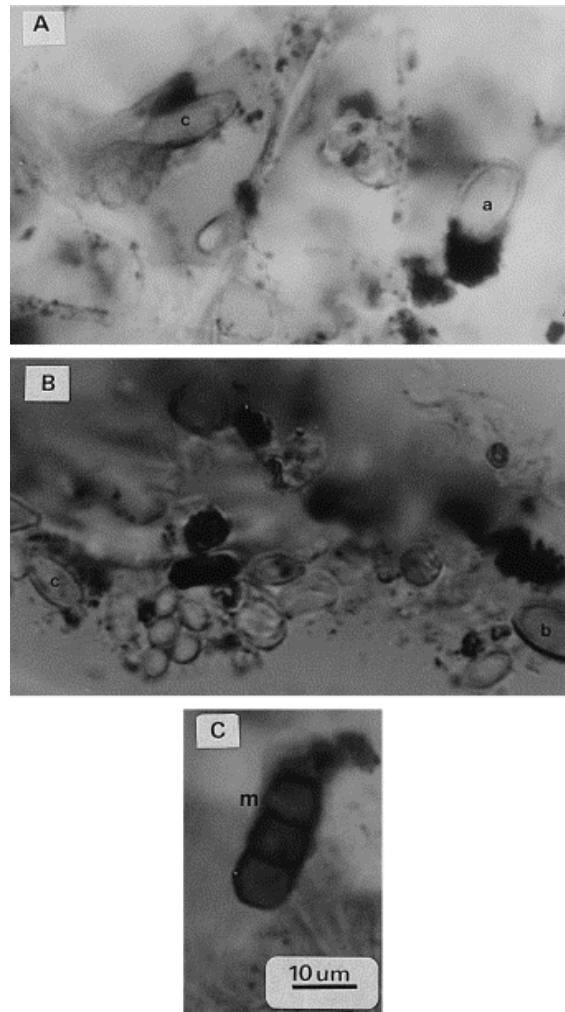


Figura 4. Esporos encontrados no material particulado da atmosfera de Brisbane, Austrália. A: Tipos “a” e “c”. B: Tipos “c” e “b”. C: tipo “m”. Fonte: Mastalerz *et al.*, 1998.

Um estudo conduzido em Cincinnati não encontrou correlação significativa entre bactérias e material particulado total, no entanto foi descrita uma correlação moderada entre bactérias e hidrocarbonetos (171).

- Metodologias para análise de fungos e bactérias

Existem três métodos básicos de detecção de microrganismos em aerossóis: medição de partículas viáveis, contagem e identificação de esporos viáveis e não viáveis em microscópio e medições de marcadores (que compreende microrganismos viáveis e não viáveis, além de fragmentos dos mesmos). Apenas como simplificação, os dois últimos métodos serão referidos como medidas de “biomassa total”.

Medições de partículas viáveis envolvem a utilização de meios de cultura para contagem e identificação de gêneros, importantes para o estabelecimento de relações entre gêneros e patogenia. No entanto, esse método possui algumas limitações, a saber:

- 1) Apenas 0.1 a 10% dos microrganismos presentes no ar são detectáveis em cultura (172).
- 2) Condições de estresse levam à dessecação, paralisação da replicação, oxidações, ataques por radicais livres e danos pela radiação principalmente em bactérias, que permanecem viáveis, mas não cultiváveis (173).
- 3) No caso de bactérias gram-negativas, endotoxinas podem ser derivadas de células vivas ou mortas, sendo que a estimativa por colônias viáveis pode subestimar o risco real (174).
- 4) Apesar de fungos serem mais resistentes a condições de estresse, o crescimento em cultura depende das condições de incubação, meio de cultura utilizado e densidade de colônias nas placas (175).
- 5) Cultura de fungos não detectam esporos não cultiváveis ou danificados, bem como fragmentos de hifas (175), fontes primárias de alérgenos (120).

Devido a esses fatores, a quantificação de biomassa total gera resultados complementares aos métodos tradicionais de forma a não subestimar a concentração de microrganismos no ar e riscos à saúde gerados pelos mesmos.

Existem vários métodos que quantificam a biomassa total de fungos e bactérias, sendo que não existe nenhuma metodologia ótima para todas as situações (176). Assim, o condutor do experimento deve ser treinado de maneira eficiente de tal forma a escolher o método mais satisfatório para análise dos resultados.

Técnicas para identificação de biomassa total – bactérias.

Amostragem

Para amostragem de biomassa total de bactérias, é utilizada principalmente a análise de endotoxinas.

Análise

Os métodos de análise de endotoxinas são:

- Limulus amebocyte lysate (LAL) e utilização de Fator C (rFC).);
- Espectrometria de massa cromatografia gasosa (CG-MS) e de alta performance;

O Limulus é o método tradicionalmente utilizado e produz resultados relativos à bioatividade da molécula. No entanto, estudos mostram necessidade de padronização de acordo com a amostra e condições utilizadas (177-179). Além disso, esse método possui limitações tais como chances de ocorrerem reações cruzadas e inibição da cascata enzimática por contaminantes ambientais (175). Assim, melhorias no método com implementação de rFC foram desenvolvidos. A utilização de rFC, a enzima de indução da coagulação

do LAL, oferece uma forma de inibir amplificação da cascata devido a reações com glucanos fúngicos, sendo que estudos utilizando essa metodologia começam a ser publicados (180).

O CG-MS apresenta-se como método de detecção mais rápido, porém identifica componentes do LPS independentemente da bioatividade e possui acurácia menor. Estudos mais recentes procuram relacionar o comprimento da cadeia lipídica detectada em CG-MS com o grau de atividade das endotoxinas (181).

Técnicas para identificação de esporos e biomassa total – fungos.

Amostragem

Os métodos de amostragem de esporos estão listados na tabela 2:

Tabela 2 - Métodos para amostragem de esporos. Adaptado de Levetin, 2004

Método de coleção	Amostrador	Comentários
Impactação "slit".	Armadilha de esporos Burkard (Burkard Manufacturing, Ltd, Rickmansworth, UK)	Contagem total de esporos. Determinado pelo vento.
	Lanzoni VPPS 2000 (Lanzoni, S.r.L., Bologna, Italy)	Contagem total de esporos. Determinado pelo vento.
	Amostrador Kraemer-Collins (G R Electric, Manhattan , KS)	Contagem total de esporos.
	Amostrador Burkard contínuo (Burkard Manufacturing, Ltd, Rickmansworth, UK)	Contagem total de esporos. Não determinado pelo vento. Melhor para ambientes internos.
	Allergenco MK-3 (Environmental Monitoring Systems,	Mais eficiente para partículas menores. Melhor para ambientes

	Charleston, SC)	internos.
	Amostrador Burkard personalizado (Burkard Manufacturing, Ltd, Rickmansworth, UK)	Contagem total de esporos.
	Air-O-Cell cassette (Zefon, St. Petersburg, FL)	Contagem total de esporos.
	Cyclex-d (Environmental Monitoring Systems, Charleston, SC)	Armadilha única para contagem total de esporos.
Impactação por braço rotatório.	Amostrador Rotorod (Sampling Technologies/Multidata, St. Louis Park, MN)	Independente da velocidade do vento e direção. Melhor para pólenes do que esporos.
Filtragem		Existem diversos tipos de filtros, variáveis em composição e tamanho dos poros.

Análise

A análise das amostras de acordo com os métodos de coleta estão listados na tabela 3.

Tabela 3 - Análise de amostras de fungos de acordo com método de coleta. Adaptado de Levetin, 2004

Método de análise	Amostragem utilizada	Comentários
Microscopia	Impactadores "slit"/filtragem	Identificação de quantidade total de esporos, porém não é possível distinguir espécies no caso de esporos similares. Esse fator é de especial importância no caso de

		<i>Pencillium e Aspergillus</i> , fungos comuns e indistinguíveis pelo método.
Bioquímica	Filtragem	Identificação da biomassa total*.
Imunoquímica	Impactadores "slit"/ filtragem	Para identificação de alérgenos, porém existe limitada disponibilidade de testes no mercado.
Análise por PCR (polymerase chain reaction)	Impactadores "slit"/ filtragem	Elimina necessidade de microscopia. Mesmo assim, com uso limitado. Método dispendioso financeiramente.

*Identificação de biomassa total.

Existem dois marcadores de biomassa total em fungos: ergosterol e (1-->3)- β -D-Glucano, componentes da membrana e parede celular dos fungos, respectivamente.

Os métodos de extração para cada um desses componentes estão representados na tabela 4.

Tabela 4 – Métodos de extração de ergosterol e (1-->3)- β -D-Glucano

Marcador de biomassa	Quantificação
Ergosterol	- cromatografia líquida de alta performance/ HPLC, mais utilizado em agricultura (Saraf <i>et al.</i> , 1997). -Espectrometria de massa-cromatografia gasosa/CG-MS (Saraf <i>et al.</i> , 1997) .
(1-->3)- β -D-Glucano	-modificação do método de Limulus (Foto <i>et al.</i> , 2004). - ELISA (Milton <i>et al.</i> , 2001).

Foto et al (182), em 2004 realizaram modificações no método de Límulus para extração de glucanos e proteriormente Foto et al (183), em 2005, fizeram

uma comparação do método com extração de ergosterol, endotoxinas e utilização de air-o-cell. Foi constatado que existia uma forte correlação entre níveis de glucanos, ergosterol e fungos visíveis em residências. No entanto, ergosterol aerolizado estava mais relacionado com mofo visível do que os glucanos. Amostrador air-o-cell e endotoxinas não estavam relacionados a nenhum dos outros parâmetros. Em geral, os estudos mostram ergosterol como uma boa medida para biomassa, enquanto glucanos apresentam maior correlação com efeitos na saúde. No entanto, os componentes (1-->3)- β -D-Glucanos não são específicos da parede celular de fungos, podendo ser encontrados em plantas e algumas bactérias (174).

Não apenas a comparação entre diferentes componentes leva a diferentes análises, mas também diferentes formas de extrair o mesmo componente podem levar a resultados discordantes. Saraf et al. (175), em 1997, utilizaram GC-MS para determinação de ergosterol e encontraram, pela primeira vez, correlação entre ergosterol e cultura de fungos.

Algumas considerações

Pelo apresentado na literatura, a medição de contaminantes, a associação entre eles e o material particulado e verificação de tipos de resposta inflamatória são tópicos recentes na literatura, porém estudos são necessários a fim de sanar possíveis deficiências, a saber:

1- Não existe um consenso na literatura a respeito do melhor método de medição de contaminantes biológicos, portando comparações de métodos ainda se fazem necessárias.

2- Apesar do estabelecimento de relações entre tais contaminantes biológicos e efeitos inflamatórios, não é possível estabelecer uma relação causal entre esses agentes e doenças respiratórias. Dessa forma, estudos de medições em diferentes localidades do mundo também são necessários a fim de facilitar o esclarecimento do papel de bactérias e fungos nos sintomas respiratórios.

3- Existem estudos recentes que avaliam a quantidade de endotoxina associada ao material particulado, porém em se tratando de fungos, os estudos são mais raros.

4- Mais raros ainda são os estudos que identificam possíveis efeitos de interação (inibição/aumento da liberação) entre componentes químicos e biológicos do material particulado.

5- Existem controvérsias a respeito de mecanismos de sinergia entre os diferentes componentes do material particulado na deflagração de resposta inflamatória T_H1 ou T_H2 .

Objetivos

Devido ao número limitado de estudos, esta tese teve como objetivos gerais:

- comparação entre metodologias de amostragem de fungos.
- avaliação da contribuição relativa de endotoxinas e fungos no $PM_{2,5}$.
- avaliação de efeitos de correlação entre componentes químicos, fungos e bactérias no $PM_{2,5}$.
- correlação entre os componentes citados com fatores meteorológicos.
- avaliação da participação dos fungos associados ao $PM_{2,5}$ na liberação de citocinas de resposta T_H1 e T_H2 em modelo de instilação em ratos.

O estudo foi dividido em duas partes que serão tratadas em separado durante o restante da tese, devido às diferenças de objetivos.

1º parte: experimentos conduzidos em Boston, Massachusetts, sob supervisão da Dra. Christine Rogers e colaboração de Michael Muilemberg e Prof. Donald Milton.

Esta parte do estudo teve como objetivos:

- (1) Avaliar a concentração e gêneros de fungos associados a partículas ambientais concentradas de diâmetro menor do $2,5\mu m$, da atmosfera de Boston;
- (2) Comparar metodologias de contagens de esporos totais e cultura provenientes de amostradores de ar de curta e longa duração;
- (3) Correlacionar tais achados a fatores meteorológicos durante a primavera e verão de Boston.

2º parte: experimentos conduzidos na Região Metropolitana de São Paulo no Laboratório de Poluição Atmosférica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Esta parte do estudo teve como objetivos:

(1) Estabelecer quantidade de esporos e endotoxina em relação à concentração de $PM_{2,5}$ a partir da atmosfera da Região Metropolitana de São Paulo;

(2) Estabelecer correlações e efeitos de interação entre fungos anemófilos, endotoxinas, elementos químicos e aspectos meteorológicos;

(8) Avaliar efeitos de indução de resposta inflamatória em ratos mediada por fungos associados a uma dada concentração de $PM_{2,5}$.

Métodos

- 1º parte - Boston

Área de estudo

Todas as amostras foram coletadas durante a primavera e verão na região de Boston, Massachusetts, USA. Um total de 14 amostras de ambiente externo foi coletado no telhado de Harvard School of Public Health e 8 amostras foram coletadas no Concentrador de Partículas Ambientais durante o mesmo período na primavera e 1 amostra foi coletada no verão. A figura 5 mostra a disposição dos amostradores em ambientes externo.

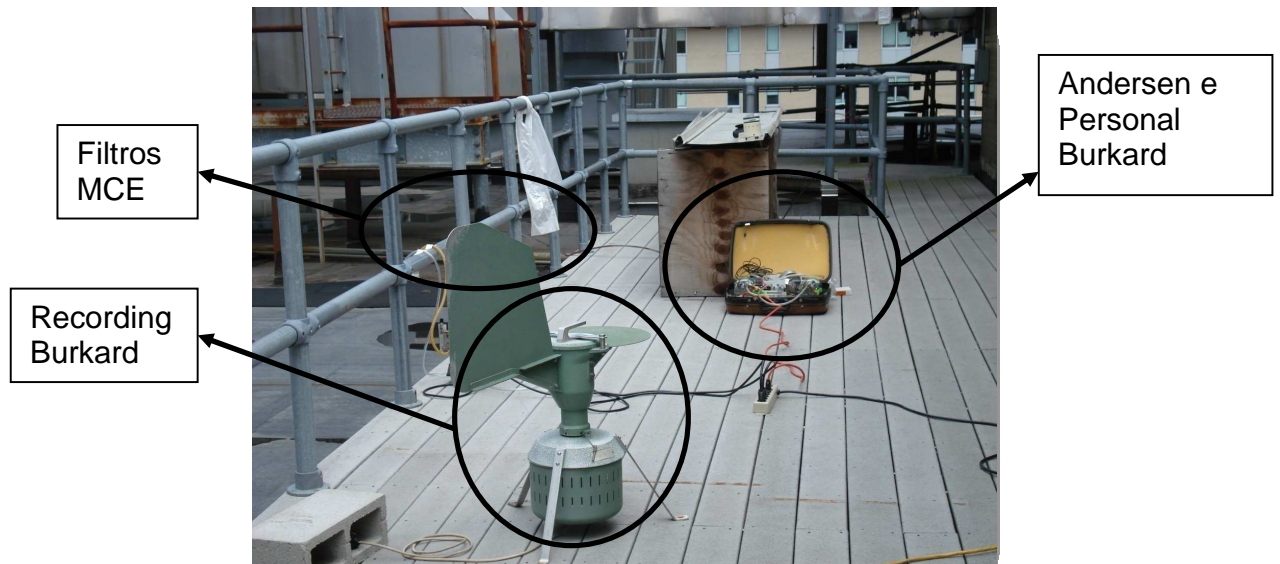


Figura 5: Disposição dos amostradores de ar no telhado da Universidade de Harvard.

Amostradores para fungos anemófilos

CAPs (Concentrador de Partículas Ambientais) e parâmetros meteorológicos. A massa de CAPs foi medida continuamente utilizando “tapered element oscillating microbalance”. Intervalos de 5 minutos foram utilizados para integrar as medidas, resultando em uma concentração final de microgramas por metro cúbico. Dados meteorológicos foram fornecidos pelo “National Weather Service station” no Logan International Airport (Boston, MA).

Filtros MCE (Mixed cellulose ester filters, 0,8 μm , 25mm de diâmetro) foram alocados em suportes de filtro de 25 mm e montados em monitores de análise de bioaerossol para filtros de 25 mm (SKC Company).

Os filtros foram alocados antes da concentração de partículas e depois da concentração de partículas no Concentrador de Partículas por 5 horas a 2 L/min e 1 L/min, respectivamente. Após a amostragem, os filtros foram cortados na metade com tesoura estéril e uma das partes foi colocada em uma lâmina de microscopia para contagem total de esporos e a restante foi dissolvida em 1 mL de Tween 20 (Difco laboratories, Detroit, MI) em solução 0.05% diluída em água estéril para cultura.

Para contagem total, após alocar os filtros nas lâminas limpas, foi adicionado 50 a 100 μL de Triacetina (C2:0 - Anshan Noble Chemicals Company) até que o filtro fosse contemplado em toda a superfície. A lâmina foi deixada para secar naturalmente ou com auxílio de movimentos rápidos pelo bico de Bunsen até que o filtro ficasse transparente. Após esse procedimento, ácido láctico com fucsina ácida (Merck & Co) e lamínulas foram adicionados para identificação e contagem direta em microscopia baseadas em morfologia dos esporos. A análise consiste em estabelecer campos de visão do microscópio antecipadamente à análise. Em todas as contagens de esporos que serão referidas no presente estudo, foi utilizada metodologia de análise a cada 2 cm de filtro, horizontal e verticalmente, totalizando a área do filtro. Existe uma impossibilidade de análise do filtro em toda a superfície, sendo que a

metodologia realizada resultou em tempo de leitura de cada lâmina de aproximadamente 3 horas. Abaixo, pode ser visualizada a fórmula para cálculo da concentração de esporos por metro cúbico de ar:

$$\text{Esporos}/\text{m}^3 = \frac{\text{número de esporos do gênero} * \frac{\text{Área total do filtro}}{\text{Área do compo de visão} * \text{número de campos}}}{\text{tempo de amostragem} * \text{vazão}}$$

Para cultura, os filtros foram vortexados por 10 minutos em Tween 20 e alíquotas de 100µl foram plaqueadas em meio de cultura MEA (Malt Extract Agar – reagentes Difco laboratories, Detroit, MI) em duplicatas. As placas foram incubadas em temperatura ambiente por 3 a 15 dias para contagem e identificação baseada na morfologia da colônia e microscopia. Abaixo, encontra-se a fórmula para cálculo das unidades formadoras de colônia (UFC) por metro cúbico de ar:

$$\text{UFC}/\text{m}^3 = \frac{\left(\frac{\text{número de colônias do gênero}}{\text{volume plaqueado}} \right) * \left(\frac{\text{Volume da suspensão}}{\text{volume plaqueado}} \right)}{\text{tempo de amostragem} * \text{vazão}}$$

Andersen e Personal Burkard. O amostrador de ar Andersen operou a 28,3L/min e o amostrador Personal Burkard (Burkard Manufacturing Co., Ltd., Rickmansworth, United Kingdom) operou at 11,4 L/min. Os amostradores de ar foram utilizados para uma comparação entre contagens totais e cultura realizadas por amostradores de curta duração. As amostras foram coletadas simultaneamente por períodos de 5 minutos nos seguintes intervalos: t=0 min, t=15 min, t=30 min, t=45 min, t=60 min, t=90 min, t=120min, t=150 min, t=180 min, t=210 min, t=240 min, t=270 min e t=300 min, completando 5 horas e 13 amostras para cada amostrador em ambiente externo. Para o amostrador Andersen, a amostragem foi feita em meio MEA (reagentes Difco laboratories, Detroit, MI) e o cálculo de colônias foi realizado através da correção de orifício positivo de acordo com Andersen (184), em 1958. A montagem do Burkard foi

realizada utilizando fitas Melinex, gelvatol e geléia de glicerina conforme descrito em Rogers et al (185), em 2001. A leitura de contagem de esporos dispendiou aproximadamente 3 horas. Abaixo, encontram-se as fórmulas para cálculo da concentração de UFCs (Andersen) e esporos (Burkard) por metro cúbico de ar:

$$UFC/m^3 = \frac{\text{número de colônias do gênero} * \text{conversão Andersen} / \text{Total de colônias}}{\text{tempo de amostragem} * \text{vazão}}$$

$$\text{Esporos}/m^3 = \frac{\text{número de esporos do gênero}}{\text{tempo de amostragem} * \text{vazão}}$$

Filtro MCE e Recording Burkard. Filtros MCE e Recording Burkard foram utilizados para comparação entre contagem total de esporos e cultura para exposições de longo prazo. Filtros MCE (Mixed cellulose ester filters, 0,8 µm, 25mm de diâmetro) foram alocados em suportes de filtro de 25 mm e montados em monitores de análise de bioaerossol para filtros de 25 mm (SKC Company).

A coleta ocorreu em ambiente externo por 5 horas a 4L/min. Após a amostragem, os filtros foram cortados na metade com tesoura estéril e os mesmos procedimentos descritos na seção CAPs foram adotados. O cálculo para concentração de esporos e UFCs por metro cúbico de ar já foram apresentados no CAPs.

Recording Burkard (Burkard Manufacturing Co., Ltd., Rickmansworth, United Kingdom) operou a 10 L/min e foi ligado um dia antes do começo do protocolo e desligado após o último dia. Para comparação com as contagens totais de esporos fornecidas pelos filtros MCE, cada lâmina foi analisada no período de 5 horas correspondente às outras amostras. A coleção, montagem (utilizando fitas melinex, gelvatol e geléia de glicerina) e contagem foram realizadas de acordo com Rogers et al (185), em 2001. Essas metodologias apresentaram tempo de leitura de cada lâmina de aproximadamente 3 horas. Os cálculos para

concentração de esporos por metro cúbico através do Recording Burkard é mostrada abaixo:

$$\text{Esporos/m}^3 = \frac{\text{número de esporos do gênero}}{\text{tempo de amostragem} * \text{vazão} * \frac{\text{diâmetro do campo de visão} * \text{número de varreduras}}{\text{Comprimento do traço analisado}}}$$

Identificação dos fungos anemófilos

De forma geral, os esporos foram divididos em três grandes grupos: Ascomicetos, Basidiomicetos, Mixomicetos e Deuteromicetos (ou fungos imperfeitos). Apesar de chaves de identificação serem importantes para fungos raros, na maior parte dos casos, a separação nos grupos foram feitas da seguinte forma, de acordo com Haines et al (117), em 2000:

- Ascósporos. Ausência completa de cicatrizes de formação do esporo ou de conexão e ramificações, dado que são formados separadamente em ascos. Às vezes encontrados em grupos de 8 (usual em Diatrypaceae). Frequentemente septados e longos (em proporção de 4:1).
- Basidiósporos. Principal característica de distinção é presença de um apículo descentralizado onde o esporo fora anexado no basídio. Dessa forma, são assimétricos. Com exceção de casos raros, basidiósporos não apresentam septos e nunca apresentam ramificações.
- Mitósporos. Assim denominados por serem provenientes exclusivamente de reprodução assexuada (mitose) e pertencentes aos Deuteromicetos. O termo correto nesse caso, é a denominação de conídio em detrimento de esporo, porém para efeitos práticos, foram nomeados esporos. A principal característica de distinção desse grupo é a presença de cicatriz simétrica de nascimento do esporo, onde era anexado ao conidióforo. Únicos a formarem cadeias. Cicatrizes em duas extremidades dos esporos isolados denotam que já estiveram em cadeia.

Quando não foi possível visualizar as características acima, os esporos entraram no grupo dos “outros/não identificados”.

Após essa identificação inicial, os esporos foram separados em famílias, gêneros e espécies, de acordo com a possibilidade de distinção. Para tanto, foi necessário treinamento de 6 meses em Harvard School of Public Health sob supervisão da Profa. Christine Rogers. As seguintes referências foram utilizadas para a identificação:

- Barnett, .L., & Hunter, B.B., 1975. Illustrated Genera of Imperfect Fungi (3rd ed.). Burgees Publ.Co. Minneapolis.
- Ellis, M.B. 1971. Dematiaceous Hyphomycetes. International Mycological Institute. CAB International, Surrey, UK.
- Haines, J. Escamilla, B., Muilenberg, M. L., Gallup, J., Levetin, E., 2000. Mycology of the air. An introduction to the sampling and identification of airborne fungus spore. Tucson, Arizona.
- Hanlin, R.,1990. Illustrated genera of ascomycetes. Published by The American Phytopathological Society, 3340 Pilot Knob Rd, St. Paul, Minnesota.
- Lacaz, C.S., Porto, E., Heins- Vaccari, E. M., de Melo, N.T., 1998. Guia para identificação: fungos, algas e actinomicetos de interesse médico. Sarvier, 445pp.
- Pegler, D.N., & Young, T.W.K., 1971. Basidiospore Morphology in the Agaricales. J. Cramer, Germany.
- Samsom, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., 2004. Introduction to food and airborne fungi. Centraalbureau voor Schimmelcultures, The Netherlands.
- Smith, E.G., 1990. Sampling and identifying allergenic pollens and molds. An illustrated manual for Air Samplers. Blewstone Press, San Antonio, Texas.

Após discussão dos fungos passíveis de identificação, uma planilha, mesma utilizada por pesquisadores de Harvard, foi utilizada no estudo (Apêndice 1).

Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado programa SAS (Statistical Analysis System versão 8), sendo utilizado método paramétrico ou não-paramétrico de acordo com teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov:

- Para análises de filtro MCE e CAPs

Para comparação entre cultura e contagens totais fornecidas pelos filtros MCE (para CAPs e ambiente externo): Wilcoxon Signed Rank Test e correlação de Spearman.

Para comparação entre estações em ambiente externo o teste de Mann-Whitney foi utilizado.

- Para análises de Personal Burkard e Andersen

Foi utilizada one-way ANOVA.

- Para comparação entre filtros MCE e Seven day exposure Burkard

Wilcoxon Signed Rank foi realizado para comparação entre diferenças entre amostradores. Regressão linear foi adotada para checar a acurácia.

Para todos os amostradores, correlação de Spearman foi calculada.

Os testes foram considerados significantes a $\alpha=0.05$.

- 2º parte: São Paulo

Amostrador de ar AVG

Nessa metodologia de amostragem, o $PM_{2,5}$ é coletado a partir de um amostrador de ar de alta vazão (AVG- Energética Ltda), sem que as partículas fossem concentradas. Dessa forma, as amostras não foram coletadas em período de 5 horas, conforme feito em Boston, mas sim de 24 horas.

Tal tempo de amostragem pode se mostrar benéfico, pois retrata uma situação de exposição de 24 horas, em contraste às 5 horas, representativas de uma parcela da exposição diária.

O amostrador de ar coleta $PM_{2,5}$ a $1,13m^3/min$ em filtro de fibra de vidro (Energética Ltda).

Localização das amostras

As amostras foram localizadas na Cidade Universitária Armando Sales de Oliveira – USP, na região do Instituto de Ciências Biomédicas IV localizado na Avenida Lineu Prestes. A partir do volume amostrado em filtros de fibra de vidro, foram inseridas 3 novas portas de coleta em um container, sendo a porta 1 coletada para quantificação de endotoxinas, a porta 2, para análise e quantificação do $PM_{2,5}$ e a porta 3, para análise e quantificação de fungos. Alguns filtros de fibra de vidro foram utilizados para instilação em ratos Wistar (figura 6).

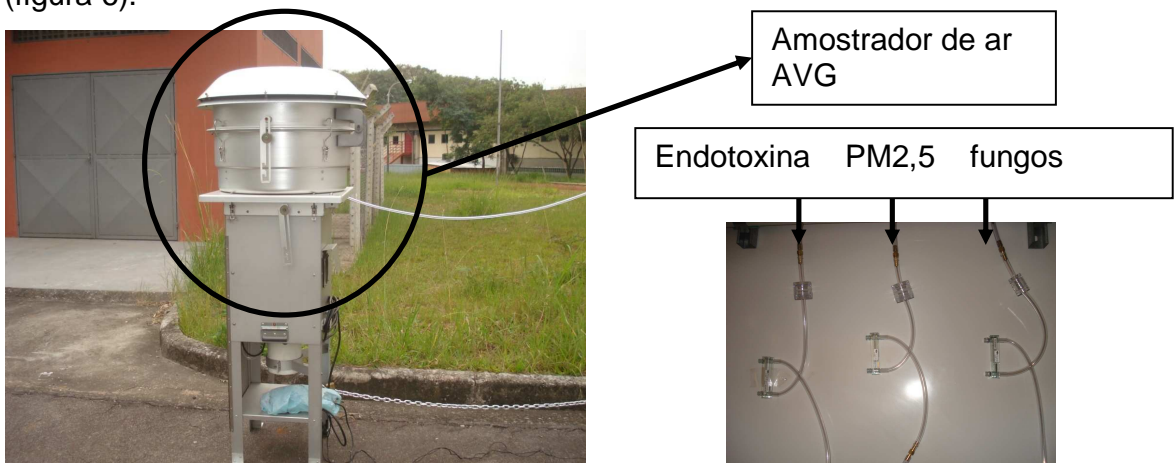


Figura 6. As coletas foram feitas a partir de amostrador de ar de alta vazão para $PM_{2,5}$ e três portas foram desviadas para caracterização do $PM_{2,5}$, fungos e endotoxina. O filtro de fibra de vidro foi utilizado para modelo de instilação em animais.

Foram coletadas 43 amostras distribuídas entre 23 de abril a 16 de julho de 2008 (parte do outono e inverno), sendo analisadas 39 devido a perdas ocorridas por falha na fiação elétrica de coleta.

Amostras de fungos

As amostras de fungos foram coletadas a 1,2 litros por minuto em filtros MCE (Mixed cellulose ester filters, 0,8 μm , 25mm de diâmetro, Millipore Brasil) alocados em suportes de filtro de 25 mm e montados em monitores de análise de bioaerossol para filtros de 25 mm (Millipore Brasil).

Após a coleta, os filtros eram retirados imediatamente do suporte e dissolvidos em Triacetina (Cibraquim, Brasil), para análise posterior em período de no máximo três dias após a amostragem. A mesma metodologia utilizada no sub-item “CAPs” no item “Metodologia Boston” foi utilizada.

Os primeiros filtros foram coletados e cortados pela metade para análise por contagem total de esporos e cultura. Os dados de cultura iniciais foram negativos, ou mesmo com contagens extremamente baixas (i.e. uma a duas colônias por placa – dados não mostrados). Dessa forma, os filtros subseqüentes foram analisados em sua integridade por contagem total de esporos, dispensando em torno de 4 horas para leitura de cada lâmina.

Amostras de endotoxinas

Preparo dos filtros e coleta

As amostras para endotoxinas foram coletadas a 10 litros por minuto em filtros de policarbonato (0,4 μm , 37mm de diâmetro, Milipore Brasil). Os filtros foram alocados em suportes de filtro de 37 mm e montados em monitores de análise de bioaerossol para filtros desse diâmetro (Millipore Brasil). Antes da coleta, os monitores de filtros foram limpos com álcool 70% e deixados em luz

ultravioleta por 15 minutos juntamente com os filtros e suportes, a fim de evitar contaminações *a priori*.

Armazenamento

Após a coleta, foi anexada uma câmara de dessecação na extremidade do suporte de filtros e os filtros foram estocados a 4°C. A câmara consistiu em utilização de um tubo de vidro com sílica em seu interior. As extremidades do suporte do filtro e do tubo de vidro foram anexadas com tubo de borracha (figura 7). Tal procedimento garante a atividade de endotoxina por períodos de até um ano e a não retenção de umidade, que poderia ser responsável por um crescimento de bactérias nos filtros (Milton, D., 2006 - contato pessoal).

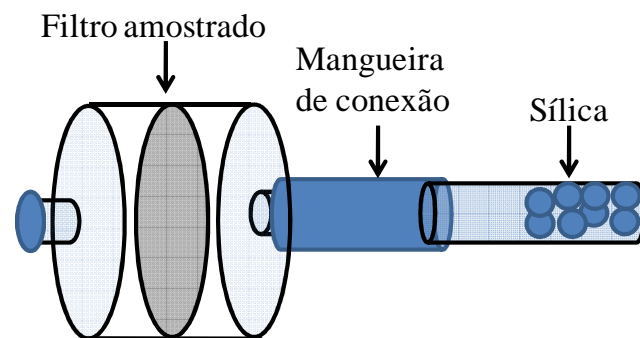


Figura 7. Câmara de armazenamento de filtros de polycarbonato a 4°C para análise de endotoxinas

Extração

O método de extração constituiu de:

1. Abertura dos monitores utilizando um pinça apirogênica (método de esterilização demonstrado no apêndice 2)
2. Verificação da aparência do filtro: filtros com nenhum ou pouco pó eram nomeados “limpos”, filtros com poeira apenas no centro, eram denominados “sujos no centro”, quando eram sujos por toda a superfície

em coloração acinzentada, eram denominados “sujos por toda a superfície” e quando em coloração escura eram denominados “muito sujos”.

3. Extração de todos os filtros em 5 mL de Tween 20 0,05% (Bioagency, Brasil) em água apirogênica (Cambrex, Co). Obtiveram-se apenas resultados de filtros sujos por toda a superfície e muito sujos. Para filtros sujos em toda a superfície era realizada diluição inicial de 1 vez. Um fator de diluição inicial de 6 vezes era realizado caso o filtro estivesse muito sujo. Mais três diluições (36X e 96X) foram utilizadas em duplicatas.
4. Transferência do filtro para um tubo de extração de borossilicato apirogênico (13x100 mm Cambrex, Co) com pinça apirogênica. O filtro era enrolado de forma que a superfície amostrada ficasse para dentro e então o tubo era coberto com parafilm. A análise era realizada imediatamente. Caso houvesse necessidade de repetição, as amostras eram armazenadas 4°C. Um pequeno furo era feito no parafilm para circulação do ar.
5. Os tubos eram colocados em um sonificador por 60 minutos a temperatura ambiente. As amostras eram vortexadas a cada 15 minutos.
6. Em todo o procedimento de diluição, os filtros eram vortexados por um minuto antes da transferência entre tubos.

Análise

1. Os procedimentos foram realizados de acordo com as orientações do kit Limulus Amebocyte Lysate (LAL) Pyrogent-5000 (Cambrex, Co). Esse teste é quantitativo, sendo o procedimento básico de misturar a amostra com reagente LAL em placa apirogênica (Cambrex, Co) de 96 poços, colocada em leitor de placa ELx808LBS (Cambrex, Co) e utilizando o software Win KQCL. A leitura é realizada a partir do tempo anterior à reação completa de turbidez que ocorre devido a uma cascata enzimática (figura 8) onde a

endotoxina cataliza a ativação da proenzima (presente no kit) na forma de coagulase. Essa é ligada na proteína coagulogênio (também presente no kit), que é então hidrolizada, transformando-se em coagulina. A coagulina associa-se em forma gelatinosa e é lida pelo teste. Quanto maior a quantidade de endotoxina, menor o tempo de reação. O limite de detecção do teste é de 0,01 EU/mL.

Proenzima $\xrightarrow{\text{Endotoxina}}$ Coagulase

Coagulogênio $\xrightarrow{\text{Coagulase}}$ Coagulina

Figura 8: Cascata enzimática ocorrida no teste LAL para detecção de endotoxinas

2. Os tempos de reação de cada amostra são comparados com o tempo da curva padrão, em que são utilizadas quantidades conhecidas de endotoxina de *Escherichia coli* 055:B5 em concentrações de 0,01 EU (unidades de endotoxinas) por mL, 0,1 EU/mL, 1 E/mL, 10 EU/mL e 100 EU/mL. A curva padrão foi utilizada apenas quando a reta de regressão assumiu valor de pelo menos 0,98.

3. Além das amostras terem sido plaqueadas em duplicatas em três diferentes concentrações, totalizando seis pontos por amostra, um controle positivo foi adicionado, totalizando 12 pontos por amostra. Cada amostra recebeu uma concentração de 10 EU/mL de endotoxina de *E.coli* para verificação da porcentagem de recuperação de endotoxina da amostra (PPC). PPCs de 50 a 200 são considerados aceitáveis de acordo com o manual. PPCs maiores do que 200 podem demonstrar que a amostra sofre reações de amplificação da reação. PPCs menores podem significar inibição ou mesmo quantidade insuficiente de amostra, que necessite de uma diminuição na diluição.

4. Experimentos pilotos demonstraram a necessidade de modificação no protocolo. Apesar de não fornecido pelo kit, foi utilizado o Beta-blocker (Cambrex, Co), para inibição da reação com $\beta(1-3)$ -D-Glucano presente no material. O Beta-Blocker foi adicionado em concentração de 50 μ L de Beta-blocker para 50 μ L de amostra de filtros desconhecidos no poço, antes da adição do tampão LAL, responsável por iniciar a reação em cascata.

7. O plaqueamento exigiu utilização de ponteira apirogênicas e o layout é o demonstrado na Tabela 5:

Tabela 5 - Layout de distribuição de amostras para detecção de endotoxinas nas placas.

B: solução de tween utilizada no preparo das amostras (controle negativo).

P: endotoxina de padrão de *E.coli* EU/mL em cada diluição (0,01; 0,1; 1; 10; 100).

Letras A, B, C, D, E, F, G: amostras de desconhecidas de filtros em cada diluição (6x, 36x, 96x).

Letras A', B', C', D', E', F', G': controle positivo com adição de endotoxina de *E.coli* a 10 EU/mL em cada diluição de amostra (6x, 36x, 96x).

B	B	A36	A36	B96	B96	D6	D6	E36	E36	F96	F96
P0,01	P0,01	A36'	A36'	B96'	B96'	D6'	D6'	E36'	E36'	F96'	F96'
P0,1	P0,1	A96	A96	C6	C6	D36	D36	E96	E96	G6	G6
P1	P1	A96'	A96'	C6'	C6'	D36'	D36'	E96'	E96'	G6'	G6'
P10	P10	B6	B6	C36	C36	D96	D96	F6	F6	G36	G36
P100	P100	B6'	B6'	C36'	C36'	D96'	D96'	F6'	F6'	G36'	G36'
A6	A6	B36	B36	C96	C96	E6	E6	F36	F36	G96	G96
A6'	A6'	B36'	B36'	C96'	C96'	E6'	E6'	F36'	F36'	G96'	G96'

Amostras de material particulado

Coleta

Filtros de teflon (TefloTM W/Ring, PTFE Membrane W/PMP Ring, 2,0 μ m, 37 mm, Pall Corporation, Michigan, USA) foram utilizados nessa amostragem. Os filtros foram pesados (balança UMX 2, Micronal SA) em sala climatizada antes e depois da coleta para verificação da quantidade de material particulado em microgramas, em triplicatas.

Os filtros eram colocados em placas de petri fechadas e armazenados a temperatura ambiente até o momento de análise.

Eram então introduzidos no EDX-700HS (Shimadzu Corporation, Analytical instruments Division, Japão) para que os resultados fossem emitidos de forma comparativa ao padrão NIST 2783.

Os elementos químicos foram analisados através de Fluorescência de Raio X (EDX). A medição consiste em excitar com raios X os elementos da amostra, os quais tendem a ejetar os elétrons do interior dos níveis dos átomos, e como consequência disto, elétrons dos níveis mais afastados realizam um salto para preencher a vacância. Cada transição eletrônica constitui uma perda de energia para o elétron e esta energia é emitida na forma de um fóton de raios X, de energia característica e bem definida para cada elemento, representados através de linhas espectrais.

Dessa forma foram passíveis de identificação em ppm os elementos químicos: Al, As, Ba, Ca, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Sb, Ti, V, Zn, Rb, S, Si.

Dados meteorológicos

Os dados de temperatura e umidade relativa do ar foram fornecidos pelo Departamento de Ciências Atmosféricas USP/IAG/ACA, Campus da Universidade de São Paulo.

Os dados foram coletados na estação diariamente em intervalos médios de 5 minutos, para então serem convertidos em dados médios diários.

Extração do PM_{2,5} a partir de filtros de fibra de vidro

Após a coleta, os filtros de fibra de vidro (Energética Ltda) foram armazenados em temperatura ambiente, com sobreposição da superfície de coleta. Foram escolhidos para instilação, os filtros dos dias 15 de maio e 22 de maio. Para controle, foi realizada a mesma metodologia com filtro branco.

Tais filtros foram submetidos à sonicação em 100 mL de PBS por período de 5 horas. O material foi então centrifugado a 1800 rpm por 30 minutos e 15°C (Centrífuga GS-6R, Beckman) e o sobrenadante foi removido. O material foi deixado na estufa em temperatura de 50°C por 24 horas para secagem total.

Após esse processo, o material foi pesado e ressuspenso em volume final de PBS necessário para que fosse atingida a concentração de 100 µg a cada 0,3 mL (volume administrado posteriormente nos animais).

Contagem de fungos

Dada a diferença na metodologia de extração desse filtro para os demais analisados, foi realizada uma nova contagem de fungos em câmara de Neubauer.

Dessa forma, 10 µL de cada amostra, inclusive da solução controle, foram adicionados à câmara para contagem diferencial segundo a fórmula:

Contagem de esporos = n° total de esporos nos cinco pontos selecionados na figura $9 \times 5 \cdot 10^4 \times$ volume de PBS para suspensão do $PM_{2,5}$.

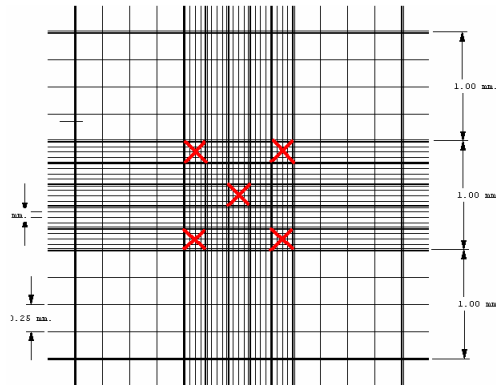


Figura 9. Método de contagem de esporos fúngicos em câmara de Neubauer após extração a partir filtros de fibra de vidro.

Inibição de endotoxinas na amostra

A fim de controlar o experimento para endotoxinas, também indutoras de respostas inflamatórias, foi adicionado o antibiótico Sulfato de Polimixina B – Eurofarma laboratórios Ltda - (liga-se à porção do lipídio A da endotoxina) a concentração de $10\mu\text{g/mL}$ de solução final de $PM_{2,5}$ uma hora antes da instilação, de acordo com outros autores (69, 98). O preparo foi deixado em estufa a 37°C .

Animais

Foram utilizados 24 ratos Wistar machos adultos (8 semanas), pesando aproximadamente 250 gramas, provenientes do biotério central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos entre 22 e 23°C , com umidade controlada e ciclos de noite/dia de 12 em 12 horas. Comida e água foram fornecidas *ad libitum*.

Desenho experimental

Os 24 ratos foram subdivididos em 3 grupos:

- C (n=8): grupo que recebeu solução extraída a partir de filtro branco.
- A (n=8): grupo que recebeu $PM_{2,5}$ a concentração de $100 \mu\text{g}/0,3 \text{ mL}$ e concentração de fungos 21×10^4 esporos/mL ou $6,3 \times 10^2$ esporos/ μg de $PM_{2,5}$.
- B (n=8): grupo que recebeu $PM_{2,5}$ a concentração de $100 \mu\text{g}/0,3 \text{ mL}$ e concentração de fungos 60×10^4 esporos/mL ou 18×10^2 esporos/ μg de $PM_{2,5}$.

Instilação traqueal

Os ratos foram pesados e anestesiados via intraperitoneal com Ketamina (Cristália produtos químicos farmacêuticos Ltda) e Rotum (Bayer S/A) a concentrações de 75 mg/Kg e 15 mg/Kg , respectivamente. Após este procedimento, foram submetidos à intubação traqueal através de um laringoscópio pediátrico adaptado e um tubo de polietileno 14G, que funciona como um tubo endotraqueal (figura 10). Cada solução teste em volume de $0,3 \text{ mL}$ foi injetada vagarosamente e em várias fases inspiratórias separadas, através de uma seringa acoplada ao tubo endotraqueal. Os animais foram submetidos a um período de recuperação entre as instilações, devido ao reflexo de apnéia que ocorre em cada tempo.

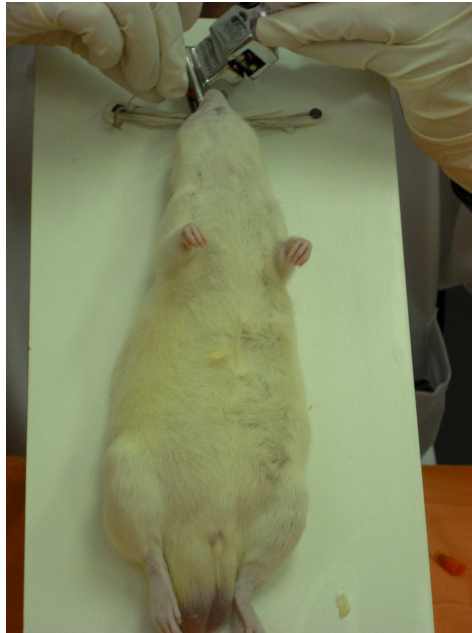


Figura 10. Instilação de fungos e material particulado em ratos machos Wistar.

Grupo C recebeu solução extraída a partir de filtro branco.

Grupo A recebeu $PM_{2,5}$ a concentração de 100 μg e concentração de fungos 21×10^4 esporos/mL

Grupo B recebeu $PM_{2,5}$ a concentração de 100 μg e concentração de fungos 60×10^4 esporos/mL

Lavado broncoalveolar

Após 24 horas, os ratos foram anestesiados e procedeu-se com a eutanásia via secção total da aorta abdominal. Para a realização do Lavado Broncoalveolar (LBA) realizou-se uma traqueostomia. Cerca de 5 ml de PBS foi infundida na traquéia através da cânula traqueal, por 3 vezes consecutivas, totalizando um volume de 15 ml e acondicionado a 4°C até próxima etapa da metodologia.

Contagem global de leucócitos– câmara de Neubauer

Os lavados foram centrifugados a 1600 rpm, por 10 minutos a 5°C (Centrífuga GS-6R, Beckman). O sobrenadante foi alicotado em tubos eppendorf e estocados a -70°C para posterior análise de citocinas.

O “pellet” foi ressuspenso em volume de 1mL de PBS e homogeneizado suavemente. Foram coletados 10µL para adição em câmara de Neubauer. A contagem foi realizada nos campos assinalados na figura 11.

A fórmula utilizada foi:

Contagem total de células/mL= Média da contagem dos quadrantes $\times 10^4 \times$ diluição utilizada na amostra.

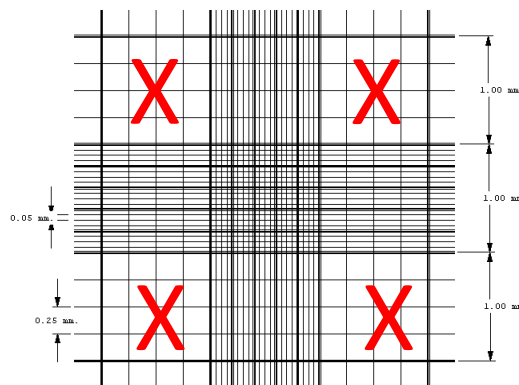


Figura 11. Método de contagem de leucócitos em câmara de Neubauer a partir de suspensão do lavado broncoalveolar

Contagem diferencial de leucócitos

A partir da mesma suspensão de 1mL de PBS, foram coletados 100 µL e adicionados em centrífuga de cytospin (Cytospin 3 - Shandon) e processados a 450 rpm durante 6 minutos. O material depositado na lâmina do cytospin foi corado com Diff Quick (Baxter Dade, Dudingen, Suíça) para contagem diferencial a partir das características morfológicas em microscópio óptico.

O cálculo da quantidade de células por mL de lavado broncoalveolar foi realizado a partir da contagem relativa de cada célula multiplicada pela quantidade total de leucócitos/mL obtida pela Câmara de Neubauer.

Análise de citocinas

O lavado obtido foi testado para citocinas de respostas T_{H1} e T_{H2} : TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-6 usando kits ELISA de captura (BD Phar-Mingen, San Diego, CA).

Os poços foram sensibilizados com 50 μ l de anticorpos monoclonais (capture), durante 12h, entre 4 e 8°C. As placas foram, então, lavadas com PBS-Tween 20 0,05% (PBS-T) e bloqueadas com 200 μ l de PBS-BSA 1%, por 1h, em temperatura ambiente. Após serem novamente lavadas, foram adicionados 100 μ l das amostras de lavado broncoalveolar e os padrões. Em seguida, foram incubadas por 2h, em temperatura ambiente. Após esse período de incubação, as placas foram novamente lavadas com PBS-Tween 20 0,05% e foram adicionados 50 μ l do conjugado "Working detector (detection Ab + avidin-HRP)" em cada orifício, sendo incubado por 1h, em temperatura ambiente. Após esse período de incubação, as placas foram novamente lavadas 10x com PBS Tween 20 0,05% e foram adicionados 50 μ l do substrato (TMB substrate reagent set Pharmigen), sendo incubadas em temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. A reação foi parada com 25 μ l de H₂SO₄ 2N e as leituras foram feitas em comprimento de onda de 450nm (Multiskan EX, USA.).

Os limites de detecção dos testes foram os seguintes: 31,25 pg/mL (TNF- α e IFN- γ), 1,6 pg/mL (IL-4) e IL-6 (78 pg/mL) for IL-6, de acordo com determinação do fabricante.

Análise estatística

Para análise estatística foi utilizado SPSS versão 16.0.

De acordo com os resultados de teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, foram utilizados testes paramétricos ou não paramétricos:

- Comparação da concentração de fungos entre estações – Teste T de student;
- Comparação da concentração de material particulado entre estações – Teste T de student;
- Modelos de regressão linear entre fungos, parâmetros meteorológicos e material particulado, exceto para ascósporos sem pigmentação e material particulado em que foi utilizada correlação através de Spearman;
- Regressão linear múltipla com modelos de interação para fungos, PM_{2,5} e umidade;
- Análise de componentes principais para componentes químicos, seguida de regressão linear em relação a fungos e endotoxinas;
- Regressão linear múltipla com modelos de interação para endotoxinas, parâmetros meteorológicos e material particulado após categorização de variáveis.
- Teste de Kruskal-Wallis para análise de variância da concentração de citocinas presentes no lavado broncoaveolar dos ratos, seguida de comparação múltipla de Dunn.
- Teste de Kruskal-Wallis para análise de variância da contagem total e diferencial de leucócitos presentes no lavado broncoalveolar.

Os testes foram considerados significantes a $\alpha < 0,05$.

Resultados

Resultados Boston

CAPS

Os resultados fornecidos pelos filtros MCE para cultura e contagem total de esporos fúngicos antes de serem concentrados mostraram que contagem total resultou em maior concentração do que a cultura ($p < 0,05$), com valores médios de 1100 esporos/m³ e 245 CFU/m³, respectivamente. Após a concentração do material particulado, o mesmo padrão foi observado ($p < 0,05$), com valores médios de 66878 spores/m³ para contagem total e 7146 CFU/m³ para cultura. Em média, cultura correspondeu a 22% da contagem total antes da concentração e 11%, após a concentração. O Concentrador de partículas foi capaz de concentrar os esporos através de ambas as metodologias, porém não 30 vezes ($p > 0,05$), como é observado para o material particulado total. A cultura e contagem total forneceram maior diversidade de gêneros/grupos depois da concentração, porém não foi encontrada correlação significativa entre ambas as metodologias. A análise demonstrou que 5 de 9 de todos os gêneros analisados por cultura (incluindo freqüentes como *Aureobasidium sp* e leveduras) foram encontrados apenas por esse método. No entanto, a contagem total de esporos foi capaz de coletar 22 gêneros ou grupos adicionais, incluindo basidiósporos, smuts, puffballs, ascósporos and mixomicetos, além de maior quantidade de fungos cultiváveis (tabela 6). Fotos podem ser visualizadas no Apêndice 3.

Tabela 6 - Gêneros e grupos de fungos encontrados no Concentrador de Partículas antes da concentração (“upstream”) e depois da concentração (“downstream”) a partir de metodologias de cultura e contagem total na cidade de Boston, MA. Valores de média seguidos de desvio padrão em parênteses.

	MCE- cultura (UFC/m ³)		MCE- total (Esporos/m ³)	
	Upstream	Downstream	Upstream	Downstream
Mitósporos/cultiváveis				
<i>Alternaria sp</i>	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	26,30 (74,39)
<i>Aureobasidium sp</i>	10,42 (29,46)	52,08 (98,98)	---	---
<i>Botrytis sp</i>	0,00 (0,00)	62,50 (176,78)	2,90 (5,98)	73,38 (105,23)
<i>Cladosporium sp</i>	98,96 (191,51)	1193,01 (1637,19)	133,59 (341,52)	1770,07 (3615,73)
<i>Paecilomyces sp</i>	0,00 (0,00)	99,26 (191,86)	---	---
<i>Penicillium/Aspergillus-like</i>	20,83 (58,93)	2333,33 (2471,26)	57,06 (96,37)	3067,84 (3433,43)
<i>Rhizopus sp</i>	0,00 (0,00)	41,67 (77,15)	---	---
Zigomiceto não identificado	0,00 (0,00)	62,50 (176,78)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Leveduras	26,04 (73,66)	568,01 (1095,52)	---	---
Outros/não esporulantes	88,54 (161,58)	2734,07 (2425,75)	8,29 (17,74)	340,22 (391,33)
Smuts	---	---	8,26 (23,37)	701,26 (1301,58)
Basidiósporos				
<i>Agrocybe-like</i>	---	---	7,29 (15,08)	606,62 (1063,73)
Boletaceae	---	---	0,00 (0,00)	52,60 (148,78)
<i>Coprinus-like</i>	---	---	9,99 (18,87)	493,93 (670,52)
<i>Ganoderma sp</i>	---	---	2,57 (7,28)	0,00 (0,00)
<i>Fomes fomentaria</i>	---	---	0,00 (0,00)	318,59 (739,05)
Basidiósporos hialinos	---	---	701,91 (1024,66)	49328,03 (86625,55)
<i>Panoelus sp/Psathyrella sp</i>	---	---	2,07 (5,84)	0,00 (0,00)

<i>Russula sp/Lactarius/Melanophyllum</i>	---	---	0,00 (0,00)	52,60 (148,78)
Puffball	---	---	4,13 (11,68)	27,59 (78,04)
Outros/não identificados	---	---	2,07 (5,84)	210,41 (595,13)
Ascósporos				
Ascósporos sem pigmentação	---	---	46,84 (100,11)	4660,18 (9099,26)
Diatrypaceae	---	---	28,92 (81,79)	17,04 (48,19)
<i>Leptosphaeria-like</i>	---	---	2,07 (5,84)	87,97 (122,70)
<i>Phaeosphaeria annulata</i>	---	---	0,00 (0,00)	26,30 (74,39)
<i>Pleuroceras tenella</i>	---	---	0,00 (0,00)	55,19 (156,09)
<i>Sporormiella sp</i>	---	---	0,00 (0,00)	27,59 (78,04)
<i>Venturia-like</i>	---	---	2,07 (5,84)	0,00 (0,00)
<i>Xylaeriaceae</i>	---	---	4,13 (11,68)	0,00 (0,00)
Outros/não identificados	---	---	2,07 (5,84)	249,27 (501,27)
Mixomicetos	---	---	4,13 (11,68)	328,37 (461,52)
Outros esporos/não identificados	---	---	157,52 (217,32)	4356,97 (4291,08)

--- Não identificáveis por essa metodologia.

A proporção de unidades formadoras de colônia antes da concentração fornecida pela cultura variou de 3,6 to 101,97 ufc/ μ g de PM_{2.5} (média de 14,8 ufc/ μ g , desvio padrão: 36.6 ufc/ μ g) e os resultados para contagem total variaram de 36,5 a 2159 esporos/ μ g de PM_{2.5} (média de 417 esporos/ μ g, desvio padrão: 853 esporos/ μ g). Uma análise de correlação com dados meteorológicos mostrou que apenas ascósporos incolores foram correlacionados fortemente à CAPs ($\rho=0.89$, $p<0.05$).

Andersen e personal Burkard

A comparação entre esses dois amostradores de curta duração mostrou que Personal Burkard é capaz de coletar uma concentração total de esporos maior do que Andersen ($p < 0,001$), com valores médios respectivos de 2457,68 esporos/m³ e 232,69 CFU/m³ durante a primavera e 21968,38 esporos/m³ versus 439,72 ufc/m³ durante o verão. Em média, cultura correspondeu a 9,5% das contagens totais de esporos durante a primavera e 2% durante o verão. A cada 5 horas, 13 amostras foram coletadas a fim de verificar a variação diária. Os resultados para ambos os amostradores mostraram maiores concentrações de fungos durante o verão ($p < 0,001$), no entanto, não houve uma variação diária significativa ($p > 0,05$) apesar da tendência do Andersen em coletar maior quantidade de fungos durante o verão nos períodos de 2h30 a 5 horas (figura 12) e Burkard de apresentar alguns picos durante o verão nas primeiras horas (figura 13).

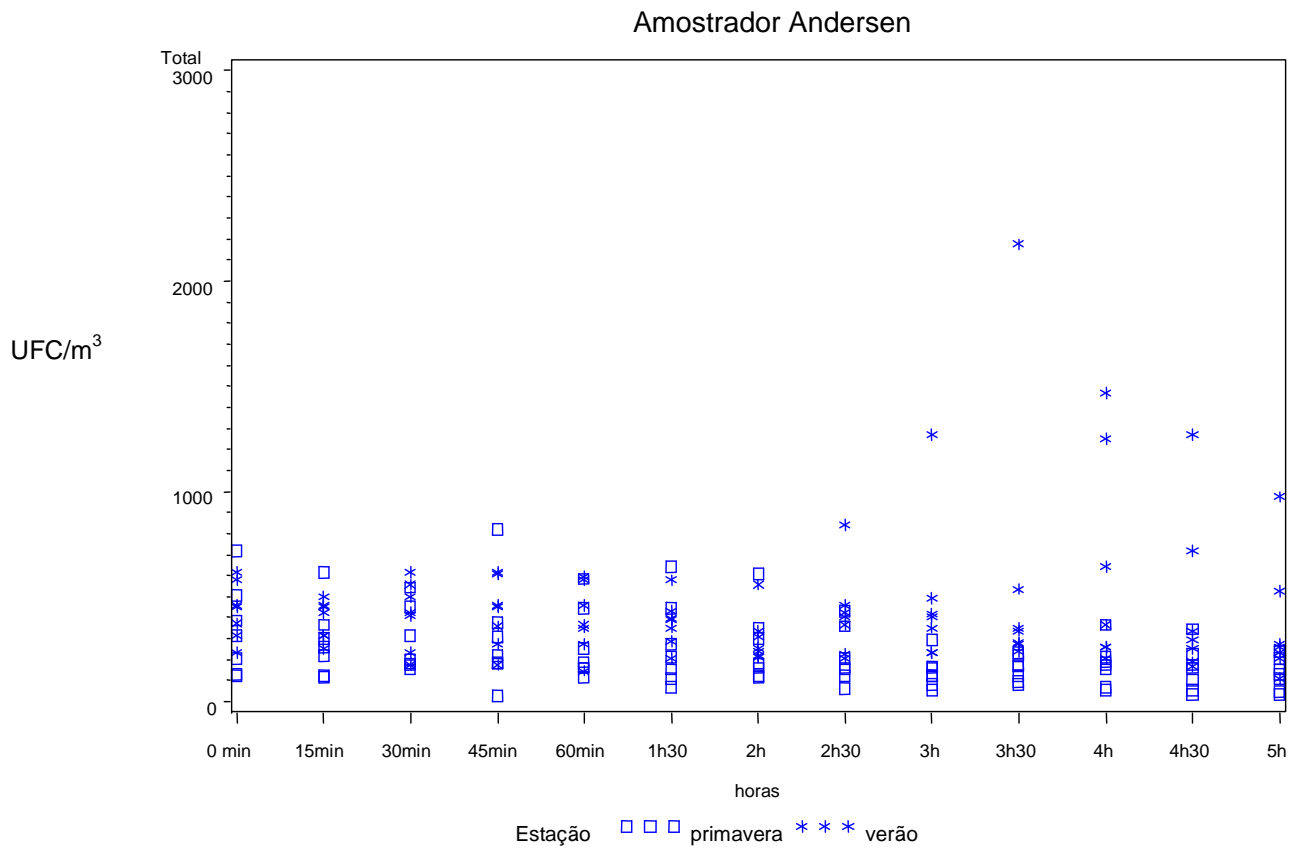


Figura 12. Concentração de fungos coletados pelo amostrador de ar Andersen em período de 5 horas de coletas intervalares de 15 minutos durante a primavera e verão na cidade de Boston, MA. Não houve diferença na periodicidade diária ($p > 0,05$).

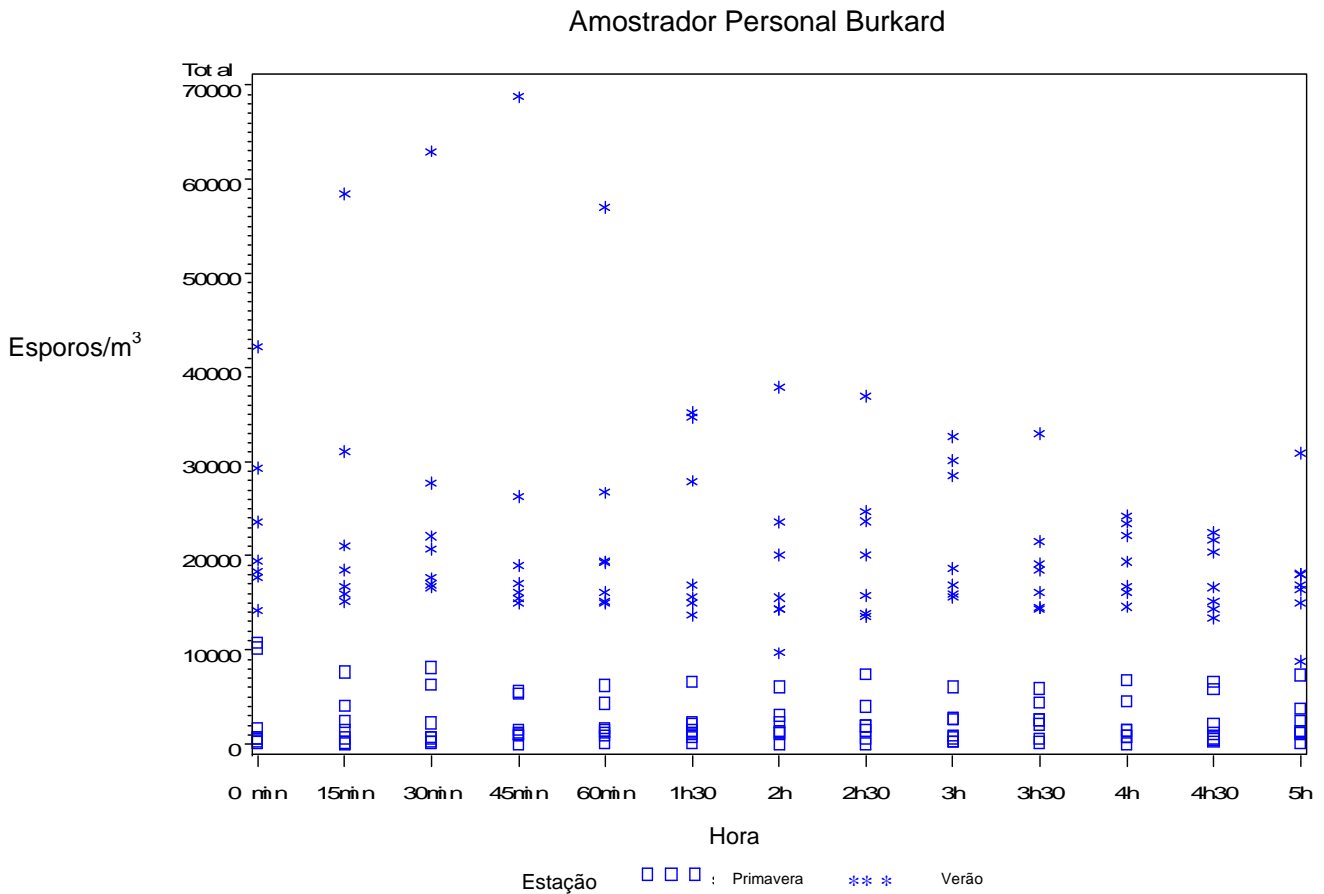


Figura 13. Concentração de fungos coletados pelo amostrador de ar Personal Burkard em período de 5 horas de coletas intervalares de 15 minutos durante a primavera e verão na cidade de Boston, MA. Não houve diferença na periodicidade diária ($p > 0,05$).

Apesar da alta concentração de esporos alcançada pelo Burkard, ambos os amostradores apresentaram mesma variação relativa ($p > 0,05$). Assim, uma correlação moderada foi encontrada entre ambos os amostradores ($\rho = 0,58$, $p < 0,001$).

Quando analisados os fungos cultiváveis, dos 29 gêneros ou grupos, apenas 7 foram encontrados através de ambas as metodologias. Andersen foi capaz de coletar 13 gêneros não encontrados nas amostras do Burkard, sendo que este foi capaz de coletar 7 gêneros cultiváveis não encontrados no Andersen (tabela 7). Ainda, o personal Burkard foi capaz de coletar 32 gêneros ou grupos adicionais, incluindo basidiósporos, smuts, puffballs, ascósporos e mixomicetos. Uma correlação moderada foi encontrada entre as metodologias ($\rho = 0.33$). Quando analisados os gêneros comuns coletados por ambos, foi possível constatar que *Pen/Asp*, *Cladosporium sp*, *Alternaria sp*, *Botrytis sp* e *Curvularia sp* não são dependentes do horário da amostra, porém dependentes da estação e amostrador, com concentrações maiores durante o verão. *Epicoccum sp* mostrou efeito de estação (encontrado apenas no verão) não dependente de amostrador.

Tabela 7 - Gêneros e grupos encontrados a partir de amostradores de ar de curta duração Andersen e Personal Burkard na cidade de Boston, MA. Valores de média seguidos de desvio padrão em parênteses.

	Personal Burkard (Esporos/m ³)		Andersen (UFC/m ³)	
	Primavera	Verão	Primavera	Verão
Mitósporos/cultiváveis				
<i>Alternaria SP</i>	4,24 (10,24)	21,79 (43,71)	1,70 (3,82)	1,39 (5,10)
<i>Aureobasidium SP</i>	---	---	7,79 (14,01)	2,90 (6,75)
<i>Botrytis SP</i>	3,28 (10,76)	16,00 (19,16)	0,08 (0,78)	0,51 (2,25)
<i>Cercospora SP</i>	0,00 (0,00)	1,35 (7,95)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
<i>Choanephora SP</i>	---	---	0,00 (0,00)	0,43 (1,78)
<i>Cladosporium SP</i>	88,88 (153,68)	1210,53 (1182,81)	30,75 (21,12)	239,41 (182,59)
Coelomicetos	---	---	0,91 (2,73)	0,00 (0,00)
<i>Crysonilia SP</i>	---	---	0,16 (1,48)	0,33 (1,54)
<i>Curvularia SP</i>	0,39 (2,59)	3,28 (9,03)	0,00 (0,00)	0,25 (1,73)
<i>Drechslera-like</i>	0,00 (0,00)	1,16 (5,10)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)

<i>Epicoccum SP</i>	0,96 (4,02)	4,05 (10,49)	0,00 (0,00)	0,77 (2,61)
<i>Fusarium SP</i>	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,25 (1,35)
<i>Monochaeta SP</i>	---	---	0,08 (0,79)	0,00 (0,00)
<i>Nigrospora SP</i>	0,00 (0,00)	0,19 (1,84)	0,00 (0,00)	0,08 (0,79)
<i>Oidium SP</i>	1,35 (9,51)	1,54 (5,64)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Outros mitósporos/ não identificados	6,55 (3,24)	13,30 (24,16)	147,37 (140,90)	87,69 (62,44)
<i>Paecilomyces SP</i>	---	---	0,64 (2,09)	0,66 (2,42)
<i>Penicillium/Aspergillus-like</i>	82,32 (160,98)	239,83 (250,58)	16,98 (17,06)	72,29 (160,40)
<i>Periconia SP</i>	0,00 (0,00)	0,39 (2,59)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
<i>Pestalotia-like</i>	0,00 (0,00)	0,19 (1,84)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
<i>Pithomyces SP</i>	0,19 (1,84)	2,70 (9,03)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
<i>Polytrincium trifolli</i>	0,00 (0,00)	3,66 (7,63)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
<i>Thaminidium SP</i>	---	---	0,09 (0,85)	0,00 (0,00)
<i>Torula SP</i>	1,54 (8,12)	4,24 (29,86)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
<i>Trichoderma SP</i>	---	---	0,08 (0,77)	0,08 (0,77)
<i>Ulocladium SP</i>	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,25 (2,38)
Zigomiceto não identificado	---	---	0,16 (1,06)	0,00 (0,00)
Leveduras	---	---	25,82 (23,30)	31,95 (54,66)
<i>Rhizopus SP</i>	---	---	0,08 (0,77)	0,49 (1,86)
Smuts	75,19 (177,17)	45,88 (118,09)	---	---
Basidióporos				
<i>Agrocybe-like</i>	0,39 (2,59)	1,35 (9,51)	---	---
<i>Boletaceae</i>	0,00 (0,00)	91,96 (78,60)	---	---
<i>Calvatia/Lycoperdon</i>	0,00 (0,00)	0,19 (1,84)	---	---
<i>Chlorophyllum SP</i>	0,00 (0,00)	0,77 (4,46)	---	---
<i>Coprinus-like</i>	14,84 (27,67)	62,08 (56,54)	---	---
<i>Cortinarius SP</i>	0,00 (0,00)	1,35 (5,98)	---	---
<i>Fomes fomentella</i>	16,39 (26,90)	3,08 (12,15)	---	---
<i>Ganoderma SP</i>	0,77 (3,62)	509,35 (397,69)	---	---
<i>Basidiósporos hialinos</i>	1507,62 (2004,42)	17647,97 (10162,78)	---	---
<i>Inocybe-type</i>	0,58 (3,15)	4,4 (39,28)	---	---
Outros basidiósporos	21,40 (34,58)	192,79 (116,09)	---	---
<i>Panoellus/Psathyrella</i>	3,08 (8,90)	5,40 (10,69)	---	---
<i>Russula/Laccaria</i>	0,19 (1,84)	35,28 (48,68)	---	---
<i>Tomentella-like</i>	0,39 (2,59)	25,64 (33,01)	---	---

Puffball	3,08 (14,23)	14,84 (27,91)	---	---
Ascósporos				
<i>Apiosporina morbosa</i>	0,00 (0,00)	0,19 (1,84)	---	---
Ascósporos incolores	160,98 (281,89)	454,79 (510,36)	---	---
<i>Diatrypaceae</i>	26,41 (71,59)	1,16 (5,73)	---	---
<i>Leptosphaeria-like</i>	4,82 (9,81)	33,55 (37,69)	---	---
<i>Paraphaeosphaeria michotii</i>	0,39 (2,59)	2,89 (8,78)	---	---
<i>Phaeosphaeria annulata</i>	2,12 (8,20)	6,94 (13,30)	---	---
<i>Pleuroceras tenella</i>	0,00 (0,00)	2,89 (11,18)	---	---
<i>Pleurospora-like</i>	1,16 (5,10)	0,58 (3,15)	---	---
<i>Sporormiella SP</i>	0,19 (1,84)	0,19 (1,84)	---	---
Outros/ não identificados	9,45 (17,60)	20,05 (33,35)	---	---
<i>Venturia-like</i>	16,39 (29,91)	15,23 (22,07)	---	---
Xylariaceae	1,35 (5,38)	15,42 (25,87)	---	---
Mixomiceto	3,47 (9,51)	103,53 (162,17)	---	---
Rusts	0,58 (3,15)	1,16 (11,03)	---	---
<i>Zygothia jamaicensis</i>	0,00 (0,00)	0,58 (4,09)	---	---
Outros/não identificados	396,76 (387,63)	1142,66 (662,16)	---	---

--- Não identificáveis por essa metodologia

Filtros MCE e Recording Burkard.

A comparação entre esse dois amostradores de longa duração mostrou que Recording Burkard é capaz de coletar uma concentração de esporos maior do que os filtros MCE ($p < 0,001$), com valores médios respectivos de 7004,02 esporos/m³ e 1062,80 esporos/m³ durante a primavera 40061,42 esporos/m³ versus 6566,37 esporos/m³ durante o verão. Novamente, a concentração de esporos no ar durante o verão foi maior do que na primavera para ambas as metodologias ($p < 0,001$) e este efeito foi dependente do amostrador ($p < 0,001$), dado que a diferença do Burkard entre as estações foi mais pronunciada (figura 14).

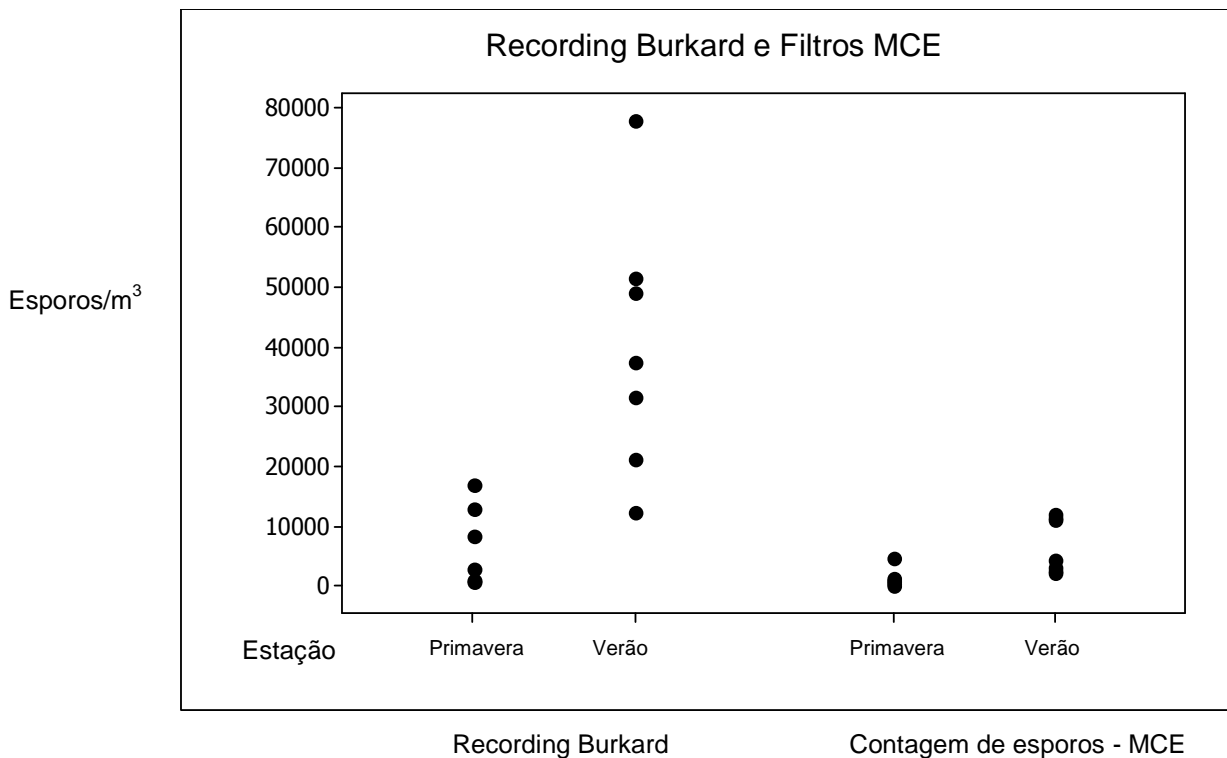


Figura 14. Concentrações de esporos fúngicos coletados pelo amostradores de ar Recording Burkard e filtros MCE durante primavera e verão na cidade de Boston, MA ($p < 0.001$).

De todos os 38 gêneros ou grupos identificados pelas metodologias, apenas “rusts” (encontrados apenas em uma amostra) coletados pelos filtros MCE não foram encontrados no Recording Burkard. Ainda, 10 gêneros ou grupos coletados pelo Burkard não foram encontrados nos filtros MCE, sugerindo que o Burkard não é apenas capaz de coletar mais esporos, mas também uma maior diversidade (tabela 8).

Tabela 8- Gêneros e grupos encontrados a partir de amostradores de ar de longa duração Recording Burkard e filtros MCE. Valores de média seguidos de desvio padrão em parênteses.

	Seven day exposure Burkard (Esporos/m ³)		Filtros MCE (Esporos/m ³)	
	Primavera	Verão	Primavera	Verão
Mitósporos				
<i>Alternaria sp</i>	0,00 (0,00)	40,45 (63,91)	0,98 (2,59)	2,55 (6,74)
<i>Botrytis sp</i>	0,00 (0,00)	13,48 (15,69)	0,00 (0,00)	17,21 (45,52)
<i>Cercospora sp</i>	0,00 (0,00)	1,50 (3,96)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
<i>Cladosporium sp</i>	96,37 (54,7)	1429,21 (650,57)	9,04 (14,34)	282,43 (180,13)
<i>Curvularia sp</i>	0,58 (1,43)	1,5 (3,96)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
<i>Epicoccum sp</i>	0,8 (1,95)	5,99 (11,89)	0,00 (0,00)	5,09 (13,48)
<i>Oidium sp</i>	1,75 (4,28)	1,5 (3,96)	0,00 (0,00)	2,15 (5,69)
Outros mitósporos.não identificados	3,79 (7,2)	3,00 (5,12)	2,86 (7,58)	21,44 (32,48)
<i>Penicillium/Aspergillus-like</i>	109,47 (47,41)	522,85 (279,79)	50,74 (48,02)	393,25 (273,57)
<i>Pithomyces sp</i>	0,00 (0,00)	5,99 (8,25)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
<i>Polytrincium trifolli</i>	0,00 (0,00)	3,00 (5,12)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
<i>Torula sp</i>	0,00 (0,00)	7,49 (15,69)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Smuts	20,94 (26,35)	35,96 (43,6)	7,37 (9,5)	33,2 (50,59)
Basidiósporos				
<i>Boletaceae</i>	0,00 (0,00)	116,85 (120,4)	0,00 (0,00)	48,03 (45,83)
<i>Coprinus-like</i>	12,32 (7,87)	79,4 (82,76)	0,00 (0,00)	16,86 (15,64)
<i>Fomes fomentella</i>	19,52 (25,79)	3,00 (5,12)	10,13 (19,71)	5,46 (7,27)
<i>Ganoderma sp</i>	0,00 (0,00)	722,1 (714,22)	0,00 (0,00)	181,08 (202,9)
Basidiósporos hialinos	6080,1 (6533,99)	33875,66 (20910,57)	601,25 (1045,25)	4392,05 (3222,07)
<i>Inocybe-type</i>	0,00 (0,00)	4,49 (11,89)	1,78 (4,71)	8,96 (12,62)
Outros basidiósporos/não identificados	11,19 (18,07)	224,72 (138,45)	8,79 (14,88)	67,78 (78,71)
<i>Panaeolus/Psathyrella</i>	4,14 (5,63)	5,99 (10,23)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Puffball	8,97 (14,03)	10,49 (10,49)	0,00 (0,00)	33,29 (38,1)
<i>Russula/Laccaria</i>	0,00 (0,00)	29,96 (32,85)	4,18 (11,06)	15,16 (17,63)
<i>Tomentella-like</i>	0,00 (0,00)	32,96 (56,61)	0,00 (0,00)	19,36 (51,21)
Ascósporos				
Ascósporos incolores	112,08 (122,3)	1035,21 (534,79)	73,14 (154,22)	302,63 (290,72)
Diatrypaceae	44,67 (109,42)	3,00 (7,93)	7,51 (15,11)	0,00 (0,00)
<i>Leptosphaeria-like</i>	3,67 (4,75)	34,46 (35,16)	1,78 (4,71)	8,14 (10,39)
Outros ascósporos/não	27,06 (58,8)	32,96 (39,44)	3,7 (7,24)	16,53 (33,11)

identificados				
<i>Paraphaeosphaeria michotii</i>	0,00 (0,00)	3,00 (5,12)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
<i>Phaeosphaeria annulata</i>	0,87 (2,14)	16,48 (25,59)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
<i>Pleuroceras tenella</i>	0,87 (2,14)	4,49 (11,89)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
<i>Pleurospora-like</i>	0,00 (0,00)	1,5 (3,96)	0,00 (0,00)	1,48 (3,91)
<i>Venturia-like</i>	7,87 (14,74)	25,47 (16,97)	10,61 (16,18)	0,00 (0,00)
Xylariaceae	0,8 (1,95)	23,97 (37,18)	8,89 (23,53)	5,38 (9,44)
Mixomicetos	3,74 (5,82)	188,76 (298,52)	4,25 (7,38)	49,78 (60,28)
Zygothia jamaicensis	0,00 (0,00)	5,99 (10,23)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Outros esporos/não identificados	432,44 (256,72)	1508,61 (743,13)	252,12 (351,08)	612,4 (466,78)
Rusts	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	1,47 (3,88)

Apesar disso, a análise de regressão resultou em R^2 de 65% (intervalo de confiança de 95%, 3,90 a 6,53), sugerindo relativa acurácia entre os dois amostradores, apesar de o Burkard ser 3,90 a 6,53 vezes melhor do que MCE.

Filtro MCE– cultura e contagens totais

Amostras de ambientes externos provenientes de filtros MCE também foram comparadas para cultura e contagem total. Contagens totais mostraram maior concentração de fungos anemófilos do que a cultura ($p=0,001$) com valores médios respectivamente de 1069 esporos/ m^3 e 310 UFC/ m^3 durante a primavera e 6566 esporos/ m^3 versus 830 UFC/ m^3 durante o verão. Em média, a cultura correspondeu a 29% do total na primavera e quase 13% no verão. A contagem total de esporos foi significativamente maior no verão ($p=0,01$) e os resultados de cultura mostraram uma tendência de maior contagem de colônias no verão, porém não significativa ($p=0,054$) (figura 15).

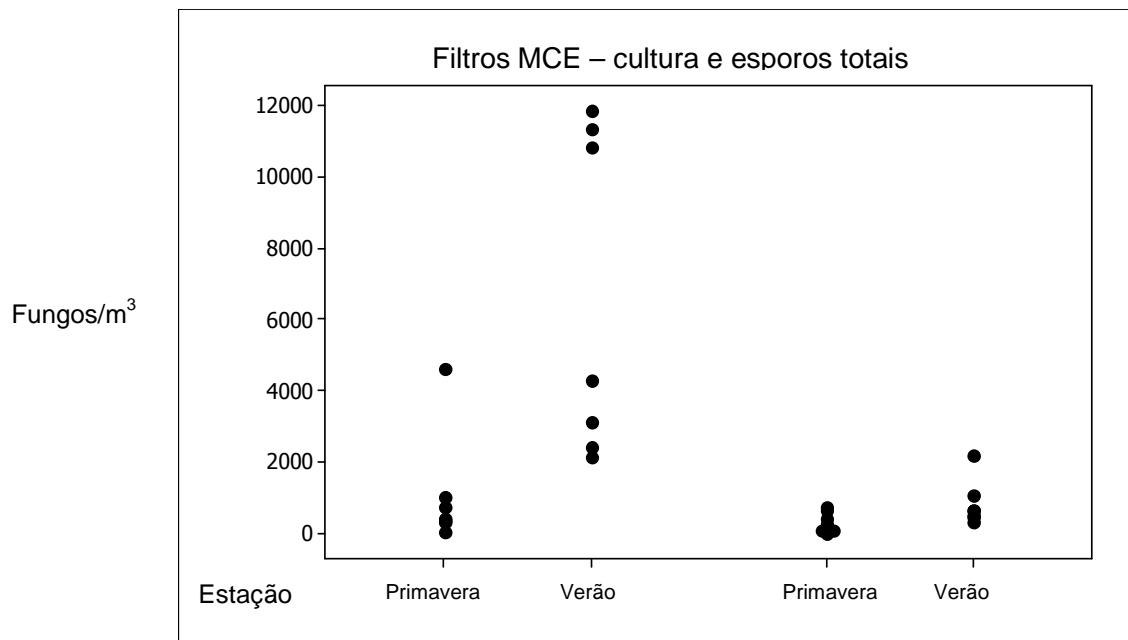


Figura 15. Concentrações de fungos coletados através de cultura e contagem total de esporos em filtros MCE durante primavera e verão na cidade de Boston, MA. Cultura ($p=0,054$) e Contagem total ($p=0,01$).

Dos 37 gêneros ou grupos analisados, apenas 4 foram identificados por ambas as metodologias e 6 foram encontrados apenas através da cultura. No entanto, contagem total forneceu 28 gêneros ou grupos adicionais, incluindo basidiósporos, smuts, puffballs, ascósporos e mixomicetos (tabela 8). No entanto, a correlação entre ambas as metodologias foi elevada $\rho=0.87$, ($p<0.001$).

Tabela 9 - Gêneros e grupos encontrados a partir de filtros MCE (cultura e contagens totais de esporos) na cidade de Boston, MA. Valores de média seguidos de desvio padrão em parênteses.

	MCE total (Esporos/m ³)		MCE cultura (UFC/m ³)	
	Primavera	Verão	Primavera	Verão
Mitósporos/cultiváveis				
<i>Alternaria sp</i>	0,98 (2,59)	2,55 (6,74)	5,95 (15,75)	5,95 (15,75)
<i>Aureobasidium sp</i>	---	---	0,00 (0,00)	11,9 (31,5)
<i>Botrytis sp</i>	0,00 (0,00)	17,21 (45,52)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
<i>Cladosporium sp</i>	9,04 (14,34)	282,43 (180,13)	59,52 (139,98)	407,74 (436,65)
<i>Crysonilia sp</i>	---	---	0,00 (0,00)	5,95 (15,75)
<i>Curvularia sp</i>	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	5,95 (15,75)
<i>Epicoccum sp</i>	0,00 (0,00)	5,09 (13,48)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
<i>Oidium sp</i>	0,00 (0,00)	2,15 (5,69)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
Outros mitósporos/não identificados	2,86 (7,58)	21,44 (32,48)	178,57 (188,6)	196,43 (98,35)
<i>Paecilomyces sp</i>	---	---	0,00 (0,00)	5,95 (15,75)
<i>Penicillium/Aspegillus-like</i>	50,74 (48,02)	393,25 (273,57)	71,43 (92,28)	148,81 (178,58)
<i>Polythrincium trifolii</i>	0,00 (0,00)	2,90 (4,95)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)
<i>Rhizopus sp</i>	---	---	0,00 (0,00)	5,95 (15,75)
leveduras	---	---	14,88 (26,12)	53,57 (46,36)
Smuts	7,37 (9,5)	33,2 (50,59)	---	---
Basidiósporos				
<i>Agrocybe-like</i>	3,68 (7,23)	9,92 (14,94)	---	---
<i>Boletaceae</i>	0,00 (0,00)	48,03 (45,83)	---	---
<i>Coprinus-like</i>	0,00 (0,00)	16,86 (15,64)	---	---
<i>Fomes fomentella</i>	10,13 (19,71)	5,46 (7,27)	---	---
<i>Ganoderma sp</i>	0,00 (0,00)	181,08 (202,9)	---	---
Basidiósporos hialinos	601,25 (1045,25)	4392,05 (3222,07)	---	---
<i>Inocybe-type</i>	1,78 (4,71)	8,96 (12,62)	---	---
Outros basidiósporos/não identificados	8,79 (14,88)	67,78 (78,71)	---	---
<i>Puffball</i>	0,00 (0,00)	33,29 (38,1)	---	---
<i>Russula/laccaria</i>	4,18 (11,06)	15,16 (17,63)	---	---
<i>Tomentella-like</i>	0,00 (0,00)	19,36 (51,21)	---	---
Ascósporos				
Ascósporos incolores	73,14 (154,22)	302,63 (290,72)	---	---
Diatrypaeae	7,51 (15,11)	0,00 (0,00)	---	---
<i>Leptosphaeria-like</i>	1,78 (4,71)	8,14 (10,39)	---	---

Outros ascósporos	3,7 (7,24)	16,53 (33,11)	---	---
<i>Phaeosphaeria annulata</i>	0,00 (0,00)	10,4 (9,87)	---	---
<i>Pleurospora-like</i>	0,00 (0,00)	1,48 (3,91)	---	---
<i>Venturia-like</i>	10,61 (16,18)	0,00 (0,00)	---	---
Xylariaceae	8,89 (23,53)	5,38 (9,44)	---	---
Rust	0,00 (0,00)	1,47 (3,88)	---	---
Mixomicetos	4,25 (7,38)	49,78 (60,28)	---	---
Outros esporos/não identificados	252,12 (351,08)	612,4 (466,78)	---	---

--- Não identificáveis por essa metodologia

Resultados São Paulo

As amostras foram coletadas durante os períodos de outono e inverno, caracterizados por possuírem baixa umidade relativa e apresentarem elevadas concentrações de fungos (148) e material particulado em São Paulo (186).

Fungos e dados meteorológicos

Assim como em Boston, duas metodologias foram escolhidas inicialmente para a análise de fungos: contagem total e cultura. No entanto, as coletas realizadas no Brasil foram feitas por 24 horas (em Boston, o período de coleta em Concentrador foi de 5 horas), dado que não foram coletadas em ambiente de concentrador e objetivou-se analisar a exposição diária a contaminantes biológicos e material particulado. O elevado período de coleta resultou em dados negativos para cultura de fungos, sendo apresentados nessa tese apenas resultados de contagem total. Vale ressaltar que a metodologia utilizada no presente estudo possibilitou pela primeira vez que análises de fungos em períodos de 24 horas contínuas fossem realizadas na atmosfera de São Paulo.

Os resultados mostraram que as amostras coletadas no outono e inverno não apresentaram concentração significativamente diferente de fungos na atmosfera ($p > 0,05$), apesar de uma tendência de maiores concentrações no

inverno. As médias de outono foram de 19322 esporos/m³ (DP: 11768 esporos/m³) e médias de inverno de 22306 esporos/m³ (DP: 10319 esporos/m³).

Devido à falta de evidências de que haveria diferença entre as estações, o restante da análise dos dados foi realizada em conjunto.

Em relação aos parâmetros meteorológicos, serão mostrados aqui resultados de análises dois a dois. Modelos de interação serão mostrados em item “fungos, PM_{2,5} e parâmetros meteorológicos”. Tais modelos foram utilizados devido ao fato de que, dependendo do gênero analisado, existe uma tendência de aumento ou diminuição da quantidade de acordo com a umidade. No entanto, é sabido da literatura que a quantidade de material particulado também é dependente da umidade, aumentando em períodos secos, típicos de inverno. Dessa forma, modelos de interação mostram a variável que melhor explica a variabilidade de fungos encontrada nesse estudo.

Regressões ajustadas para fungos e temperatura não resultaram em análises significantes, portanto os dados a seguir são referentes apenas à umidade.

Os gêneros *Penicillium/Aspergillus* apresentaram correlação inversa fraca (R^2 : 0,142; $p < 0,05$), porém significativa com umidade (figura 16), similares a resultados para o gênero *Cladosporium sp* (R^2 : 0,139; $p < 0,05$) – (figura 17).

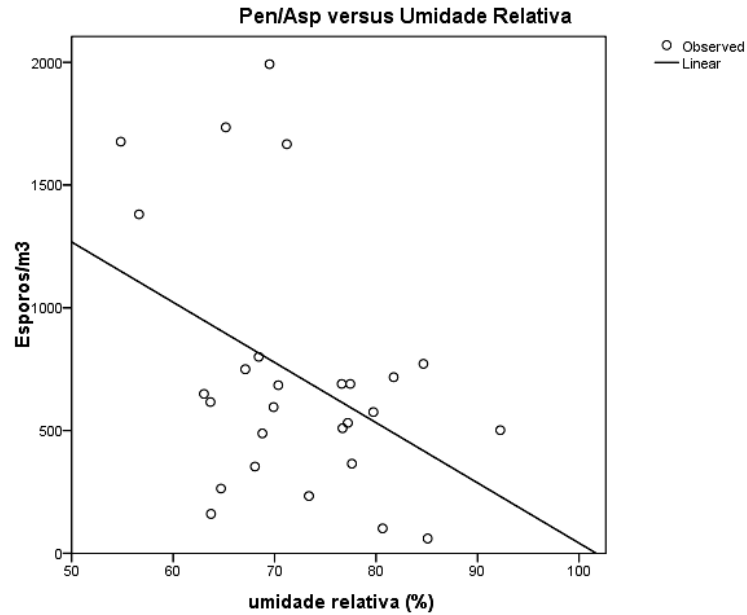


Figura 16. Regressão entre *Pen/Asp* e umidade relativa na cidade de São Paulo. $p < 0,05$

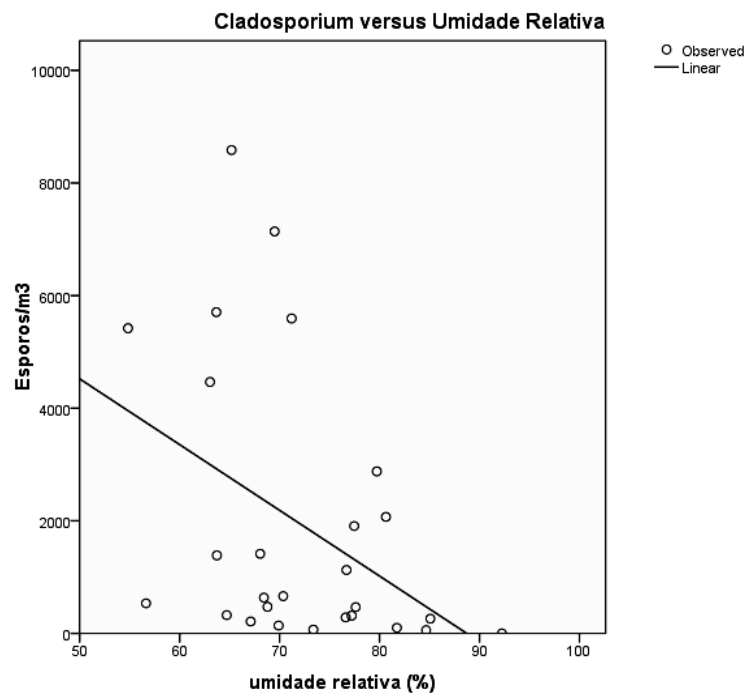


Figura 17. Regressão entre *Cladosporium sp* e umidade relativa na cidade de São Paulo. $p < 0,05$

Os próximos resultados significantes foram encontrados para Ascósporos sem pigmentação, com correlação moderada ($\rho=0,38$; $p<0,05$) – figura 18.

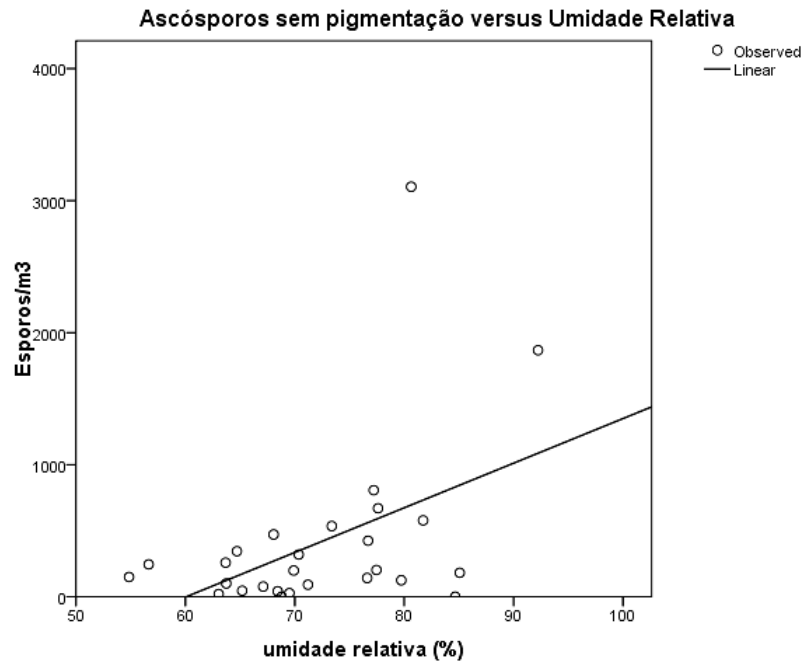


Figura 18. Correlação entre Ascósporos sem pigmentação e umidade relativa na cidade de São Paulo. $p<0,05$

Para fungos totais, foi encontrada correlação inversa, como mostra a figura 19 ($R^2: 0,111$ $p < 0,05$).

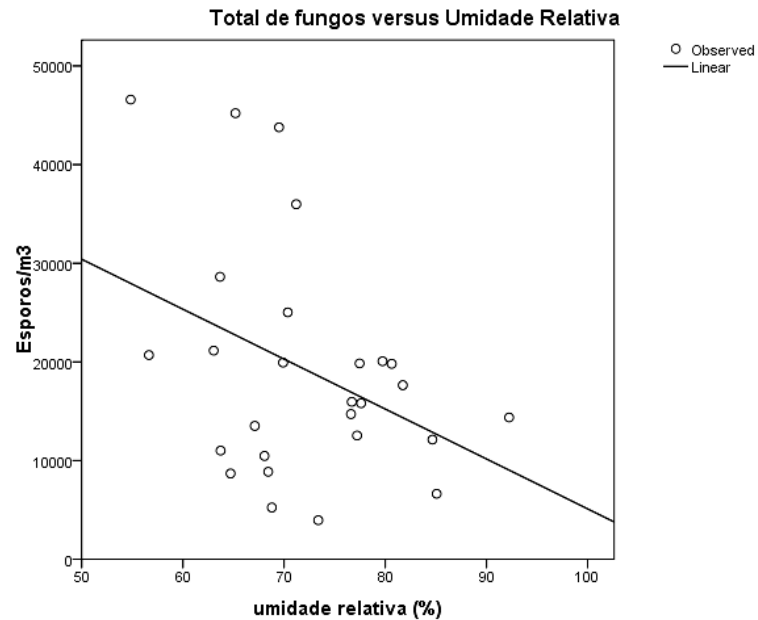


Figura 19. Regressão entre contagem total de fungos e umidade relativa na cidade de São Paulo. $p < 0,05$

Os principais gêneros ou grupos identificados corresponderam aos basidiósporos hialinos (correspondentes a aproximadamente 70% dos identificados), seguidos por *Cladosporium sp*, ascósporos sem pigmentação, *Penicillium/Aspergillus*, Coprinus-like e basidiósporos pigmentados, sendo os resultados listados na tabela 10.

Tabela 10 - Principais gêneros ou grupos encontrados a partir de filtros MCE na cidade de São Paulo. Valores de média seguidos de desvio padrão em parênteses.

Filtros MCE- atmosfera de São Paulo			
Gêneros (Esporos/m³)	Estações do ano		Total nas duas estações
	Outono	Inverno	
Mitósporos/cultiváveis			
<i>Alternaria sp</i>	2,35 (6,29)	0,00 (0,00)	1,69 (5,41)
<i>Pen/Asp</i>	727,39 (508,63)	728,69 (377,73)	727,75 (470,50)
<i>Cladosporium sp</i>	2.015,55 (2.473,81)	4.260,76 (1.920,82)	2.648,81 (2.523,26)
<i>Torula sp</i>	1,44 (5,29)	0,00 (0,00)	1,04 (4,51)
<i>Polythrincium trifolii</i>	0,82 (4,31)	0,00 (0,00)	0,59 (3,66)
<i>Epicoccum sp</i>	0,22 (1,16)	1,51 (5,02)	0,58 (2,82)
<i>Botrytis sp</i>	3,59 (9,52)	0,00 (0,00)	2,58 (8,19)
Outros mitósporos/não identificados	5,81 (11,73)	1,84 (6,12)	4,69 (10,53)
Smuts	5,32 (15,23)	9,76 (14,05)	6,58 (14,86)
Basidiósporos			
Boletaceae	2,17 (6,37)	2,92 (9,68)	2,38 (7,32)
<i>Coprinus-like</i>	19,22 (24,05)	18,87 (28,32)	19,12 (24,95)
Basidiósporos pigmentados	81,91 (115,05)	18,53 (25,40)	64,03 (102,03)
Basidiósporos hialinos	13.897,25 (7.789,56)	14.806,93 (7.327,77)	14.153,83 (7.577,29)
<i>Inocybe-type</i>	4,33 (10,43)	0,00 (0,00)	3,11 (9,01)
<i>Russula/Laccaria</i>	6,43 (10,88)	4,87 (11,22)	5,99 (10,85)
Puffball	0,00 (0,00)	4,89 (11,13)	1,38 (6,13)
Ascósporos			
Ascósporos bicelulares	6,16 (16,40)	0,00 (0,00)	4,43 (14,11)
Ascósporos não pigmentados	406,78 (646,77)	262,95 (777,41)	366,21 (678,65)
<i>Leptosphaeria-like</i>	5,55 (22,15)	4,89 (11,13)	5,37 (19,53)
<i>Phaeosphaeria annulata</i>	0,00 (0,00)	1,51 (5,02)	0,43 (2,67)
<i>Pleuroceras tenella</i>	2,85 (8,93)	0,00 (0,00)	2,04 (7,64)
<i>Venturia-like</i>	2,14 (8,37)	0,00 (0,00)	1,53 (7,12)
Xylariaceae	3,17 (7,37)	0,00 (0,00)	2,28 (6,38)
Outros ascósporos/não identificados	3,79 (11,75)	0,00 (0,00)	2,72 (10,05)
Outros esporos/não identificados	2.139,18 (1.462,78)	2.177,26 (1.562,47)	2.149,92 (1.470,74)

PM_{2,5}

Os resultados mostraram diferença de concentração de material particulado entre as estações ($p < 0,05$), sendo que o inverno apresentou concentrações maiores (média: $39,3 \mu/m^3$, DP: 17,56) do que o outono (média: $26,4 \mu/m^3$, DP 14,86).

Além disso, o PM_{2,5} foi inversamente correlacionado à umidade (R^2 : 0,278; $p < 0,05$) -figura 20, não tendo correlação significativa com a temperatura.

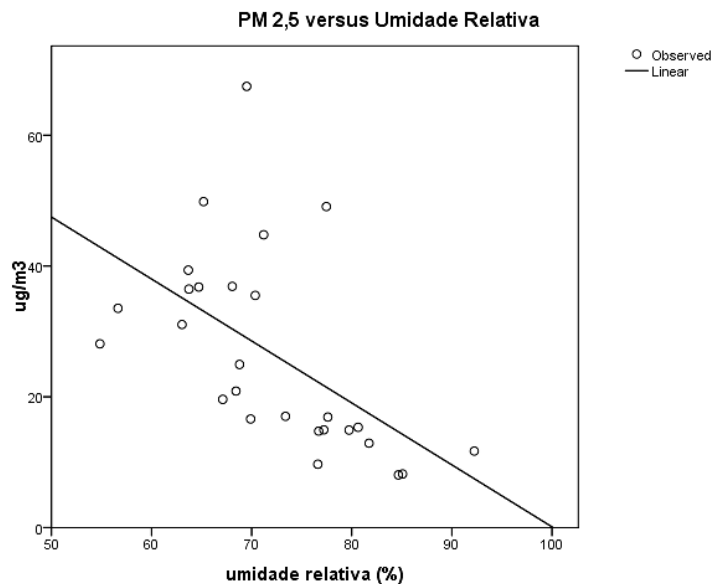


Figura 20. Regressão entre PM_{2,5} e umidade relativa na cidade de São Paulo. $p < 0,05$

Análise de componentes principais

Para análise de elementos químicos presentes no PM_{2,5}, foi utilizada análise de componentes principais. Os resultados mostraram que três fatores foram responsáveis por explicar 75% dos resultados, a saber:

- Fator 1: basicamente elementos que sinalizam tráfego de veículos, incluindo elementos de ressuspensão da crosta: Ba, Ca, Fe, Zn, K e Si.

- Fator 2: basicamente elementos que sinalizam emissões industriais: Cr e Ni.
- Fator 3: basicamente elementos que sinalizam produtos de combustão: Cu e S.

Fungos, PM_{2,5} e dados meteorológicos – modelos de regressão múltipla

Novamente, foi demonstrado que os fungos representam porção significativa do material particulado de diâmetro inferior a 2,5 micrômetros. Os resultados variaram de 236,11 esporos/ μg de PM_{2,5} a 1345 esporos/ μg de PM_{2,5} (média: 772,23 esporos/ μg de PM_{2,5}; desvio padrão: 400,37 esporos/ μg de PM_{2,5}).

Um modelo inicial mostrou que a contagem total de fungos foi positivamente associada ao PM_{2,5} ($R^2=0,341$; $p<0,05$). No entanto, a regressão linear múltipla em que foi utilizado “total de fungos” como variável dependente e componentes principais, umidade, temperatura e massa de PM_{2,5}, como variáveis independentes, demonstrou que o fator 1 foi o responsável pela melhor explicação da variabilidade de fungos no ambiente. Em outras palavras, os elementos químicos se sobressaíram em relação à massa do PM_{2,5} e parâmetros meteorológicos ($R^2=0,255$; $p<0,05$) – figura 21 e elevação em uma unidade no fator 1 foi correlacionada a um aumento de 1580 esporos na atmosfera (tabela 11).

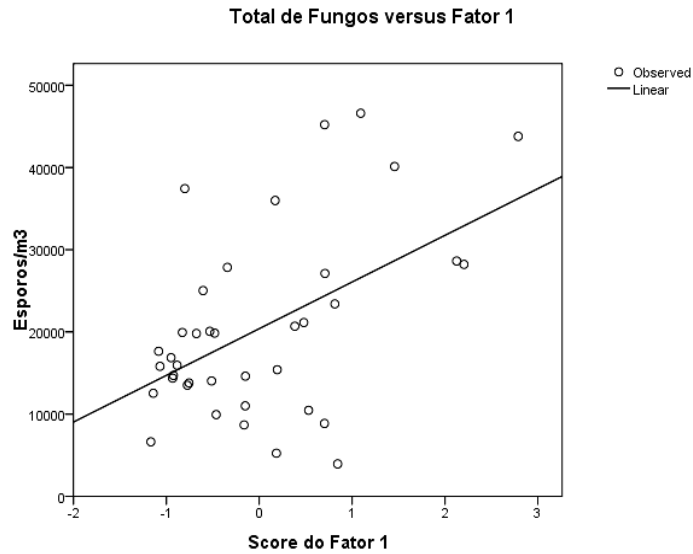


Figura 21. Modelo de regressão da contagem total de fungos versus o fator 1 na cidade de São Paulo. $p < 0,05$

Dessa forma, modelos de regressão linear múltipla passaram a ser adotados para o restante dos dados. Os gêneros *Penicillium/Aspergillus* apresentaram correlação inversamente proporcional à umidade, no entanto o modelo de regressão com interação demonstrou que o $PM_{2,5}$ é o principal responsável por sua variabilidade no ar atmosférico ($R^2=0,186$; $p < 0,05$) – figura 22. O aumento em uma unidade de material particulado foi correlacionado a um aumento de 20,1 na quantidade desses gêneros no ar (tabela 11).

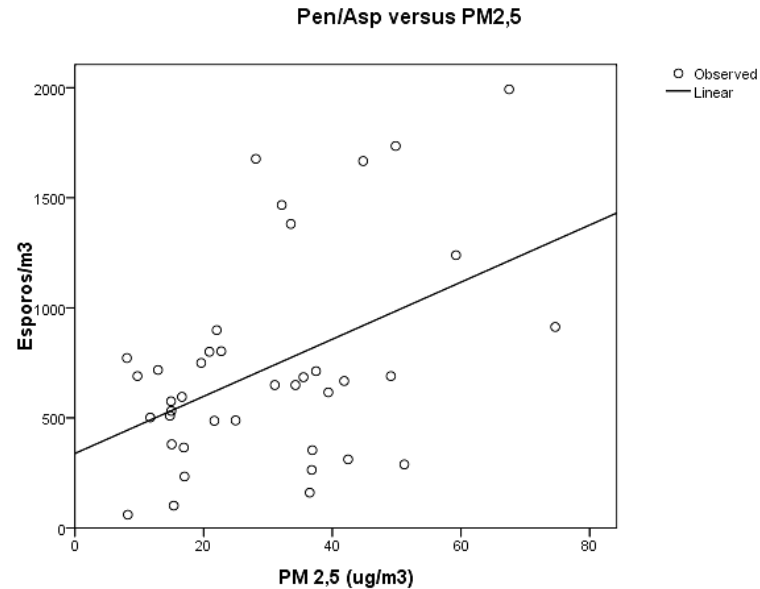


Figura 22. Modelo de regressão entre os gêneros *Pen/Asp* e massa de $PM_{2,5}$ na cidade de São Paulo, $p < 0,05$.

No caso do gênero *Cladosporium*, os resultados mostraram que, apesar de sua correlação inversa com a umidade e material particulado em modelos isolados, em modelo conjunto com outros parâmetros, houve significância apenas o fator 1 da análise de componentes químicos ($R^2=0,406$; $p < 0,05$) – figura 23. A variação de 1 unidade no fator 1 foi correlacionada a um aumento de 1605 esporos desse fungo na atmosfera (tabela 11).

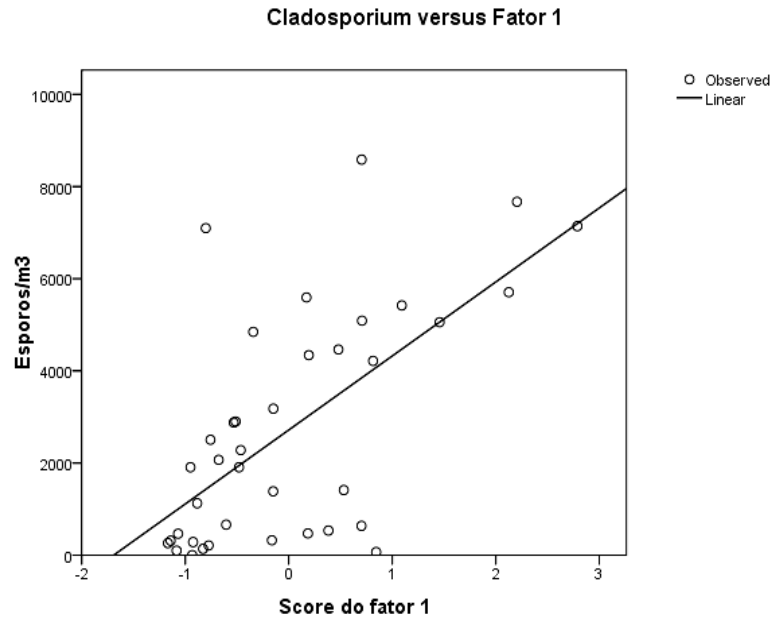


Figura 23. Modelo de regressão do gênero *Cladosporium* versus o fator 1 na cidade de São Paulo. $p < 0,05$

Em modelo isolado, basidiósporos hialinos apresentaram correlação positiva com material particulado, porém, novamente em modelo conjunto, o fator 1 da análise de componentes químicos foi o único que apresentou significância ($R^2=0,184$; $p < 0,05$), figura 24. A variação de 1 unidade no fator 1 foi correlacionada a um aumento de 347,3 esporos desse fungo na atmosfera (tabela 11).

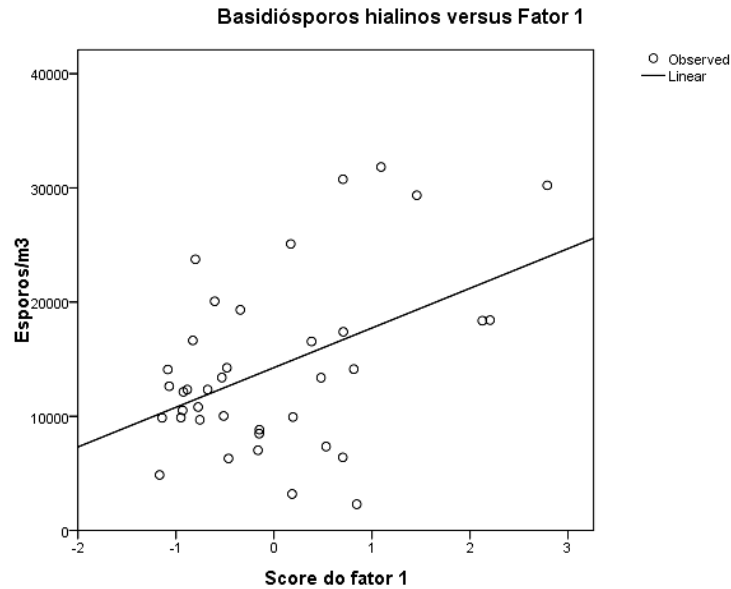


Figura 24. Modelo de regressão de basidióspors hialinos versus o fator 1 na cidade de São Paulo. $p < 0,05$

Tabela 11 - Resultados dos modelos de Regressão Linear Múltipla entre fungos, umidade, temperatura, massa de $PM_{2,5}$ e componentes principais na cidade de São Paulo.

Variável dependente	Variável independente	Beta	Significância
Fungos totais	Fator 1	1580	0,001
<i>Pen/Asp</i>	Massa de $PM_{2,5}$	20,1	0,001
<i>Cladosporium sp</i>	Fator 1	1605,96	0,000
Basidiósporos hialinos	Fator 1	347,3	0,004

Endotoxinas

Teste inicial demonstrou que houve uma amplificação da cascata enzimática sem adição de β -G-blocker, sugerindo que os glucanos presentes na amostra amplificam a reação e mascaram os dados reais para concentração

de endotoxinas (dados não mostrados). A partir desses resultados, foi adicionado o reagente em todas as amostras. Os resultados para endotoxinas variaram de 0,03 EU/m³ a 0,29 EU/ m³ (média: 0,10 e DP:0,07). Os dados para associação com PM_{2,5} mostraram que a variação ocorreu de 0,46 EU/mg PM_{2,5} até 15,81 EU/mg PM_{2,5} (média: 5,52 e DP: 4,51), sem diferença significativa entre estações. Foram passíveis de análise 21 amostras.

Os modelos de regressão linear múltipla utilizando como variáveis independentes temperatura, umidade, massa de PM_{2,5}, composição química e fungos mostraram que as endotoxinas foram correlacionadas apenas às medidas de temperatura, com R²: 0,229 e p <0,05 (figura 25). O aumento da quantidade de uma unidade de medida de temperatura foi associada a um aumento 0,02 EU (coeficiente β) de endotoxinas na atmosfera.

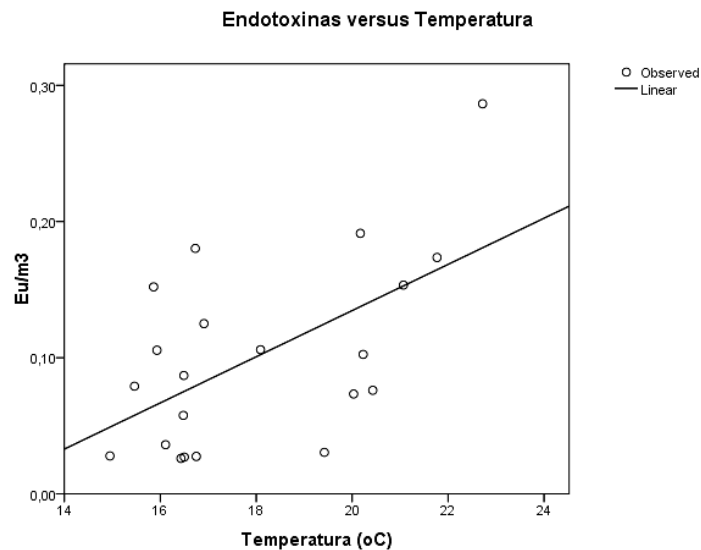


Figura 25. Modelo de regressão de endotoxinas versus temperatura atmosférica na cidade de São Paulo. p<0,05

Lavado broncoaveolar

Os resultados do lavado broncoaveolar não mostraram diferenças estatisticamente significativas da contagem total ou diferencial de células no lavado broncoalveolar (figuras 26-30).

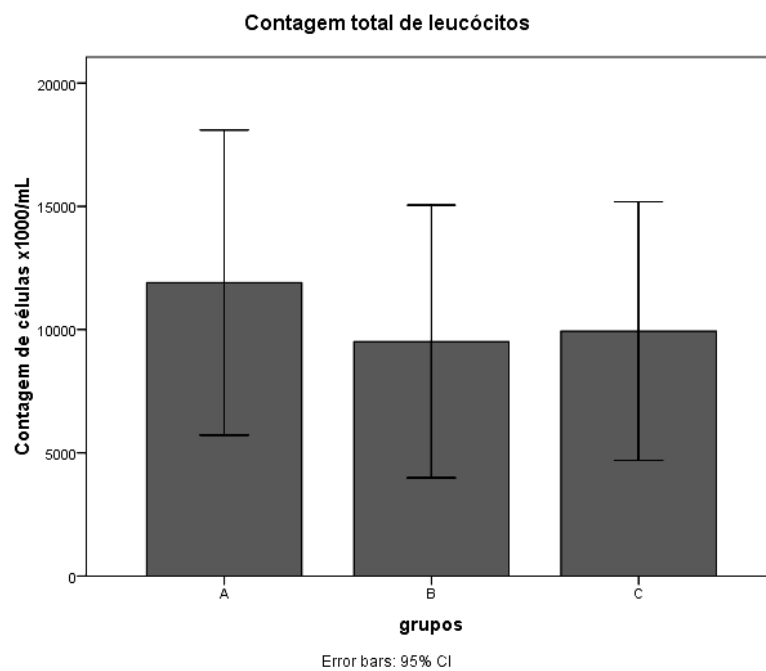


Figura 26. Contagem total de leucócitos a partir do lavado dos grupos A (100 μg de $\text{PM}_{2,5}$; 21×10^4 esporos/mL), B (100 μg de $\text{PM}_{2,5}$; 60×10^4 esporos/mL) e C (filtro branco)

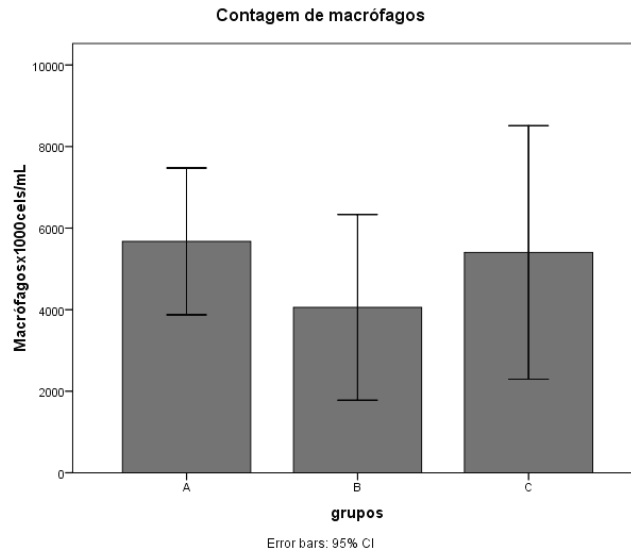


Figura 27. Contagem de macrófagos a partir do lavado dos grupos A (100 μg de $\text{PM}_{2,5}$; 21×10^4 esporos/mL), B (100 μg de $\text{PM}_{2,5}$; 60×10^4 esporos/mL) e C (filtro branco)

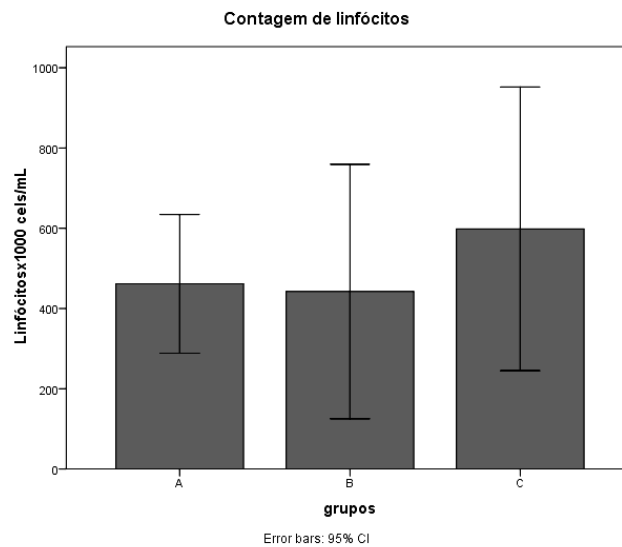


Figura 28. Contagem de linfócitos a partir do lavado dos grupos A (100 μg de $\text{PM}_{2,5}$; 21×10^4 esporos/mL), B (100 μg de $\text{PM}_{2,5}$; 60×10^4 esporos/mL) e C (filtro branco)

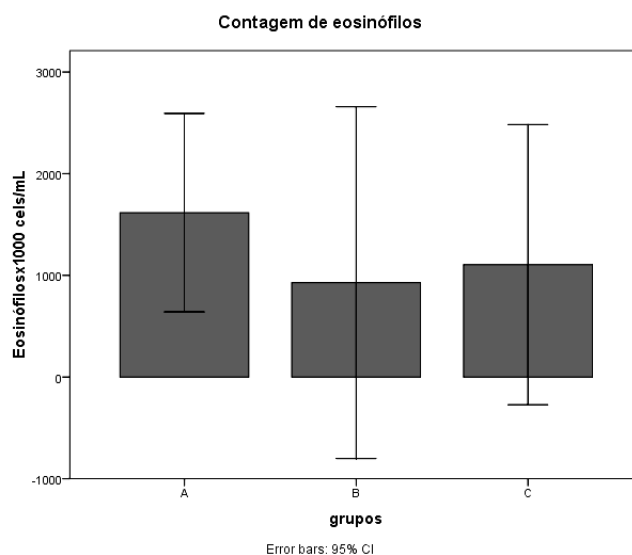


Figura 29. Contagem de eosinófilos a partir do lavado dos grupos A (100 μg de $\text{PM}_{2,5}$; 21×10^4 esporos/mL), B (100 μg de $\text{PM}_{2,5}$; 60×10^4 esporos/mL) e C (filtro branco)

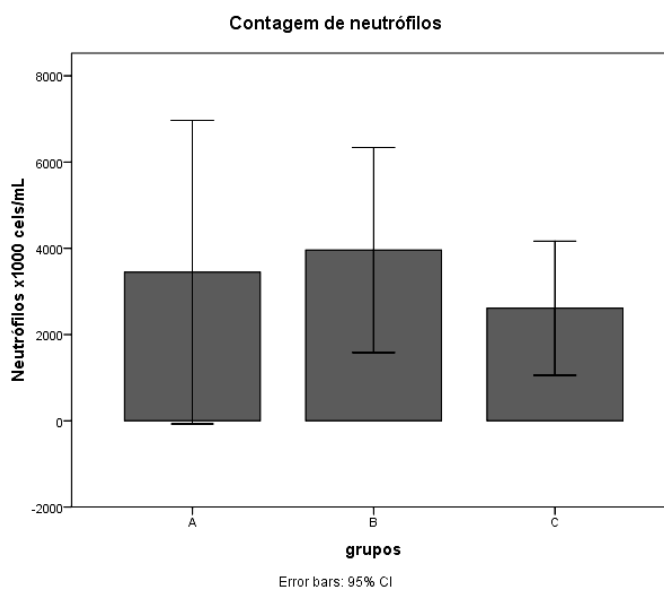


Figura 30. Contagem de neutrófilos a partir do lavado dos grupos A (100 μg de $\text{PM}_{2,5}$; 21×10^4 esporos/mL), B (100 μg de $\text{PM}_{2,5}$; 60×10^4 esporos/mL) e C (filtro branco)

No caso das citocinas, houve diferenças estatisticamente significantes entre as citocinas dos grupos analisados.

As citocinas IFN- γ e TNF- α apresentaram concentração significativamente superior no grupo A (100 μ g de PM_{2,5}; 21x10⁴ esporos/mL), quando comparado aos grupos B (100 μ g de PM_{2,5}; 60x10⁴ esporos/mL) e C (controle). Os grupos B e C não apresentaram diferença significativa (figuras 31 e 32).

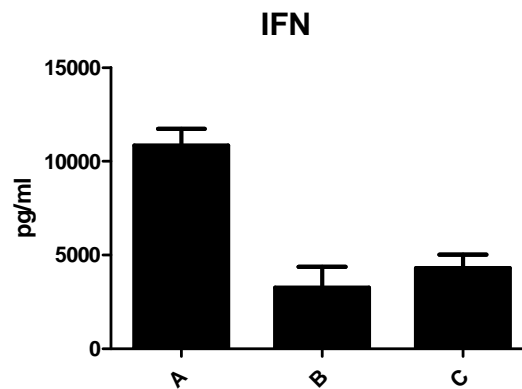


Figura 31. Concentração de IFN a partir do lavado dos grupos A (100 μ g de PM_{2,5}; 21x10⁴ esporos/mL), B (100 μ g de PM_{2,5}; 60x10⁴ esporos/mL) e C (filtro branco)

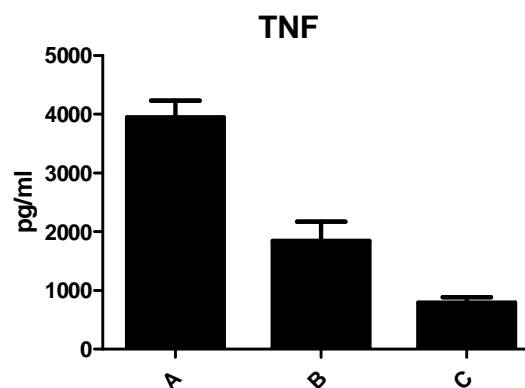


Figura 32. Concentração de TNF a partir do lavado dos grupos A (100 μ g de PM_{2,5}; 21x10⁴ esporos/mL), B (100 μ g de PM_{2,5}; 60x10⁴ esporos/mL) e C (filtro branco)

A citocina IL-6 apresentou concentração significativamente maior no grupo controle, quando comparado ao grupo A. Não houve diferença quando comparado ao grupo B – figura 33.

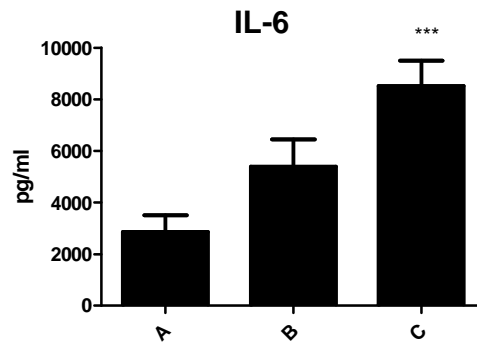


Figura 33. Concentração de IL-6 a partir do lavado dos grupos A (100 µg de PM_{2,5}; 21x10⁴ esporos/mL), B (100 µg de PM_{2,5}; 60x10⁴ esporos/mL) e C (filtro branco)

Já a citocina IL-4 apresentou maior concentração no grupo C, quando comparado aos dois outros grupos ($p < 0,05$). Os grupos A e B não apresentaram diferença estatística - (figura 34).

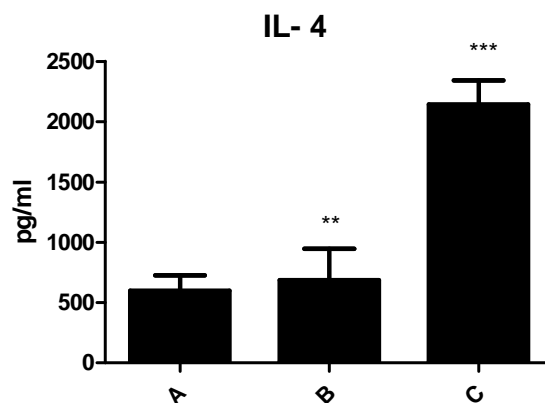


Figura 34. Concentração de IL-4 a partir do lavado dos grupos A (100 µg de PM_{2,5}; 21x10⁴ esporos/mL), B (100 µg de PM_{2,5}; 60x10⁴ esporos/mL) e C (filtro branco)

Discussão

- Discussão resultados de Boston

CAPs e amostras MCE de ambientes externos

Estudos conduzidos no Concentrador de partículas ambientais da Universidade de Harvard mostraram variações no batimento cardíaco (187, 188) e resposta inflamatórias em animais e humanos expostos a partículas concentradas. Clarke et al (49), em 2000, demonstraram que a exposição a CAPs foi responsável por uma resposta biológica dependente da composição elementar (especialmente associada aos fatores alumínio/sílica e vanádio/níquel). Mais tarde, foi demonstrado que a exposição de ratos controle e ratos com bronquite crônica a CAPs levava a um aumento da contagem de neutrófilos no lavado broncoalveolar, com mecanismo dose-resposta dependente da composição (24). Outro estudo também encontrou resultados semelhantes, dado que as alterações pulmonares em ratos previamente expostos a ovalbumina estavam mais associadas à composição do que à massa (55). Devido à importância do bioaerossol adsorvido no PM, um artigo estudou a atividade da endotoxina associada ao CAPs. Os resultados in vitro mostraram maior atividade de macrófagos alveolares relacionadas a frações insolúveis do material particulado, incluindo a endotoxina (103).

Estes estudos demonstram a importância da composição do material particulado nas respostas inflamatórias, porém apenas um teve como foco a quantificação do bioaerossol adsorvido. O estudo presente foi o primeiro a caracterizar a composição fúngica sob o ponto de vista de duas metodologias, contagem total de esporos e cultura. Contagens totais forneceram uma maior concentração por metro cúbico e diversidade de gêneros. Estes resultados também foram observados para amostras de ambientes externos. A menor

concentração fúngica fornecida pela cultura pode ser parcialmente explicada pelo tempo de 5 horas de amostragem. Outros autores já recomendaram que amostras de filtros devem ser realizadas em períodos de, no máximo, 30 minutos a fim de evitar o decaimento da viabilidade devido a condições adversas como dessecação (174). Amostras de uma hora mostraram decaimento de culturabilidade em 50% (189). Porém, isto não explica toda a diferença observada no presente estudo, especialmente porque alguns estudos não confirmam a redução de culturabilidade em amostras realizadas em até 6 horas (190). Então, mais do que decaimento de viabilidade, existem outros fatores que influenciaram os resultados. Alguns gêneros de fungos pertencentes aos basidiomicetos, ascomicetos, smuts e mixomicetos não são identificáveis ou mesmo capazes de crescer em meios de cultura, portanto não é surpreendente que a contagem total tenha proporcionado maior concentração e diversidade.

Deve-se ressaltar que, dependendo do objetivo do estudo ambas as metodologias podem ser adotadas, dado que alguns gêneros comuns como *Penicillium sp* e *Aspergillus sp* podem ser distinguidos apenas por cultura (176), salvo *Aspergillus niger*.

Nossos resultados também mostraram que uma maior quantidade de gêneros foi recuperada após a concentração por ambas as metodologias (contagem total e cultura), concordando com outros estudos que suportam maior eficiência de amostras de filtros em ambientes altamente contaminados (191). Esporos raros podem não ser coletados antes da concentração, especialmente porque as amostras de filtros operam a baixo volume de amostragem. No caso da contagem total, existe uma problemática adicional. É impossível analisar o filtro na superfícies toda, então campos de visão microscópicos devem ser escolhidos antes da análise. Nesse caso, esporos raros podem não ser visualizados antes da concentração, porém, menos frequentemente após a mesma. Este tipo de análise adicionada ao pequeno

número de amostras podem também explicar porque não foi possível observar uma concentração de 30 vezes, como esperado.

Nossos resultados não mostraram uma boa correlação entre ascósporos incolores e massa de $PM_{2,5}$ e este assunto merece maior destaque na próxima sessão de resultados obtidos no Brasil, dado que os esporos podem ser adsorvidos no material após liberação.

Considerando os resultados após concentração de esporos, os grupos mais importantes identificados foram basidiósporos hialinos (média: 49.328,03 esporos/ m^3), embora alguns basidiósporos conhecidos por suas propriedades alergênicas, como *Coprinus sp*, também foram identificados (média: 493,93 esporos/ m^3). A importância dos basidiomicetos no cenário das alergias não deve ser ignorada, dado que se estima que 25 a 30% dos indivíduos alérgicos são sensíveis a esse grupo (128), também considerados os principais componentes em estudos envolvendo exacerbações alérgicas e asmáticas (129, 130). O segundo grupo mais importante foram os ascósporos incolores (média: 4.660,18 esporos/ m^3). Menos é conhecido a respeito dos mecanismos de alergenicidade desse grupo, embora testes cutâneos positivos já tenham sido obtidos a partir de extratos (124). Entre os deuteromicetos, *Pen/Asp* foi o grupo mais importante, seguido *Cladosporium sp*, sendo ambos, especialmente *Aspergillus fumigatus* e *Cladosporium herbarum*, conhecidos por seus extratos de alto potencial alergênico (132).

Andersen e personal Burkard

Os resultados mostraram que Burkard é capaz de coletar uma maior concentração de esporos do que o Andersen, porém ambos mostraram mesma variabilidade relativa e alta correlação, concordando com outros estudos de comparação de amostradores de curta duração (192). Estudos anteriores conduzidos com *Penicillium chrysogenum* também mostraram que Burkard é capaz de coletar maior quantidade de esporos (193). Nossos resultados

mostraram mesmo padrão para esporos de *Pen/Asp*. Novamente, Burkard forneceu tipo adicionais, incluindo basidiomicetos, importantes indutores de alergias (123, 128).

Uma variação sazonal foi encontrada para ambos os amostradores, com maiores concentrações durante o verão, porém, nenhum deles mostrou variabilidade significativa durante as 5 horas de exposição, apesar de variações diárias serem descritas na literatura (145, 146). Outros estudos, no entanto, não encontraram variabilidade significativa entre coletas de fungos atmosféricos em intervalos de 24 horas (194).

MCE filter e Seven day exposure Burkard

Burkard forneceu maior concentração de esporos. Novamente, uma das explicações pode residir na diferença de fluxo de ar e análise de campos microscópicos. Filtros MCE coletam em baixos volumes de ar (4L/min) enquanto Burkard opera em altos fluxos (10 L/min). Isto permite ao investigador identificar e enumerar maior quantidade de esporos na análise bruta. O tipo de análise também contribui para os resultados. Como já mencionado, existe um viés relacionado à análise do campo de visão microscópico em filtros MCE. No caso do Burkard, é sabido que a análise de traços não corresponde à análise da lâmina inteira, porém as metodologias utilizadas atualmente (com mudanças na direção do traço) resultam em diferenças não significativas em termos de acurácia (195).

Nossos resultados também mostraram que Burkard coleta uma maior diversidade, no entanto o R^2 entre as duas metodologias foi de 65%.

MCE - cultura e contagem total em ambiente externo

A contagem total resultou em maior concentração e diversidade de fungos, de forma similar aos resultados obtidos no Concentrador de partículas.

No entanto, nesse caso a correlação entre as metodologias foi elevada ($\rho=0.87$). As amostras adicionais realizadas em ambiente externo podem ter contribuído para essa diferença nos resultados.

- Discussão resultados São Paulo

Caracterização dos fungos

A modificação da metodologia inicial de análise de fungos aumentando o tempo de coleta para 24 horas (mais próxima de uma situação de exposição real) resultou em impossibilidade de utilização de cultura para análise de fungos. Tais resultados se mostraram negativos ou mesmo não confiáveis, dado o baixo número de colônias identificado na amostra. Processos de dessecação devem ter ocorrido, sendo que, conforme já discorrido anteriormente, alguns autores recomendam períodos máximos de 30 minutos de exposição de filtros (174).

Ao contrário dos resultados de Boston em que foi possível visualizar uma diferença marcante na concentração de fungos entre as estações, os resultados do Brasil mostraram que a diferença entre as estações estudadas (outono e inverno) não foi significativa. Isso pode ser explicado por uma menor variação nos parâmetros meteorológicos (temperatura e umidade) no decorrer da amostragem, levando a menores variações na liberação de esporos entre as estações. Esses resultados são condizentes com estudos clássicos conduzidos na atmosfera da cidade de São Paulo, em que foi constatada maior predominância de fungos no outono e inverno e em quantidades similares para a maioria dos fungos isolados. A explicação para a alta concentração de fungos nessas duas estações residiu no aumento da pressão atmosférica nessa época do ano em São Paulo, concomitante à redução da temperatura e umidade relativa (134). Os resultados do trabalho presente mostraram uma correlação inversamente proporcional fraca, porém significativa entre a quantidade total de

fungos e a umidade relativa, concordando com tais estudos realizados em São Paulo.

Quanto aos gêneros/grupos identificados, os basidiósporos hialinos foram maioria absoluta (70%). Tal resultado não possui comparação com dados da literatura brasileira em São Paulo devido ao fato de existirem apenas dois trabalhos que utilizam metodologias passíveis de identificação de tais fungos conduzidos na Região Sul do país.

O segundo fungo mais frequente foi o *Cladosporium sp.* Gambale et al (134), em 1977, identificaram esse fungo como mais prevalente em São Paulo, correspondendo a 64,8% nas amostras. No presente estudo, esse gênero foi o mais prevalente entre os mitósporos, correspondendo a 13,3% dos isolados totais. Ainda, no presente estudo, *Penicillium* e *Aspergillus* se encontram em segundo lugar entre os mitósporos, correspondendo a 3,61% dos isolados. Em Gambale et al (134), em 1977, esses gêneros aparecem em quarto e quinto lugar, respectivamente. Vale ressaltar que a partir da metodologia utilizada pelos autores em 1977, não seria possível identificar os basidiósporos. Também é preciso lembrar que o presente estudo analisou apenas fungos de diâmetro 2,5 µm ou menos, dado o objetivo de análise do PM_{2,5}. Assim, alguns fungos frequentemente isolados na atmosfera, como *Alternaria sp* e *Epicoccum sp* foram identificados em número muito baixo, dado o grande tamanho dos esporos, que apareciam dissecados nas amostras.

Estudos conduzidos por Mezzari et al (141), em 2002, realizaram coletas com o amostrador de ar Rotorod na atmosfera da cidade de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Os resultados mostraram que os ascósporos foram mais relevantes nas amostras (correspondendo a 50,49%) do que os deuteromicetos de maior importância em estudos prévios brasileiros: *Cladosporium* (17.86%) e *Aspergillus/Penicillium* (15.03%). Foram encontrados picos, principalmente de ascósporos e *Cladosporium* em março, agosto e novembro. Após a tomada dos dados, testes cutâneos e de IgE específica para os extratos de espécies dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria* e *Helminthosporium*

foram analisados em indivíduos atópicos e controle. Enquanto não houve resultados positivos para o grupo controle, 15,38% dos indivíduos atópicos apresentaram sensibilização a pelo menos um dos extratos analisados (142). A porcentagem de isolamento de *Cladosporium* no presente trabalho e nas amostras de Mezzari et al (2002) é muito próxima. No entanto, as de ascósporos diferem bastante, dado que no presente trabalho corresponderam a 1,8% dos isolados. Tal discrepância pode ser explicada pela diferença climática encontrada entre as Regiões Sul e Sudeste do país, além do período de amostragem nesse estudo ter sido caracterizado por raras ocasiões de chuvas. Além disso, e a metodologia de coleta de PM_{2,5} pode ter modificado os resultados quanto à quantidade de ascósporos encontrada no material particulado total.

O segundo estudo brasileiro que atentou para coleta de esporos totais foi realizado a partir de amostras provenientes do amostrador Burkard em Caxias do Sul, Rio Grande do Sul. As maiores concentrações foram encontradas no verão e as menores, no inverno. Os membros dos deuteromicetos representaram em torno de 40% do total, sendo *Cladosporium* o gênero mais marcante, representando 32,9% da contagem total. Os ascósporos representaram em torno de 20% do total, assim como os basidiósporos, sendo *Coprinus* o principal gênero dentre os últimos (143). No presente trabalho, *Coprinus* é colocado como segundo principal gênero entre os basidiomicetos.

A tabela 12 mostra uma comparação entre os achados desse estudo e outros achados na literatura, não somente em âmbito nacional, mas também internacional.

Tabela 12 - Comparação entre os principais gêneros de fungos encontrados na cidade de São Paulo e dados de outros estudos, com ênfase na metodologia de coleta.

Principais gêneros	Estações do ano	Metotologia	Localidades	Autores
<i>Cladosporium</i> (64,8%), <i>Epicoccum</i> (51,7%), <i>Rhodotorula</i> (48,9%), <i>Penicillium</i> (41,7%), <i>Aspergillus</i> (23,3%), <i>Aurobasidium</i> (19,6%), <i>Phoma</i> (17,7%), <i>Alternaria</i> (17%)	Primavera, verão, outono, inverno	Sedimentação em placas de Petri	Grande São Paulo	Gambale et al (134), 1977
<i>Aspergillus</i> (78%), <i>Penicillium</i> (60%), <i>Fusarium</i> (42%), <i>Cladosporium</i> (21%), <i>Curvularia</i> (19%), <i>Rhizopus</i> (17%), <i>Rhodotorula</i> (13%).	Primavera, verão, outono, inverno	Sedimentação em placas de Petri	Natal, Rio Grande do Norte, Brasil	Oliveira et al (138), 1993
<i>Aspergillus</i> (92.50%), <i>Penicillium</i> (69.60%), <i>Cladosporium</i> (69.45%), <i>Candida</i> (57.57%), <i>Rhodotorula</i> (49.65%), <i>Phoma</i> (44.45%)	Primavera, verão, outono, inverno	Sedimentação em placas de Petri	Recife, Pernambuco, Brasil	De Lima et al (137), 1983
<i>Monascus</i> , <i>Neurospora</i> , <i>Trichotecium</i> , <i>Cryptococcus</i>	Primavera, verão, outono e inverno. Predominância na Primavera	Sedimentação em placas de Petri	Presidente Prudente, São Paulo, Brasil	Buck et al (140), 1985
Ascósporos (50,49%), <i>Cladosporium</i> (17,86%), <i>Pen/Asp</i> (15,03%), basidiósporos (3,84%)	Primavera, verão, outono e inverno.	Amostrador de ar para contagem total de esporos	Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil	Mezzari et al (141), 2002
<i>Cladosporium</i> , leveduras, <i>Epicoccum</i> , <i>Trichoderma</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Helminthosporium</i> , <i>Aspergillus</i>	Primavera, verão, outono e inverno.	Amostrador de ar para fungos cultiváveis	Botucatu, São Paulo, Brasil	Croce et al (136), 2003
<i>Aspergillus</i> (44,7%), <i>Penicillium</i> (13,3%), <i>Curvularia</i> (9,8%), <i>Cladosporium</i> (6,8%),	Primavera, verão, outono, inverno	Sedimentação em placas de Petri	Fortaleza, Ceará, Brasil	Menezes et al (139), 2004

<i>Mycelia sterilia</i> (6,0%), <i>Fusarium</i> (3,5%), <i>Rhizopus</i> (3,1%), <i>Drechslera</i> (2,6%), <i>Alternaria</i> (2,4%), <i>Absidia</i> (2,2%).				
<i>Cladosporium</i> (74,5 %), <i>Ganoderma</i> (11,7 %), Aspergillaceae (2,9 %), <i>Ustilago</i> (2,5 %), <i>Coprinus</i> (1,5 %), <i>Alternaria</i> (1,3 %), <i>Botrytis</i> (1,3 %)	Primavera, verão, outono, inverno	Amostrador de ar para contagem total de esporos	Porto, Portugal	Oliveira et al (196), 2005
<i>Cladosporium</i> (32,57 a 33,16%), <i>Ascósporos</i> (11,13 a 12,13%), <i>Coprinus</i> (7,85 a 9,96%), <i>Leptosphaeria</i> (7,35 a 8,09%), <i>Aspergillus/Penicillium</i> (3,36 a 7,30%), <i>Ganoderma</i> (6,29 a 6,69%), basidiósporos (21,4%)	Primavera, verão, outono e inverno	Amostrador de ar para contagem total de esporos	Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil	De Antonni Zopas (143), 2006
<i>Alternaria</i> , <i>Aspergillus</i> <i>Cladosporium</i> , <i>Penicillium</i> , leveduras	Verão e inverno	Amostrador de ar para fungos cultiváveis	Duas estações próximas a Taipei, Taiwan	Lin et al (197), 2000
<i>Aspergillus</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Botrytis</i> , <i>Geotrichum</i>	Primavera, verão, outono, inverno	Amostrador de ar para	Cidades urbanizadas da Lituânia	Lugauskas et al (198), 2003
<i>Aspergillus</i> (38,9%), <i>Cladosporium</i> (17,5%), <i>Penicillium</i> (15%)	Inverno/primavera	Sedimentação em placas de Petri	Área urbanizada, Dokki, Giza, Egito	Awad (199), 2005
<i>Cladosporium</i> (46,71%), <i>Alternaria</i> (6,2%), ascósporos (6,76%), <i>Lepatosphaeria</i> (6,35%), <i>Coprinus</i> (4,31%)	Primavera, verão, outono, inverno (período de dez anos)	Amostrador de ar para contagem total de esporos	Heraklion, Creta, Grécia	Gonianakis et al (200), 2006
Basidiósporos hialinos (71%), Ascósporos sem pigmentação (7%), <i>Penicillium/Aspergillus</i>	Primavera, verão	Amostrador para contagem total de esporos	Boston, Massachusetts, EUA.	Resultados da tese em Boston

(4,6%), <i>Cladosporium</i> (2,65%).		tamanho $\leq 2,5$ μm (Concentrador de Partículas)		
Basidiósporos hialinos (70%), <i>Cladosporium</i> (13,3%), <i>Penicillium/Aspergillus</i> (3,6%) Ascósporos sem pigmentação (1,81%).	Outono, inverno	Amostrador para contagem total de esporos tamanho $\leq 2,5$ μm .	São Paulo, Brasil	Resultados da tese no Brasil

Fungos, parâmetros meteorológicos e PM_{2,5}

Os resultados mostraram maiores concentrações de material particulado no inverno do que outono, sendo a concentração inversamente correlacionada à umidade. Tais resultados eram esperados, dado que o material particulado tende a ficar em suspensão quando existe baixa concentração de vapor d'água na atmosfera. Chuvas ou alta umidade relativa são responsáveis por levar à deposição do material e portanto melhoria da qualidade do ar (186, 201).

Considerando os grupos de fungos analisados e os parâmetros meteorológicos, mostrou-se que nenhum dos grupos apresentou correlação positiva com a temperatura. Tais resultados podem sugerir que a liberação de esporos é menos sensível à baixa variação de temperatura (desvio padrão: 2,08 °C) encontrada no presente estudo.

Novamente, foi demonstrado que os fungos representam uma porção significativa do PM_{2,5} (até 1345 esporos/ μg de PM_{2,5}), contrariando estudos que não identificam tal correlação (64). Uma explicação possível para isso pode estar na metodologia de análise. No caso desse projeto, foi escolhida uma metodologia de análise direta de identificação dos fungos. Isto é, se os esporos estiverem presentes no ar, serão visíveis no filtro. No caso do estudo de Boreson et al (64), em 2004, foram realizadas medidas indiretas como quantificação de proteínas ou biomassa, que podem apresentar resultados

negativos quando não atingido o limite de detecção da análise ou mesmo apresentarem interferência na detecção.

Tradicionalmente na literatura e legislação, existem esforços para a quantificação da concentração máxima de material particulado que deve ser inalada anualmente ou diariamente (3, 4). No entanto, esse tipo de enfoque mostra limitações dado que a composição elementar do material pode levar a diferentes respostas nos sistemas respiratórios e cardiovascular. Dessa forma, estudos recentes passam a caracterizar a composição química do material particulado (26, 35-37, 42).

Estudos que caracterizem não somente a composição química, mas também de fungos são raros na literatura. Os elementos químicos podem, eventualmente, possuir um papel deletério no metabolismo, ou, em contraste, podem favorecer a adsorção preferencial de fungos ao material particulado (62). Além disso, fungos podem apresentar resistências a compostos como metais pesados devido a fenótipos e genótipos diferentes entre as espécies (168). Não existem estudos brasileiros nessa área, portanto a discussão desse tópico será feita em comparação com cenário internacional.

Os resultados do estudo mostraram correlações positivas entre quantidade total de fungos e $PM_{2,5}$ em modelo isolado, concordando com outros estudos com material particulado (66, 170, 202) e comparativos de micoflora fúngica entre área urbanizada e reserva natural, onde os fungos de áreas urbanizadas aparecem como fontes importantes de poluição (194). Outros estudos, no entanto, encontraram correlação inversa entre PM_{10} e quantidade total de fungos na atmosfera de Taiwan (197). Após inclusão dos elementos químicos no modelo, a concentração de material particulado passou a ser não significativa, denotando que a composição química pode influenciar a quantidade de fungos na atmosfera. Dessa forma, o fator 1 foi o mais correlacionado à liberação de esporos totais na atmosfera, correspondendo a elementos de sinalização de tráfego de veículos e ressuspensão da crosta. Pela metodologia do presente trabalho, ou seja, para exposições de 24 horas, esses

resultados podem ser altamente explicativos, dado que os fungos são provenientes de solo, vegetação e superfícies de folhas (117). A baixa umidade associada ao tráfego intenso podem ser responsáveis por uma aerolização elevada de elementos da crosta, aumentando dessa forma a concentração de fungos no ar. No entanto, os dados devem ser vistos com cuidado, dado que o efeito dos parâmetros meteorológicos pode ter sido atenuado no modelo. Diversos tipos de fungos possuem picos de liberação em determinadas horas do dia, sendo que os valores médios utilizados nesse estudo podem não ser representativos dos períodos de liberação.

No caso dos gêneros *Pen/Asp*, os modelos mostraram que a variação desses fungos foi melhor explicada pela quantidade de material particulado na atmosfera. Esses resultados concordam com aqueles encontrados na atmosfera de Taiwan em que também foi encontrada uma correlação moderada entre o PM_{10} e o gênero *Penicillium* (197). Um estudo realizado em três regiões do Egito (duas áreas rurais e duas áreas urbanas) encontrou maior quantidade dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* em regiões urbanizadas (199). Apesar de o autor ter sugerido que esses resultados poderiam ter sido devido a um transporte a partir de áreas rurais, esses dados auxiliam a sustentar os resultados do estudo presente.

Cladosporium, gênero de caráter ubíquo, é normalmente liberado em tempo seco (143), característico do outono e inverno em São Paulo (134). As análises do presente relatório mostraram correlação negativa entre esse fungo e umidade, além de fungos e $PM_{2,5}$. No entanto, a regressão linear múltipla demonstrou que o fator 1 foi o que melhor explicou a variabilidade desses fungos na atmosfera. Novamente, esses resultados se mostram interessantes, dado que *Cladosporium sp* é um fungo típico de matéria orgânica e superfícies de folhas (203) e mecanismos de ressuspensão da crosta podem ser responsáveis por aumentar a quantidade desses esporos no ar. O próprio mecanismo de crescimento dos esporos, em ramificações e em cadeias facilita a liberação de grande quantidade dos mesmos após uma perturbação. De fato,

o mecanismo de liberação dos esporos é dependente a aumento da turbulência em determinadas horas do dia (204). Estudos que compararam áreas rurais com urbanas correlacionaram esse fungo à urbanização (199). Outros dados mostram que esse fungo pode ser relativamente tolerante a metais pesados, como Zinco, Cádmio e Chumbo, sendo o Zinco um dos elementos do Fator 1 dessa tese. Apesar do crescimento modificado na presença desses elementos, com maior ramificação de hifas, outros resultados sugerem que esse gênero é capaz de formar precipitados desses metais protegendo a colônia contra ações tóxicas (168).

Os basidiósporos hialinos apresentaram correlação positiva com o fator 1, podendo ser mais afetados pela composição do material particulado, do que por outros fatores. Resultados de estudo anteriores mostraram que a liberação de basidiósporos pode ser afetada pela quantidade de zinco na atmosfera (66), concordando parcialmente com o presente estudo, em que zinco é um dos elementos constituintes do fator 1. Os resultados relativos aos dados meteorológicos não relevantes para esse grupo de esporos devem ser vistos com cuidado, dado que o efeito da umidade no modelo pode ter sido atenuado. Esses fungos normalmente liberam esporos durante a madrugada ou manhã, quando a umidade é mais elevada (145). A falta de resultados positivos para a correlação entre eles e a umidade pode ser explicado pela periodicidade diária na liberação de esporos. Dessa forma, as médias diárias de umidade podem não ser representativas dos picos de liberação. A metodologia se mostra importante na caracterização de um período de exposição de 24 horas, no entanto não permite verificar variações diárias.

Já os ascósporos incolores apresentaram correlação positiva com a umidade. Esses resultados eram esperados, dado que tais esporos ficam protegidos nos ascos em períodos de seca, para somente serem lançados no ar durante períodos de umidade (144). Normalmente, amostras coletadas após chuvas intensas apresentam uma tendência de possuírem uma alta quantidade dos mesmos no ar (117).

Em suma, diferentes autores concordam que o material particulado em áreas urbanizadas pode estar associado com a variabilidade de esporos na atmosfera, dado que tais esporos são dependentes, dentre outros fatores, da quantidade de veículos nas ruas e conseqüentemente movimentos de turbulência, aumento da suspensão de poeira e da quantidade de contaminantes transportados pelas pessoas. De fato, locais próximos a ruas de tráfego intenso podem conter uma concentração maior de esporos em suspensão (198). Um estudo realizado em Brisbane, Austrália realizou medições de bioaerossóis (i.e. fungos e pólenes) na atmosfera associados ao material particulado. Foi verificado material citoplasmático de fungos adsorvidos no material proveniente de fontes veiculares. Os autores não descartaram a hipótese de mecanismos de sinergia entre ambos (60). Mais tarde, o mesmo grupo verificou que os fungos eram os bioaerossóis mais abundantes na atmosfera e novamente, material citoplasmático associado a partículas provenientes de exaustão veicular e ressuspensão na crosta (169). Estes resultados concordam com os resultados dessa tese, demonstrando novamente que o material particulado pode afetar mecanismos de adsorção de fungos, que passam então a serem mais abundantes na atmosfera em decorrência de mecanismos de turbulência (ressuspensão de elementos da crosta) e composição (elementos de combustão ou tráfego intenso).

Endotoxinas

Esse é o primeiro estudo brasileiro a caracterizar a quantidade de endotoxinas presente no ar atmosférico no Brasil. Os resultados mostraram que as endotoxinas variaram de 0,03 EU/m³ a 0,29 EU/ m³ (média: 0,10 e DP:0,07). Esses resultados são superiores àqueles encontrados por Carty e colaboradores (95), em 2003, conduzidos na atmosfera de Munique, Alemanha, com valores médios de 0,015EU/ m³.

Quanto à quantidade de endotoxinas associadas ao $PM_{2,5}$, as concentrações variaram de 0,46 a 15,81 EU/mg de $PM_{2,5}$ (média de 5,52 EU/mg de $PM_{2,5}$). No caso do estudo conduzido em Munique por Carty e colaboradores (2003), a concentração média foi de 1,07 EU/mg de $PM_{2,5}$. Outro estudo alemão encontrou concentrações similares (média de 1,2 EU/mg de $PM_{2,5}$) e um estudo comparativo também na Alemanha encontrou médias um pouco mais baixas em duas cidades (0,3 e 0,6 EU/mg de $PM_{2,5}$). Em algumas cidades dos Estados Unidos, foi demonstrada uma concentração média em ambiente externo de 2,0 EU/mg de $PM_{2,5}$ (115). Outros estudos comparativos entre cidades demonstraram que ruas congestionadas podem apresentar maiores concentrações de endotoxinas do que áreas rurais, com valores de medianas de 4,4 EU/m³ e 2,9 EU/m³, respectivamente. Em áreas de cidades dinamarquesas, os valores encontraram-se próximos aos encontrados nesse trabalho, com valores de mediana de 0,33 EU/m³ (205). Em outras regiões, como Boston, MA, foi encontrada uma média de 2,3EU/mg de $PM_{2,5}$ em ambiente de concentrador de partículas (103).

Os resultados dessa tese se mostram inferiores àqueles coletados no Sudeste da Cidade do México, com média de 12,22 EU/mg de $PM_{2,5}$ (97).

As análises de regressão demonstraram que a endotoxina foi correlacionada apenas com o aumento da temperatura, concordando parcialmente com outros estudos em que a maior quantidade de endotoxina foi encontrada durante estações quentes e correlacionada positivamente com o aumento da temperatura e diminuição da umidade (95). Em outras cidades européias, também foram encontradas maiores quantidades de endotoxinas em estações mais quentes do ano (205). Outros estudos de caracterização da flora cultivável também correlacionaram a concentração de bactérias no ar ao aumento da temperatura (194).

Lavado broncoaveolar

Os resultados de contagem total de leucócitos e diferencial não mostraram diferenças significantes entre os grupos analisados. Esses resultados podem ser devido a não possibilidade de aquisição de ratos spf ("specific-pathogen free"). Em nossos ratos, parece haver uma contagem basal mais elevada de células mesmo no grupo controle. Ainda, o grupo controle recebeu material extraído diretamente de um filtro de fibra de vidro branco. Tais filtros apresentam alto teor de silicatos, talvez levando a um aumento na contagem basal, mesmo no grupo controle. Tais possibilidades podem ser extendidas na análise de citocinas IL-6 e IL-4, que apresentaram padrão de liberação maior no grupo controle.

Algumas diferenças estatísticas puderam ser observadas em relação às citocinas. A liberação das mesmas pode ter sido iniciada anteriormente ao aumento da produção de células específicas. O tempo de sacrifício em 24 horas pode ter auxiliado nesses resultados.

As diferenças estatísticas ocorreram principalmente principalmente em relação ao grupo A (100 µg de PM_{2,5}; 21x10⁴ esporos/mL), quando comparado aos grupos B (100 µg de PM_{2,5}; 60x10⁴ esporos/mL) e C (controle).

Os resultados se mostraram complexos na análise. Existe uma dificuldade inerente ao estudo de fungos como indutores de respostas inflamatórias, que podem elicitar respostas com liberação de IgE ou respostas não-alérgicas importantes (7). O grau de viabilidade do esporo, ciclo de vida complexo, a diversidade de gêneros e alérgenos conhecidos e as dificuldades de medição já apontadas podem levar a estudos com resultados divergentes na ativação do sistema imunológico (206) ou mesmo a resultados inconclusivos. Dessa forma, ainda não se conhece com exatidão os mecanismos imunológicos de resposta a fungos, especialmente aos glucanos (207) .

A concentração relativa maior de material particulado no grupo A em relação aos fungos parece ter levado a um aumento da resposta T_H1 . Tal resposta foi diminuída no grupo B.

Os resultados para as citocinas IFN- γ e TNF- α em relação ao grupo A foram muito similares. O IFN, predominante em resposta T_H1 , é um ativador de macrófagos, os quais são responsáveis pela liberação de TNF em respostas agudas. Células T ativadas também liberam TNF em fase subsequente (208). A ativação de macrófagos leva à liberação de TNF, IL-1 e IL-6, respectivamente. A não observação de um aumento de IL-6 no grupo A condizente ao aumento de TNF pode eventualmente ter ocorrido devido ao tempo de sacrifício (24 horas após a instilação), que não permitiu a observação de um possível pico após a liberação de TNF e IL-1. De forma geral, IL-6 é mais ativada pela presença de IL-1 do que de TNF (208).

Conforme esperado a partir dos resultados de IFN e TNF, houve supressão da resposta T_H2 no grupo A, com menor liberação de IL-4. IFN e IL-4 são importantes antagonistas nas respostas imunológicas (208). No entanto, podia-se esperar que o grupo B apresentasse maior liberação de IL-4, porém não foi verificada significância em relação ao grupo A. De fato, parece ter havido uma supressão da resposta, dada a diferença em relação ao grupo controle.

Os tempos de exposição, a concentração de fungos e a susceptibilidade dos animais podem explicar parte dos resultados. Estudos com cobaias mostraram que exposições agudas ao (1-3) β -D-Glucano não levaram a um aumento no influxo de eosinófilos (209), ao contrário de exposições repetidas (210) ou exposições únicas associadas a exposições repetidas a ovalbumina (211). Eosinófilos são tipicamente ativados por IL-4 na fase tardia da resposta de hipersensibilidade (208). Talvez o tempo de exposição nesse estudo tenha sido insuficiente para demonstrar um aumento de liberação de IL-4 estatisticamente significativo no grupo B, com alta concentração de fungos no material. Existem estudos que apenas verificaram resposta T_H2 em animais

expostos a glucanos, quando previamente expostos a ovalbumina, comumente utilizado em modelos de sensibilização alérgica (160). Ainda, é possível que a diferença de aproximadamente 3 vezes na concentração de fungos entre os dois grupos não tenha sido suficiente para eliciar aumento na concentração de IL-4.

Estudos que focaram apenas no material particulado obtiveram resultados diversos, mas alguns apontam para uma alta concentração ser responsável por resposta T_H1 (7). Essa tese utilizou uma alta concentração de material particulado na instilação e os resultados mostraram que altas concentrações de PM e baixas concentrações de fungos poderiam levar a uma resposta T_H1 , porém esses resultados não foram observados em se tratando de altas concentrações de fungos. Como discorrido anteriormente, fungos representam uma importante porção do $PM_{2,5}$. No grupo A, observou-se uma razão menor de fungos por massa de $PM_{2,5}$, portanto é possível que a resposta T_H1 possa ter sido exacerbada devido ao PM e seus componentes químicos. Já o grupo B apresentou uma razão maior entre fungos e $PM_{2,5}$, podendo ter sido responsável por uma possível diminuição do efeito do $PM_{2,5}$ na indução de tal resposta.

Ainda, os resultados anteriores mostraram que houve correlação positiva entre fungos e o componente 1 do $PM_{2,5}$, aqui definido como constituído principalmente por elementos de ressuspensão da crosta. Esses elementos sabidamente são menos tóxicos do que elementos provenientes de fontes de combustão e emissão industrial. Em dias de elevada liberação de componentes industriais ou de combustão, houve uma tendência de haver uma baixa concentração de fungos na atmosfera. Dessa forma, grande parte dos elementos de ressuspensão da crosta pode ter sido “carregada” juntamente com os fungos em nossos experimentos, levando a uma alta concentração desses compostos no material particulado. Diferenças na composição do material particulado podem levar a diferentes respostas inflamatórias. Estudos alemães mostraram que crianças que viviam em cidade onde o material

particulado era composto principalmente por elementos de emissão industrial apresentaram prevalência 50% maior de eczemas, alergias e bronquites, além de quase duas vezes a prevalência de falta de ar e tosse do que crianças que moravam em cidade rural. As crianças que moravam em cidade predominantemente industrial também apresentaram maior sensibilidade a alérgenos comuns (212). Modelos animais utilizando material particulado de ambas as cidades auxiliaram a explicar os resultados, mostrando maior resposta alérgica de camundongos sensibilizados em modelo de ovalbumina (213).

Mecanismos modulatórios entre fungos e outros agentes inflamatórios como endotoxinas já foram demonstrados na literatura e se mostraram complexos. Já foi demonstrado que o influxo de neutrófilos após exposição à endotoxina isoladamente foi suprimido após a exposição aguda concomitante a (1-3) β -D-Glucanos em cobaias (209). Mais tarde, o mesmo grupo demonstrou a supressão do efeito de liberação de anticorpos específicos para ovalbumina, após a exposição concomitante a glucanos, endotoxinas e ovalbumina. A exposição de ambos os agentes isoladamente mostrou resposta aumentada, principalmente no caso da endotoxina (161). Outro estudo em que houve administração de particulado proveniente de escritórios com “Spike” de glucano não demonstrou alterações na liberação de interleucinas ou contagem de leucócitos em modelo animal. Foi verificada apenas uma leve diminuição do diâmetro nasal quando comparado ao grupo de exposição à poeira isoladamente, sendo os resultados não considerados clinicamente relevantes (214).

Em suma, esse estudo mostra que podem existir possíveis efeitos modulatórios entre fungos e o PM_{2,5}, no entanto outros estudos são necessários a fim de confirmar os resultados. Estudos controlados com exposição a endotoxinas, diferentes gêneros de fungos e componentes químicos do material particulado podem alterar os resultados, principalmente em animais

sensibilizados, auxiliando a demonstrar as bases moleculares para os mecanismos de resposta imunológica.

Conclusões

- Conclusões Boston

Este estudo mostrou que os fungos representam uma porção significativa do PM_{2.5}.

A comparação entre metodologias de amostragem mostrou que, entre os amostradores de curta duração, os melhores resultados foram fornecidos pelo Personal Burkard quanto à concentração por metro cúbico e diversidade, quando comparado ao amostrador de ar Andersen. De forma similar, entre os amostradores de longa duração, os melhores resultados foram obtidos pelo Recording Burkard quando comparado aos filtros MCE.

O Personal Burkard possui as vantagens listadas acima, porém métodos de cultura não devem ser descartados. Dependendo do objetivo do estudo, é necessário diferenciar alguns gêneros comuns como *Aspergillus sp* e *Penicillium sp*.

O Recording Burkard possui vantagens adicionais como orientação pelo vento e permite discriminação de horário (dado que a superfície de impactação se movimenta a 2mm/h). No entanto, filtros MCE possuem algumas características particulares como simplicidade da metodologia, além de permitir que diferentes metodologias sejam aplicadas a partir de uma mesma amostra (contagem total, cultura e análise química). Em certas situações como no Concentrador de partículas, não existe outra opção.

- Conclusões São Paulo

Os resultados mostraram que, mais do que a concentração de $PM_{2,5}$, a composição elementar pode resultar em variações no padrão de dispersão dos esporos, concordando com estudo australianos.

Esse estudo possibilitou a identificação inédita de basidiomicetos, importantes indutores de alergias, como principais constituintes da micoflora de diâmetro menor do que 2,5 micrômetros no período amostrado. Tais resultados podem auxiliar em estudos futuros relacionados a doenças respiratórias.

A análise de endotoxinas mostrou correlação positiva com a temperatura no período amostrado concordando com literatura internacional. Esses resultados também podem auxiliar em estudos futuros com foco nos efeitos inflamatórios desse potente componente da parede de bactérias gram-negativas.

Ainda, parece haver um efeito modulatório da exposição concomitante de fungos e $PM_{2,5}$, sendo que altas concentrações de material particulado associado a baixas concentrações de fungos pode levar ao aumento de resposta T_H1 , enquanto baixas concentrações de fungos dada a mesma quantidade de material particulado podem levar a uma diminuição de tal resposta. Mais estudos são necessários a fim de confirmar tais resultados.

Referências

1. Braga A, Pereira LAA, Saldiva PHN. Poluição Atmosférica e seus Efeitos na Saúde Humana. Campinas; 2002.
2. Nemery B, Hoet PHM, Nemmar A. The Meuse Valley fog of 1930: an air pollution disaster. *The Lancet*. 2001;357(9257):704-8.
3. EPA. Clean Air Act. Environmental Protection Agency; 1990.
4. CETESB. Operação inverno 2007 - Qualidade do ar; 2008.
5. PMSP. Decreto nº 50.232, de 17 de novembro de 2008. Prefeitura Municipal de São Paulo; 2008. p. 5.
6. Cançado JED, Braga A, Pereira LAA, Arbex MA, Saldiva PHN, Santos UP. Repercussões clínicas da exposição à poluição atmosférica. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2006;32(2):23-9.
7. Eggleston PA. Complex Interactions of Pollutant and Allergen Exposures and Their Impact on People With Asthma. *Pediatrics*. 2009 March 1, 2009;123(Supplement_3):S160-7.
8. WHO. WHO air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide. Summary of risk assessment. : World Health Organization; 2005.
9. Kim JJ. Ambient air pollution: health hazards to children. *Pediatrics*. 2004 Dec;114(6):1699-707.
10. Pope CA, 3rd, Burnett RT, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, Ito K, et al. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *Jama*. 2002 Mar 6;287(9):1132-41.
11. Churg A, Brauer M, del Carmen Avila-Casado M, Fortoul TI, Wright JL. Chronic exposure to high levels of particulate air pollution and small airway remodeling. *Environ Health Perspect*. 2003 May;111(5):714-8.
12. Boldo E, Medina S, LeTertre A, Hurley F, Mucke HG, Ballester F, et al. Apehis: Health impact assessment of long-term exposure to PM(2.5) in 23 European cities. *Eur J Epidemiol*. 2006;21(6):449-58.
13. Dybing E, Lovdal T, Hetland RB, Lovik M, Schwarze PE. Respiratory allergy adjuvant and inflammatory effects of urban ambient particles. *Toxicology*. 2004 May 20;198(1-3):307-14.
14. Fujii T, Hayashi S, Hogg JC, Vincent R, Van Eeden SF. Particulate matter induces cytokine expression in human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001 Sep;25(3):265-71.
15. Peden DB. Air pollution in asthma: effect of pollutants on airway inflammation. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2001 Dec;87(6 Suppl 3):12-7.
16. Peden DB. Pollutants and asthma: role of air toxics. *Environ Health Perspect*. 2002 Aug;110 Suppl 4:565-8.
17. Sram RJ, Binkova B, Rossner P, Rubes J, Topinka J, Dejmek J. Adverse reproductive outcomes from exposure to environmental mutagens. *Mutat Res*. 1999 Jul 16;428(1-2):203-15.

18. Laden F, Schwartz J, Speizer FE, Dockery DW. Reduction in fine particulate air pollution and mortality: Extended follow-up of the Harvard Six Cities study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Mar 15;173(6):667-72.
19. Klemm RJ, Mason RM, Jr., Heilig CM, Neas LM, Dockery DW. Is daily mortality associated specifically with fine particles? Data reconstruction and replication of analyses. *J Air Waste Manag Assoc*. 2000 Jul;50(7):1215-22.
20. Dockery DW, Pope CA, 3rd, Xu X, Spengler JD, Ware JH, Fay ME, et al. An association between air pollution and mortality in six U.S. cities. *N Engl J Med*. 1993 Dec 9;329(24):1753-9.
21. Jerrett M, Burnett RT, Ma R, Pope CA, 3rd, Krewski D, Newbold KB, et al. Spatial analysis of air pollution and mortality in Los Angeles. *Epidemiology*. 2005 Nov;16(6):727-36.
22. Pope CA, 3rd, Burnett RT, Thurston GD, Thun MJ, Calle EE, Krewski D, et al. Cardiovascular mortality and long-term exposure to particulate air pollution: epidemiological evidence of general pathophysiological pathways of disease. *Circulation*. 2004 Jan 6;109(1):71-7.
23. Pope CA, 3rd, Ezzati M, Dockery DW. Fine-particulate air pollution and life expectancy in the United States. *N Engl J Med*. 2009 Jan 22;360(4):376-86.
24. Saldiva PH, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy GG, et al. Lung inflammation induced by concentrated ambient air particles is related to particle composition. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Jun 15;165(12):1610-7.
25. Maciejczyk P, Chen LC. Effects of subchronic exposures to concentrated ambient particles (CAPs) in mice. VIII. Source-related daily variations in in vitro responses to CAPs. *Inhal Toxicol*. 2005 Apr;17(4-5):243-53.
26. Ostro B, Feng WY, Broadwin R, Green S, Lipsett M. The effects of components of fine particulate air pollution on mortality in California: results from CALFINE. *Environ Health Perspect*. 2007 Jan;115(1):13-9.
27. Schwartz J, Dockery DW, Neas LM. Is daily mortality associated specifically with fine particles? *J Air Waste Manag Assoc*. 1996 Oct;46(10):927-39.
28. Camargo Pires-Neto R, Julia Lichtenfels A, Regina Soares S, Macchione M, Hilario Nascimento Saldiva P, Dolhnikoff M. Effects of Sao Paulo air pollution on the upper airways of mice. *Environ Res*. 2006 Jul;101(3):356-61.
29. Lemos M, Mohallen S, Macchione M, Dolhnikoff M, Assun, o J, et al. Chronic Exposure to Urban Air Pollution Induces Structural Alterations in Murine Pulmonary and Coronary Arteries. *Inhalation Toxicology*. 2006;18:247-53.
30. Mohallem SV, Jã de Araújo Lobo D, Regina Pesquero C, Vicente Assunção J, Afonso de Andre P, Hilário Nascimento Saldiva P, et al. Decreased fertility in mice exposed to environmental air pollution in the city of Sao Paulo. *Environmental Research*. 2005;98(2):196-202.
31. Lichtenfels AJFC, Gomes JB, Pieri PC, El Khouri Miraglia SG, Hallak J, Saldiva PHN. Increased levels of air pollution and a decrease in the human and mouse male-to-female ratio in São Paulo, Brazil. *Fertility and Sterility*. 2007;87(1):230-2.

32. Cendon S, Pereira LAA, Braga A, Conceição GMS, Junior AC, Romaldini H, et al. Air pollution effects on myocardial infarction. *Revista de Saúde Pública*. 2006;40(3):414-9.
33. Martins LC, Pereira LAA, Lin CA, Santos UP, Prioli G, Luiz OC, et al. Efeitos da poluição do ar nas doenças cardiovasculares: estruturas de defasagem. *Rev Saúde Pública* 2006;40(4):677-83.
34. Miraglia SGEK, Saldiva PHN, Böhm GM. An Evaluation of Air Pollution Health Impacts and Costs in São Paulo, Brazil. *Environmental Management*. 2005;35(5):667-76.
35. Turnbull AB, Harrison RM. Major component contributions to PM10 composition in the UK atmosphere. *Atmospheric Environment*. 2000;34(19):3129-37.
36. Latha KM, Badarinath KV. Seasonal variations of PM10 and PM2.5 particles loading over tropical urban environment. *Int J Environ Health Res*. 2005 Feb;15(1):63-8.
37. Katsouyanni K, Touloumi G, Samoli E, Gryparis A, Le Tertre A, Monopolis Y, et al. Confounding and effect modification in the short-term effects of ambient particles on total mortality: results from 29 European cities within the APHEA2 project. *Epidemiology*. 2001 Sep;12(5):521-31.
38. Becker S, Dailey LA, Soukup JM, Grambow SC, Devlin RB, Huang YC. Seasonal variations in air pollution particle-induced inflammatory mediator release and oxidative stress. *Environ Health Perspect*. 2005 Aug;113(8):1032-8.
39. Kim BM, Teffera S, Zeldin MD. Characterization of PM2.5 and PM10 in the South Coast Air Basin of southern California: Part. 2--Temporal variations. *J Air Waste Manag Assoc*. 2000 Dec;50(12):2045-59.
40. Kim BM, Teffera S, Zeldin MD. Characterization of PM2.5 and PM10 in the South Coast Air Basin of southern California: Part 1--Spatial variations. *J Air Waste Manag Assoc*. 2000 Dec;50(12):2034-44.
41. Chow JC, Watson JG, Edgerton SA, Vega E. Chemical composition of PM2.5 and PM10 in Mexico City during winter 1997. *Sci Total Environ*. 2002 Mar 27;287(3):177-201.
42. Edgerton ES, Hartsell BE, Saylor RD, Jansen JJ, Hansen DA, Hidy GM. The Southeastern Aerosol Research and Characterization Study, part 3: continuous measurements of fine particulate matter mass and composition. *J Air Waste Manag Assoc*. 2006 Sep;56(9):1325-41.
43. Wang X, Bi X, Sheng G, Fu J. Chemical composition and sources of PM10 and PM2.5 aerosols in Guangzhou, China. *Environ Monit Assess*. 2006 Aug;119(1-3):425-39.
44. Vallius M, Janssen NA, Heinrich J, Hoek G, Ruuskanen J, Cyrys J, et al. Sources and elemental composition of ambient PM(2.5) in three European cities. *Sci Total Environ*. 2005 Jan 20;337(1-3):147-62.
45. Azevedo DC, Oliveira DS, Guimarães HMB, Martins RSL, Macchiore M, Saldiva PHN. Comparação dos efeitos do material particulado em suspensão (PTS) colhido em diferentes fontes emissoras de poluentes sobre a embriogênese em ovos de galinha. *J Braz Soc Ecotoxicol*. 2006;1(1):53-6.

46. Carvalho-Oliveira R, Pozo RM, Lobo DJ, Lichtenfels AJ, Martins-Junior HA, Bustilho JO, et al. Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of ambient particles: a case study in Sao Paulo, Brazil. *Environ Res.* 2005 May;98(1):1-7.
47. WHO. Air quality guidelines. Global update.: World Health Organization; 2005.
48. Medeiros N, Rivero DHRF, Kasahara DI, Saiki M, Godleski JJ, Koutrakis P, et al. Acute pulmonary and hematological effects of two types of particle surrogates are influenced by their elemental composition. *Environmental Research.* 2004;95(1):62-70.
49. Clarke RW, Coull B, Reinisch U, Catalano P, Killingsworth CR, Koutrakis P, et al. Inhaled concentrated ambient particles are associated with hematologic and bronchoalveolar lavage changes in canines. *Environ Health Perspect.* 2000 Dec;108(12):1179-87.
50. Fuga A, Saiki M, Marcelli MP, Saldiva PH. Atmospheric pollutants monitoring by analysis of epiphytic lichens. *Environ Pollut.* 2008 Jan;151(2):334-40.
51. Churg A, Brauer M. Ambient atmospheric particles in the airways of human lungs. *Ultrastruct Pathol.* 2000 Nov-Dec;24(6):353-61.
52. Park SS, Kim YJ. Source contributions to fine particulate matter in an urban atmosphere. *Chemosphere.* 2005 Apr;59(2):217-26.
53. Sioutas C, Koutrakis P, Burton RM. A technique to expose animals to concentrated fine ambient aerosols. *Environ Health Perspect.* 1995 Feb;103(2):172-7.
54. Morishita M, Keeler G, Wagner J, Marsik F, Timm E, Dvonch J, et al. Pulmonary retention of particulate matter is associated with airway inflammation in allergic rats exposed to air pollution in urban Detroit. *Inhal Toxicol.* 2004 Sep;16(10):663-74.
55. Harkema JR, Keeler G, Wagner J, Morishita M, Timm E, Hotchkiss J, et al. Effects of concentrated ambient particles on normal and hypersecretory airways in rats. *Res Rep Health Eff Inst.* 2004 Aug(120):1-68; discussion 9-79.
56. Gong H, Jr., Linn WS, Sioutas C, Terrell SL, Clark KW, Anderson KR, et al. Controlled exposures of healthy and asthmatic volunteers to concentrated ambient fine particles in Los Angeles. *Inhal Toxicol.* 2003 Apr 11;15(4):305-25.
57. Gong H, Linn WS, Terrell SL, Anderson KR, Clark KW, Sioutas C, et al. Exposures of elderly volunteers with and without chronic obstructive pulmonary disease (COPD) to concentrated ambient fine particulate pollution. *Inhal Toxicol.* 2004 Oct-Nov;16(11-12):731-44.
58. D'Amato G, Liccardi G, D'Amato M, Cazzola M. Outdoor air pollution, climatic changes and allergic bronchial asthma. *Eur Respir J.* 2002 Sep;20(3):763-76.
59. Knox RB, Suphioglu C, Taylor P, Desai R, Watson HC, Peng JL, et al. Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution. *Clin Exp Allergy.* 1997 Mar;27(3):246-51.

60. Glikson M, Rutherford S, Simpson RW, Mitchel ICA, Yago A. Microscopic and submicron components of atmospheric particulate matter during high asthma periods in Brisbane, Queensland, Australia. *Atmospheric Environment*. 1995;29(4):549-62.
61. Matthias-Maser S, Jaenicke R. The size distribution of primary biological aerosol particles with radii > 0.2 [μ m] in an urban/rural influenced region. *Atmospheric Research*. 1995;39(4):279-86.
62. Matthias-Maser S, Obolkin V, Khodzer T, Jaenicke R. Seasonal variation of primary biological aerosol particles in the remote continental region of lake baikal/siberia. *Journal of Aerosol Science*. 1998;29:545-6.
63. Elbert W, Taylor PE, Andreae MO, Pöschl U. Contribution of fungi to primary biogenic aerosols in the atmosphere: wet and dry discharged spores, carbohydrates, and inorganic ions. *Atmos Chem Phys*. 2007;7:4569-88.
64. Boreson J, Dillner AM, Peccia J. Correlating bioaerosol load with PM_{2.5} and PM₁₀ concentrations: a comparison between natural desert and urban-fringe aerosols. *Atmospheric Environment* 2004;38(35):6029-41.
65. Lierl MB, Hornung RW. Relationship of outdoor air quality to pediatric asthma exacerbations. *Ann Allergy Asthma Immunol*. 2003 Jan;90(1):28-33.
66. Adhikari A, Reponen T, Grinshpun SA, Martuzevicius D, LeMasters G. Correlation of ambient inhalable bioaerosols with particulate matter and ozone: a two-year study. *Environ Pollut*. 2006 Mar;140(1):16-28.
67. Douwes J, Thorne P, Pearce N, Heederik D. Bioaerosol health effects and exposure assessment: progress and prospects. *Ann Occup Hyg*. 2003 Apr;47(3):187-200.
68. Dales RE, Cakmak S, Judek S, Dann T, Coates F, Brook JR, et al. Influence of outdoor aeroallergens on hospitalization for asthma in Canada. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Feb;113(2):303-6.
69. Huang SL, Cheng WL, Lee CT, Huang HC, Chan CC. Contribution of endotoxin in macrophage cytokine response to ambient particles in vitro. *J Toxicol Environ Health A*. 2002 Sep 13;65(17):1261-72.
70. Jacobs RR. Airborne Endotoxins: An Association with Occupational Lung Disease. *Appl Ind Hyg*. 1989;4:50-6.
71. Thorne PS. Inhalation toxicology models of endotoxin- and bioaerosol-induced inflammation. *Toxicology*. 2000 Nov 2;152(1-3):13-23.
72. Khan SA, Everest P, Servos S, Foxwell N, Zahringer U, Brade H, et al. A lethal role for lipid A in Salmonella infections. *Mol Microbiol*. 1998 Jul;29(2):571-9.
73. Munford RS, Varley AW. Shield as signal: lipopolysaccharides and the evolution of immunity to gram-negative bacteria. *PLoS Pathog*. 2006 Jun;2(6):e67.
74. Kabir K, Gelinis JP, Chen M, Chen D, Zhang D, Luo X, et al. Characterization of a murine model of endotoxin-induced acute lung injury. *Shock*. 2002 Apr;17(4):300-3.
75. Preas HL, 2nd, Jubran A, Vandivier RW, Reda D, Godin PJ, Banks SM, et al. Effect of endotoxin on ventilation and breath variability: role of

cyclooxygenase pathway. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001 Aug 15;164(4):620-6.

76. Smid T, Heederik D, Houba R, Quanjer PH. Dust- and endotoxin-related acute lung function changes and work-related symptoms in workers in the animal feed industry. *Am J Ind Med.* 1994 Jun;25(6):877-88.

77. Kline JN, Cowden JD, Hunninghake GW, Schutte BC, Watt JL, Wohlford-Lenane CL, et al. Variable airway responsiveness to inhaled lipopolysaccharide. *Am J Respir Crit Care Med.* 1999 Jul;160(1):297-303.

78. Michel O, Ginanni R, Duchateau J, Vertongen F, Le Bon B, Sergysels R. Domestic endotoxin exposure and clinical severity of asthma. *Clin Exp Allergy.* 1991 Jul;21(4):441-8.

79. Thorne PS, Kulhankova K, Yin M, Cohn R, Arbes SJ, Jr., Zeldin DC. Endotoxin exposure is a risk factor for asthma: the national survey of endotoxin in United States housing. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Dec 1;172(11):1371-7.

80. Liu AH. Endotoxin exposure in allergy and asthma: reconciling a paradox. *J Allergy Clin Immunol.* 2002 Mar;109(3):379-92.

81. Liu AH, Redmon AH, Jr. Endotoxin: friend or foe? *Allergy Asthma Proc.* 2001 Nov-Dec;22(6):337-40.

82. Wurfel MM, Park WY, Radella F, Ruzinski J, Sandstrom A, Strout J, et al. Identification of high and low responders to lipopolysaccharide in normal subjects: an unbiased approach to identify modulators of innate immunity. *J Immunol.* 2005 Aug 15;175(4):2570-8.

83. Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med.* 2002 Dec 16;196(12):1645-51.

84. Alexis NE, Lay JC, Almond M, Peden DB. Inhalation of low-dose endotoxin favors local T(H)2 response and primes airway phagocytes in vivo. *J Allergy Clin Immunol.* 2004 Dec;114(6):1325-31.

85. Gillespie J, Wickens K, Siebers R, Howden-Chapman P, Town I, Epton M, et al. Endotoxin exposure, wheezing, and rash in infancy in a New Zealand birth cohort. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 Dec;118(6):1265-70.

86. Bolte G, Bischof W, Borte M, Lehmann I, Wichmann HE, Heinrich J. Early endotoxin exposure and atopy development in infants: results of a birth cohort study. *Clin Exp Allergy.* 2003 Jun;33(6):770-6.

87. Perzanowski MS, Miller RL, Thorne PS, Barr RG, Divjan A, Sheares BJ, et al. Endotoxin in inner-city homes: associations with wheeze and eczema in early childhood. *J Allergy Clin Immunol.* 2006 May;117(5):1082-9.

88. Rizzo MC, Naspitz CK, Fernandez-Caldas E, Lockey RF, Mimica I, Sole D. Endotoxin exposure and symptoms in asthmatic children. *Pediatr Allergy Immunol.* 1997 Aug;8(3):121-6.

89. Liu AH, Leung DY. Modulating the early allergic response with endotoxin. *Clin Exp Allergy.* 2000 Nov;30(11):1536-9.

90. Martinez KF, Rao RY, Burton NC. Exposure assessment and analysis for biological agents

Grana. 2004;43(4):193 - 208

91. Douwes J, Pearce N, Heederik D. Does environmental endotoxin exposure prevent asthma? *Thorax*. 2002 Jan;57(1):86-90.

92. Gehring U, Bischof W, Borte M, Herbarth O, Wichmann HE, Heinrich J. Levels and predictors of endotoxin in mattress dust samples from East and West German homes. *Indoor Air*. 2004 Aug;14(4):284-92.

93. Park JH, Spiegelman DL, Burge HA, Gold DR, Chew GL, Milton DK. Longitudinal study of dust and airborne endotoxin in the home. *Environ Health Perspect*. 2000 Nov;108(11):1023-8.

94. Park JH, Spiegelman DL, Gold DR, Burge HA, Milton DK. Predictors of airborne endotoxin in the home. *Environ Health Perspect*. 2001 Aug;109(8):859-64.

95. Carty CL, Gehring U, Cyrus J, Bischof W, Heinrich J. Seasonal variability of endotoxin in ambient fine particulate matter. *J Environ Monit*. 2003 Dec;5(6):953-8.

96. Steerenberg PA, Withagen CE, van Dalen WJ, Dormans JA, Cassee FR, Heisterkamp SH, et al. Adjuvant activity of ambient particulate matter of different sites, sizes, and seasons in a respiratory allergy mouse model. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004 Nov 1;200(3):186-200.

97. Osornio-Vargas AR, Bonner JC, Alfaro-Moreno E, Martinez L, Garcia-Cuellar C, Ponce-de-Leon Rosales S, et al. Proinflammatory and cytotoxic effects of Mexico City air pollution particulate matter in vitro are dependent on particle size and composition. *Environ Health Perspect*. 2003 Aug;111(10):1289-93.

98. Hetland RB, Cassee FR, Lag M, Refsnes M, Dybing E, Schwarze PE. Cytokine release from alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter: heterogeneity in relation to size, city and season. *Part Fibre Toxicol*. 2005 Aug 17;2:4.

99. Schins RP, Lightbody JH, Borm PJ, Shi T, Donaldson K, Stone V. Inflammatory effects of coarse and fine particulate matter in relation to chemical and biological constituents. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004 Feb 15;195(1):1-11.

100. Heinrich J, Pitz M, Bischof W, Krug N, Borm PJA. Endotoxin in fine (PM sub(2.5)) and coarse (PM sub(2.5-10)) particle mass of ambient aerosols. A temporo-spatial analysis *Atmospheric Environment* 2003;37(26):3659-67.

101. Lee AKY, Chan CK, Fang M, Lau APS. The 3-hydroxy fatty acids as biomarkers for quantification and characterization of endotoxins and Gram-negative bacteria in atmospheric aerosols in Hong Kong *Atmospheric Environment* 2004;38(37):6307-17.

102. Mueller-Anneling L, Avol E, Peters JM, Thorne PS. Ambient endotoxin concentrations in PM10 from Southern California. *Environ Health Perspect*. 2004 Apr;112(5):583-8.

103. Imrich A, Ning Y, Kobzik L. Insoluble components of concentrated air particles mediate alveolar macrophage responses in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2000 Sep 1;167(2):140-50.

104. Ning Y, Imrich A, Goldsmith CA, Qin G, Kobzik L. Alveolar macrophage cytokine production in response to air particles in vitro: role of endotoxin. *J Toxicol Environ Health A*. 2000 Feb 11;59(3):165-80.
105. Bonner JC, Rice AB, Lindroos PM, O'Brien PO, Dreher KL, Rosas I, et al. Induction of the lung myofibroblast PDGF receptor system by urban ambient particles from Mexico City. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1998 Oct;19(4):672-80.
106. Alfaro-Moreno E, Martinez L, Garcia-Cuellar C, Bonner JC, Murray JC, Rosas I, et al. Biologic effects induced in vitro by PM10 from three different zones of Mexico City. *Environ Health Perspect*. 2002 Jul;110(7):715-20.
107. Monn C, Becker S. Cytotoxicity and induction of proinflammatory cytokines from human monocytes exposed to fine (PM2.5) and coarse particles (PM10-2.5) in outdoor and indoor air. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1999 Mar 15;155(3):245-52.
108. Alexis NE, Lay JC, Zeman K, Bennett WE, Peden DB, Soukup JM, et al. Biological material on inhaled coarse fraction particulate matter activates airway phagocytes in vivo in healthy volunteers. *J Allergy Clin Immunol*. 2006 Jun;117(6):1396-403.
109. Dong W, Lewtas J, Luster MI. Role of endotoxin in tumor necrosis factor alpha expression from alveolar macrophages treated with urban air particles. *Exp Lung Res*. 1996 Sep-Oct;22(5):577-92.
110. 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 Dec;141(2):637-48.
111. Becker S, Fenton MJ, Soukup JM. Involvement of microbial components and toll-like receptors 2 and 4 in cytokine responses to air pollution particles. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002 Nov;27(5):611-8.
112. Becker S, Soukup JM, Sioutas C, Cassee FR. Response of human alveolar macrophages to ultrafine, fine, and coarse urban air pollution particles. *Exp Lung Res*. 2003 Jan-Feb;29(1):29-44.
113. Daniels AU, Barnes FH, Charlebois SJ, Smith RA. Macrophage cytokine response to particles and lipopolysaccharide in vitro. *J Biomed Mater Res*. 2000 Mar 15;49(4):469-78.
114. Soukup JM, Becker S. Human alveolar macrophage responses to air pollution particulates are associated with insoluble components of coarse material, including particulate endotoxin. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2001 Feb 15;171(1):20-6.
115. Long CM, Suh HH, Kobzik L, Catalano PJ, Ning YY, Koutrakis P. A pilot investigation of the relative toxicity of indoor and outdoor fine particles: in vitro effects of endotoxin and other particulate properties. *Environ Health Perspect*. 2001 Oct;109(10):1019-26.
116. Hawksworth DL, Kirk PM, Sutton BC, Pegler DN. *Ainsworth & Bisby's dictionary of fungi*. Cambridge: Ed. University Press; 1995.

117. Haines J, Escamilla B, Muilenberg ML, Gallup J, Levetin E. Mycology of the air. An introduction to the sampling and identification of airborne fungus spores. Tucson, Arizona; 2000.
118. Black PN, Udy AA, Brodie SM. Sensitivity to fungal allergens is a risk factor for life-threatening asthma. *Allergy*. 2000 May;55(5):501-4.
119. Bush RK, Prochnau JJ. *Alternaria*-induced asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Feb;113(2):227-34.
120. Burge HA, Rogers CA. Outdoor allergens. *Environ Health Perspect*. 2000 Aug;108 Suppl 4:653-9.
121. Chiappeta AA, de Sena KXFR, L dH. Environmental Factors Affecting Sporulation of *Fuligo Septica* (Myxomycetes) on Sugar Cane Bagasse. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2003;46(1):7-12.
122. Giannini EH, Northey WT, Leathers CR. The allergenic significance of certain fungi rarely reported as allergens. *Ann Allergy*. 1975 Dec;35(6):372-6.
123. Levetin E, Horner WE. Fungal aerobiology: exposure and measurement. *Chem Immunol*. 2002;81:10-27.
124. Burge HA. Some comments on the aerobiology of fungus spores. *Grana*. 1986;25:143-6.
125. Davis WE, Horner WE, Salvaggio JE, Lehrer SB. Basidiospore allergens: analysis of *Coprinus quadrifidus* spore, cap, and stalk extracts. *Clin Allergy*. 1988 May;18(3):261-7.
126. Horner WE, Levetin E, Lehrer SB. Basidiospore allergen release: elution from intact spores. *J Allergy Clin Immunol*. 1993 Aug;92(2):306-12.
127. Horner WE, Ibanez MD, Lehrer SB. Stability studies of *Calvatia cyathiformis* basidiospore allergens. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1989;90(2):174-81.
128. Helbling A, Brander KA, Horner WE, Lehrer SB. Allergy to basidiomycetes. *Chem Immunol*. 2002;81:28-47.
129. Delfino RJ, Zeiger RS, Seltzer JM, Street DH, Matteucci RM, Anderson PR, et al. The effect of outdoor fungal spore concentrations on daily asthma severity. *Environ Health Perspect*. 1997 Jun;105(6):622-35.
130. Osborne M, Reponen T, Adhikari A, Cho SH, Grinshpun SA, Levin L, et al. Specific fungal exposures, allergic sensitization, and rhinitis in infants. *Pediatr Allergy Immunol*. 2006 Sep;17(6):450-7.
131. Lacaz CS, Porto E, Heins-Vaccari EM, de Melo NT. Guia para identificação: fungos, algas e actinomicetos de interesse médico.: Sarvier; 1998.
132. Bush RK, Portnoy JM. The role and abatement of fungal allergens in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2001 Mar;107(3 Suppl):S430-40.
133. Bavbek S, Erkekol FO, Ceter T, Mungan D, Ozer F, Pinar M, et al. Sensitization to *Alternaria* and *Cladosporium* in patients with respiratory allergy and outdoor counts of mold spores in Ankara atmosphere, Turkey. *J Asthma*. 2006 Aug;43(6):421-6.
134. Gambale W, Purchio A, Croce J. A flora anemófila da Grande São Paulo. *Rev Microbiol*. 1977;44:74-9.

135. Almeida F, Brandão CH, Monteiro EL, Moura RA. Flora micológica do ar: sua significação e importância. *Revista Instituto Adolfo Lutz*. 1951;11(5).
136. Croce J, Silva EGMd, Furtado EL, Queluz THAT. Estudo dos fungos anemófilos da cidade de Botucatu e sua correlação com sensibilização em pacientes com doenças alérgicas respiratórias. *Rev bras alergologia imunopatol*. 2003;26(3):95-109.
137. De Lima JA, Gadelha W. Pollution of fungal airborne spore in the city of Recife (Pernambuco-Brasil). *Revista Latinoamericana de Microbiologia* 1983;25(4):243-51.
138. Oliveira MTBd, Braz RFS, Ribeiro MAG. Airborne fungi isolated from Natal, State of Rio Grande do Norte-Brazil. *Rev microbiol*. 1993;24(3):198-202.
139. Menezes EA, Trindade EC, Costa MM, Freire CC, Cavalcante Mde S, Cunha FA. Airborne fungi isolated from Fortaleza city, State of Ceara, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2004 May-Jun;46(3):133-7.
140. Buck N, Gambale W, Paula CR. Microbiota fungica anemofila da cidade de Presidente Prudente, Estado de Sao Paulo, Brasil *Rev microbiol*. 1985;16(1):9-14.
141. Mezzari A, Perin C, Santos SA, Bernd LA. Airborne fungi in the city of Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2002 Sep-Oct;44(5):269-72.
142. Mezzari A, Perin C, Santos SA, Jr., Bernd LA, Di Gesu G. Os fungos anemófilos e sensibilização em indivíduos atópicos em Porto Alegre, RS. *Rev Assoc Med Bras*. 2003;49(3):270-3.
143. De Antoni Zoppas B, Valencia-Barrera R, Vergamini DS, Fernández-González D. Fungal spores prevalent in the aerosol of the city of Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil, over a 2-year period (2001–2002). *Aerobiologia*. 2006;22(2):117-24.
144. Troutt C, Levetin E. Correlation of spring spore concentrations and meteorological conditions in Tulsa, Oklahoma. *Int J Biometeorol*. 2001 Jul;45(2):64-74.
145. Haard RT, Kramer CL. Periodicity of Spore Discharge in the Hymenomyces. *Mycologia*. 1970;62(6):1145-69.
146. Burch M, Levetin E. Effects of meteorological conditions on spore plumes. *Int J Biometeorol*. 2002 Aug;46(3):107-17.
147. Gambale W, Purchio A, Paula CR. Periodicidade diaria de fungos anemófilos na cidade de Sao Paulo, Brasil. *Rev microbiol*. 1981;12(4):176-81.
148. Gambale W, Purchio A, Paula CR. Influência de fatores abióticos na dispersão aérea de fungos na cidade de Sao Paulo, Brasil. *Rev microbiol*. 1983;14(3):204-14.
149. Segvic Klaric M, Pepeljnjak S. A year-round aeromycological study in Zagreb area, Croatia. *Ann Agric Environ Med*. 2006;13(1):55-64.
150. Mitakakis TZ, O'meara TJ, Tovey ER. The effect of sunlight on allergen release from spores of the fungus *Alternaria*. *Grana*. 2003;42(1):43-6.

151. Li DW, Kendrick B. A year-round study on functional relationships of airborne fungi with meteorological factors. *Int J Biometeorol*. 1995 Nov;39(2):74-80.
152. Bernardi E, da Costa ELG, Do Nascimento JS. Fungos anemófilos e suas relações com fatores abióticos, na praia do Laranjal, Pelotas, RS. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*. 2006;6(1):91-6.
153. Kauffman HF, Tomee JF, van de Riet MA, Timmerman AJ, Borger P. Protease-dependent activation of epithelial cells by fungal allergens leads to morphologic changes and cytokine production. *J Allergy Clin Immunol*. 2000 Jun;105(6 Pt 1):1185-93.
154. Inoue Y, Matsuwaki Y, Shin SH, Ponikau JU, Kita H. Nonpathogenic, environmental fungi induce activation and degranulation of human eosinophils. *J Immunol*. 2005 Oct 15;175(8):5439-47.
155. Beijer L, Thorn J, Rylander R. Mould exposure at home relates to inflammatory markers in blood. *Eur Respir J*. 2003 Feb;21(2):317-22.
156. Hirvonen MR, Ruotsalainen M, Roponen M, Hyvarinen A, Husman T, Kosma VM, et al. Nitric oxide and proinflammatory cytokines in nasal lavage fluid associated with symptoms and exposure to moldy building microbes. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Dec;160(6):1943-6.
157. Sigsgaard T, Bonefeld-Jorgensen EC, Kjaergaard SK, Mamas S, Pedersen OF. Cytokine release from the nasal mucosa and whole blood after experimental exposures to organic dusts. *Eur Respir J*. 2000 Jul;16(1):140-5.
158. Young SH, Roberts JR, Antonini JM. Pulmonary exposure to 1 --> 3-beta-glucan alters adaptive immune responses in rats. *Inhal Toxicol*. 2006 Oct;18(11):865-74.
159. Instanes C, Ormstad H, Rydjord B, Wiker HG, Hetland G. Mould extracts increase the allergic response to ovalbumin in mice. *Clin Exp Allergy*. 2004 Oct;34(10):1634-41.
160. Ormstad H, Groeng EC, Lovik M, Hetland G. The fungal cell wall component beta-1,3-glucan has an adjuvant effect on the allergic response to ovalbumin in mice. *J Toxicol Environ Health A*. 2000 Sep 15;61(1):55-67.
161. Rylander R, Holt PG. (1-->3)-beta-D-glucan and endotoxin modulate immune response to inhaled allergen. *Mediators Inflamm*. 1998;7(2):105-10.
162. Jones AM, Harrison RM. The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations--a review. *Sci Total Environ*. 2004 Jun 29;326(1-3):151-80.
163. Womiloju TO, Miller JD, Mayer PM, Brook JR. Methods to determine the biological composition of particulate matter collected from outdoor air *Atmospheric Environment* 2003;37(31):4335-44.
164. Etzel RA, Montana E, Sorenson WG, Kullman GJ, Allan TM, Dearborn DG, et al. Acute pulmonary hemorrhage in infants associated with exposure to *Stachybotrys atra* and other fungi. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 1998 Aug;152(8):757-62.

165. Brasel TL, Douglas DR, Wilson SC, Straus DC. Detection of airborne *Stachybotrys chartarum* macrocyclic trichothecene mycotoxins on particulates smaller than conidia. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Jan;71(1):114-22.
166. Schoenlein-Crusius IH, Trufem SFB, Grandi RAP, Milanez AI, Pires-Zottarelli CLA. Airborne fungi in the region of Cubatão, São Paulo State, Brazil. *Braz J Microbiol.* 2001;32(1):61-5.
167. Purchio A, Gambale W, Paula CR, Ugolini C, Remie CA. Airborne fungi of Baixada Santista, State of Sao Paulo, Brazil. *Rev microbiol.* 1984;15(4):258-65.
168. Gingell SM, Campbell R, Martin MH. The effect of zinc, lead and cadmium pollution on the leaf surface microflora. *Environmental Pollution (1970).* 1976;11(1):25-37.
169. Mastalerz M, Glikson M, Simpson RW. Analysis of atmospheric particulate matter; application of optical and selected geochemical techniques. *International Journal of Coal Geology.* 1998;37(1-2):143-53.
170. Ho H-M, Rao CY, Hsu H-H, Chiu Y-H, Liu C-M, Chao HJ. Characteristics and determinants of ambient fungal spores in Hualien, Taiwan. *Atmospheric Environment.* 2005;39(32):5839-50.
171. Lee RE, Harris K, Akland G. Relationship between Viable Bacteria and Air Pollutants in an Urban Atmosphere. *American Industrial Hygiene Association Journal.* 1973;34(4):164 - 70.
172. White DC. Analysis of microorganisms in terms of quantity and activity in natural environments. *Soc Gen Microbiol.* 1983;34:37-66.
173. Beggs CB. The airborne transmission of infection in hospital buildings: fact or fiction? . *Indoor and Built Environment.* 2003;12(1-2):9-18.
174. Dillon HK, Heinsohn PA, Miller JD. Field guide for the determination of biological contaminants in environmental samples.: Fairfax VA: American Industrial Hygiene Association.; 1996.
175. Saraf A, Larsson L, Burge H, Milton D. Quantification of ergosterol and 3-hydroxy fatty acids in settled house dust by gas chromatography-mass spectrometry: comparison with fungal culture and determination of endotoxin by a *Limulus* amoebocyte lysate assay. *Appl Environ Microbiol.* 1997 Jul;63(7):2554-9.
176. Levetin E. Methods for aeroallergen sampling. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2004 Sep;4(5):376-83.
177. Milton DK, Feldman HA, Neuberg DS, Bruckner RJ, Greaves IA. Environmental endotoxin measurement: the Kinetic *Limulus* Assay with Resistant-parallel-line Estimation. *Environ Res.* 1992 Apr;57(2):212-30.
178. Milton DK, Johnson DK, Park JH. Environmental endotoxin measurement: interference and sources of variation in the *Limulus* assay of house dust. *Am Ind Hyg Assoc J.* 1997;58(12):861-7.
179. Thorne PS, Reynolds SJ, Milton DK, Bloebaum PD, Zhang X, Whitten P, et al. Field evaluation of endotoxin air sampling assay methods. *Am Ind Hyg Assoc J.* 1997 Nov;58(11):792-9.
180. Ding JL, Ho B. A new era in pyrogen testing. *Trends Biotechnol.* 2001 Aug;19(8):277-81.

181. Park JH, Szponar B, Larsson L, Gold DR, Milton DK. Characterization of lipopolysaccharides present in settled house dust. *Appl Environ Microbiol.* 2004 Jan;70(1):262-7.
182. Foto M, Plett J, Berghout J, Miller JD. Modification of the *Limulus* amoebocyte lysate assay for the analysis of glucan in indoor environments. *Anal Bioanal Chem.* 2004 May;379(1):156-62.
183. Foto M, Vrijmoed LL, Miller JD, Ruest K, Lawton M, Dales RE. A comparison of airborne ergosterol, glucan and Air-O-Cell data in relation to physical assessments of mold damage and some other parameters. *Indoor Air.* 2005 Aug;15(4):257-66.
184. Andersen AA. New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles. *J Bacteriol.* 1958 Nov;76(5):471-84.
185. Rogers C, Muilenberg ML. Comprehensive guidelines for the operation of first-type suction bioaerosol samplers. . 2001 November 2, 2001 [cited; Available from: <http://www.geocities.com/paaaorg/StandardizedProtocols.pdf>
186. Castanho ADA. A determinação quantitativa de fontes de material particulado da atmosfera da cidade de São Paulo. São Paulo: Universidade de São Paulo; 1999.
187. Chen LC, Hwang JS. Effects of subchronic exposures to concentrated ambient particles (CAPs) in mice. IV. Characterization of acute and chronic effects of ambient air fine particulate matter exposures on heart-rate variability. *Inhal Toxicol.* 2005 Apr;17(4-5):209-16.
188. Devlin RB, Ghio AJ, Kehrl H, Sanders G, Cascio W. Elderly humans exposed to concentrated air pollution particles have decreased heart rate variability. *Eur Respir J Suppl.* 2003 May;40:76s-80s.
189. Nasman A, Blomquist G, Levin JO. Air sampling of fungal spores on filters. An investigation on passive sampling and viability. *J Environ Monit.* 1999 Aug;1(4):361-5.
190. Durand KT, Muilenberg ML, Burge HA, Seixas NS. Effect of sampling time on the culturability of airborne fungi and bacteria sampled by filtration. *Ann Occup Hyg.* 2002 Jan;46(1):113-8.
191. Blomquist G. Sampling of biological particles. *Analyst.* 1994 Jan;119(1):53-6.
192. Lee KS, Bartlett KH, Brauer M, Stephens GM, Black WA, Teschke K. A field comparison of four samplers for enumerating fungal aerosols I. Sampling characteristics. *Indoor Air.* 2004 Oct;14(5):360-6.
193. Buttner MP, Stetzenbach LD. Monitoring airborne fungal spores in an experimental indoor environment to evaluate sampling methods and the effects of human activity on air sampling. *Appl Environ Microbiol.* 1993 Jan;59(1):219-26.
194. Di Giorgio C, Krempff A, Guiraud H, Binder P, Tiret C, Dumenil G. Atmospheric pollution by airborne microorganisms in the city of Marseilles. *Atmospheric Environment.* 1996;30:155-60.

195. Sterling M, Rogers C, Levetin E. An evaluation of two methods used for microscopic analysis of airborne fungal spore concentrations from the Burkard Spore Trap. *Aerobiologia*. 1999;15(1):9-18.
196. Oliveira M, Ribeiro H, Abreu I. Annual variation of fungal spores in atmosphere of Porto: 2003. *Ann Agric Environ Med*. 2005;12(2):309-15.
197. Lin WH, Li CS. Associations of Fungal Aerosols, Air Pollutants, and Meteorological Factors. *Aerosol Science and Technology*. 2000;32:359-68.
198. Lugauskas A, Sveistyte L, Ulevicius V. Concentration and species diversity of airborne fungi near busy streets in Lithuanian urban areas. *Ann Agric Environ Med*. 2003;10(2):233-9.
199. Awad AHA. Vegetation: A source of air fungal bio-contaminant. *Aerobiologia*. 2005;21(1):53-61.
200. Gonianakis MI, Neonakis IK, Gonianakis IM, Baritaki MA, Bouros D, Potamias G, et al. Mold allergy in the Mediterranean Island of Crete, Greece: a 10-year volumetric, aerobiological study with dermal sensitization correlations. *Allergy Asthma Proc*. 2006 Sep-Oct;27(5):354-62.
201. Rebelatto AL. Determinação de índices quantitativos de material particulado inalável nos períodos seco e úmido na cidade de Cuiabá [Dissertação de mestrado]. Cuiabá: Universidade Federal do Mato Grosso; 2005.
202. Sousa SIV, Martins FG, Pereira MC, Alvim-Ferraz MCM, Ribeiro H, Oliveira M, et al. Use of multiple linear regressions to evaluate the influence of O₃ and PM₁₀ on biological pollutants. *PWASET*. 2008;34:486-91.
203. Levetin E, Dorsey K. Contribution of leaf surface fungi to the air spora. *Aerobiologia*. 2006;22(1):3-12.
204. Rich S, Waggoner PE. Atmospheric Concentration of Cladosporium Spores: The concentration has a peculiar diurnal cycle, and it may either increase or decrease during rain. *Science*. 1962 Sep 21;137(3534):962-5.
205. Madsen AM. Airborne endotoxin in different background environments and seasons. *Ann Agric Environ Med*. 2006;13(1):81-6.
206. Rivera A, Van Epps HL, Hohl TM, Rizzuto G, Pamer EG. Distinct CD4+ T-cell responses to live and heat-inactivated *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect Immun*. 2005 Nov;73(11):7170-9.
207. Douwes J. (1→3)-Beta-D-glucans and respiratory health: a review of the scientific evidence. *Indoor Air*. 2005 Jun;15(3):160-9.
208. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai SHIV. *Imunologia Celular e Molecular*. 6o edição ed: Elsevier; 2008.
209. Fogelmark B, Goto H, Yuasa K, Marchat B, Rylander R. Acute pulmonary toxicity of inhaled beta-1,3-glucan and endotoxin. *Agents Actions*. 1992 Jan;35(1-2):50-6.
210. Fogelmark B, Thorn J, Rylander R. Inhalation of (1→3)-β-D-glucan causes airway eosinophilia. *Mediators of Inflammation* 2001;10(1):13-9.
211. Wan GH, Li CS. Indoor endotoxin and glucan in association with airway inflammation and systemic symptoms. *Arch Environ Health*. 1999 May-Jun;54(3):172-9.

212. Heinrich J, Hoelscher B, Wjst M, Ritz B, Cyrus J, Wichmann H. Respiratory diseases and allergies in two polluted areas in East Germany. *Environ Health Perspect*. 1999 Jan;107(1):53-62.
213. Gavett SH, Haykal-Coates N, Copeland LB, Heinrich J, Gilmour MI. Metal composition of ambient PM_{2.5} influences severity of allergic airways disease in mice. *Environ Health Perspect*. 2003 Sep;111(12):1471-7.
214. Straszek SP, Adamcakova-Dodd A, Metwali N, Pedersen OF, Sigsgaard T, Thorne PS. Acute effect of glucan-spiked office dust on nasal and pulmonary inflammation in guinea pigs. *J Toxicol Environ Health A*. 2007 Nov;70(22):1923-8.

Apêndice 1

Slide: _____

Date: _____

Counter: _____

Magnification: _____

Field of View: _____

Types	Part A-	Part B-	Types	Part A-	Part B-
Mitospores			Basidiospores		
<i>Alternaria</i>			Agaricaceae		
<i>Arthrinium</i>			<i>Agrocybe</i> -like		
<i>Botrytis</i>			<i>Conocybe</i> -like		
<i>Cercospora</i>			<i>Coprinus</i> -like		
<i>Cladosporium</i>			<i>Panaeolus/ Psathyrella</i>		
<i>Curvularia</i>			<i>Entoloma</i>		
<i>Drechslera</i> -like			Strophariaceae		
<i>Epicoccum nigrum</i>			<i>Laccaria</i>		
<i>Oidium</i>			Boletaceae		
<i>Fusarium</i>			Cortinariaceae		
<i>Nigrospora sphaerica</i>			<i>Inocybe</i> -type		
<i>Penicillium/Aspergillus</i> -like			<i>Ganoderma</i>		
<i>Periconia</i>			<i>Calvatia/Lycoperdon</i>		
<i>Pestalotia</i> -like			<i>Fomes fomentaria</i>		
<i>Pithomyces chartarum</i>			<i>Russula/Lactarius/Melanophyllum</i>		
<i>Polythrincium trifolii</i>			<i>Scleroderma</i>		
<i>Scopulariopsis</i>			<i>Tomentella</i> -like		
<i>Speggazia</i>			Hyaline basidiospores		
<i>Stachybotrys</i>			Colored basidiospores		
<i>Stemphylium</i>			Allantoid basidiospores		
<i>Tetraploa</i>					
<i>Torula</i>			Teliospores – Smuts (other)		
Other mitospores			<i>Tilletia</i>		
			<i>Urocystis</i>		
Ascospores			<i>Ustilago</i> -type		
<i>Apiospora</i>					
<i>Chaetomium</i>			Urediniospores - Rusts		
Diatrypaceae					
<i>Lasiospheria</i>			Oomycete spores		
<i>Leptosphaeria</i> -like			<i>Albugo</i>		
<i>Ophiobolus</i>			<i>Peronospora/Phytophthora</i>		
<i>Paraphaeosphaeria michotii</i>			<i>Plasmopara</i>		
<i>Phaeosphaeria annulata</i>					
<i>Pleospora</i> -like			Zygomycete spores		
<i>Pleuroceras tenella</i>			<i>Rhizopus</i>		
<i>Sporormiella</i>			<i>Entomophthora</i>		
<i>Venturia</i> -like					
Xylariaceae			Myxomycete spores		
2 celled colored			<i>Fuligo/Lycogola/Stemonitis</i>		
2 celled colorless					
Other ascospores			Unknown		

Apêndice 2

Lavagem e esterilização de utensílios e vidraria para utilização na análise de endotoxina

1- Lavagem

Lavar com detergente neutro. Se tiver utilizado vidro, apenas com água ou tampão e enxaguar apenas com água destilada. Realizar o mesmo procedimento para pinças.

2- Aquecimento

Colocar uma camada dupla de alumínio nas bocas dos vidros e superfícies expostas. Colocar os tubos abertos e de cabeça para baixo em um Becker e tampar a boca do Becker com duas camadas de alumínio.

Colocar o material em um forno e aquecer a 270°C por 30 minutos.

3- Esterilização

As tampas devem ser esterilizadas em autoclave a 250 °C em ciclo de 15 minutos.

Apêndice 3



Basidiósporo hialino ao centro (magnificação 1000X, tamanho aproximado – 3 μm). Amostrador de ar Personal Burkard, atmosfera de Boston, MA.



Coprinus sp (magnificação 1000X, tamanho aproximado – 6 μm). Amostrador de ar Personal Burkard, atmosfera de Boston, MA.



Basidiósporo da família Boletaceae (magnificação 1000X, tamanho aproximado – 12 μm). Amostrador de ar Personal Burkard, atmosfera de Boston, MA.



Basidiósporo *Ganoderma* (magnificação 1000X, tamanho aproximado – 6 μm .) Amostrador de ar Personal Burkard, atmosfera de Boston, MA.



Ascósporo incolor ao centro (magnificação 1000X, tamanho aproximado – 2,5 μm). Amostrador de ar Personal Burkard, atmosfera de Boston, MA.



Ascósporo *Leptosphaeria*-like (magnificação 1000X, tamanho aproximado – 17 μm). Amostrador de ar Personal Burkard, atmosfera de Boston, MA.



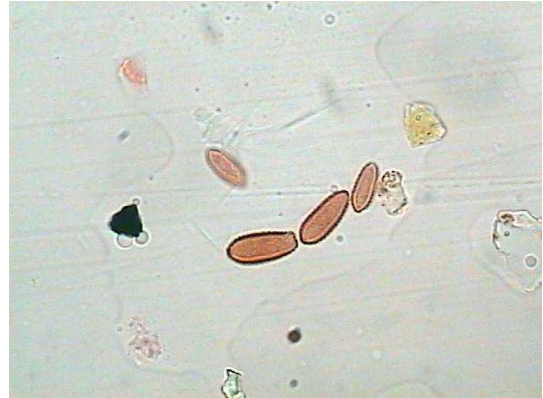
Dois ascósporos da família *Xylariaceae* (magnificação 1000X, tamanho aproximado – 12 μm). Amostrador de ar Personal Burkard, atmosfera de Boston, MA.



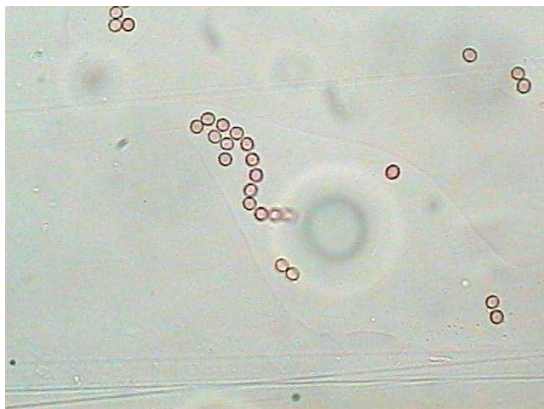
Ascósporo *Venturia*-like (magnificação 1000X, tamanho aproximado – 6 μm). Amostrador de ar Personal Burkard, atmosfera de Boston, MA.



Deuteromiceto *Alternaria* sp (magnificação 1000X, tamanho aproximado – 20 μ m). Amostrador de ar Personal Burkard, atmosfera de Boston, MA.



Grupo de 3 esporos centralizados do Deuteromiceto *Cladosporium* sp (magnificação 1000X, tamanho aproximado – 12 μ m). Amostrador de ar Personal Burkard, atmosfera de Boston, MA.



26 esporos do grupo de Deuteromicetos *Pen/Asp* (magnificação 1000X, tamanho aproximado – 1,5 μ m). Amostrador de ar Personal Burkard, atmosfera de Boston, MA.



2 esporos do grupo de *Curvularia* sp ao lado de um *Cladosporium* sp (magnificação 1000X, tamanho aproximado – 17 μ m). Amostrador de ar Personal Burkard, atmosfera de Boston, MA.



Grupo de quatro "smuts"(magnificação 1000X, tamanho aproximado – 6 μm). Amostrador de ar Personal Burkard, atmosfera de Boston, MA.



Mixomiceto (magnificação 1000X, tamanho aproximado – 9 μm). Amostrador de ar Personal Burkard, atmosfera de Boston, MA.



Esporo não identificado (magnificação 1000X, tamanho aproximado – 3 μm). Amostrador de ar Personal Burkard, atmosfera de Boston, MA.



Visão geral de uma lâmina (magnificação 1000X). Amostrador de ar Personal Burkard, atmosfera de Boston, MA.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)