

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO



Dissertação

**BIOMONITORAMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
NÍVEIS DE ACETILCOLINESTERASE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE
ANIMAIS EXPOSTOS À POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA DA CIDADE DE
PELOTAS – RS**

Roberta Foerstnow Szczepaniak

Pelotas, 2014

ROBERTA FOERSTNOW SZCZEPANIAK

**BIOMONITORAMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
NÍVEIS DE ACETILCOLINESTERASE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE
ANIMAIS EXPOSTOS À POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA DA CIDADE DE
PELOTAS – RS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientadora: Giovana Duzzo Gamaro

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S111b Szczepaniak, Roberta Foerstnow

Biomonitoramento e avaliação da atividade antioxidante e níveis de acetilcolinesterase no sistema nervoso central de animais expostos à poluição atmosférica da cidade de pelotas - rs / Roberta Foerstnow Szczepaniak ; Giovana Duzzo Gamaro, orientadora. — Pelotas, 2014.

82 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Poluição atmosférica. 2. Biomonitoramento. 3. Acetilcolinesterase. 4. Estresse oxidativo. 5. Mp2.5. no2. I. Gamaro, Giovana Duzzo, orient. II. Título.

CDD : 574.5

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado intitulada Biomonitoramento e avaliação da atividade antioxidante e níveis de acetilcolinesterase no sistema nervoso central de animais expostos à poluição atmosférica da cidade de Pelotas – RS, de autoria de Roberta Foerstnow Szczepaniak.

Comissão examinadora:

Prof.^a Dra. Giovana Duzzo Gamaro - Orientadora – Universidade Federal de Pelotas

Dra. Rachel Krolow - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof.^a Dra. Márcia Foster Mesko - Universidade Federal de Pelotas

Pelotas, 2014

Agradecimentos

À Deus primeiramente, por mais esta etapa vencida.

À minha família e amigos pelo apoio e estímulo. Ao meu namorado Diego por ter me ajudado a superar as dificuldades que surgiram.

À UFPel e ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção pela oportunidade de realizar o mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

À Prof.^a Dra. Giovana Duzzo Gamaro pela oportunidade e confiança.

Aos estagiários (ICs) Bruno Bainy, Carina Bork, Fabiano Soares e Gustavo Colares o meu reconhecimento pelo empenho, comprometimento e incentivo em todos os momentos.

À mestranda e amiga Pamela Vitória Salermo pelo apoio e por todos os momentos que compartilhamos juntas.

À Lusiene pela sua preciosa amizade e todo apoio.

Ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos e a Prof.^a Dra. Elizabete Helbig juntamente com a técnica Renata Ramirez do laboratório de Nutrição experimental pela colaboração e atenção despendida neste trabalho.

Ao Laboratório de Estresse Oxidativo e Poluição Atmosférica da UFSCPA, Prof.^a Dra. Claudia Rhoden, Mauricio Moresco e Alan Fleck pela disponibilidade e comprometimento no desenvolvimento do trabalho.

Ao Departamento de Bioquímica, Laboratório 37 da UFRGS, Prof.^a Dra. Carla Dalmaz pelo profissionalismo e carinho com que me receberam.

À Raquel e Danusa pela ajuda prestada para a realização de parte dos métodos de detecção de estresse oxidativo e pelos ensinamentos.

Às pessoas que cederam suas casas para realizar monitoramento Maria dos Anjos, Carla, Thiago Reis, Najara, Fabiano Soares, Tania Zanetti, Ricardo e Telma.

À Prof.^a Dra. Rosélia Spanevello pela ajuda com a Acetilcolinaesterase.

À jornalista do Diário Popular Michele Ferreira pelo seu interesse pela nossa pesquisa e honra de nosso trabalho ser capa do jornal da cidade.

À Turma da veterinária (2013) M3-M4 pelo apoio e incentivo na minha docência orientada.

À Caroline Machado pelo auxílio com acetilcolinaesterase e Jéssica Pureza pela ajuda prestada.

Aos componentes da banca examinadora, por sua cordialidade e contribuições favorecendo o enriquecimento desta pesquisa.

"Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo
começo, qualquer um pode começar agora e fazer um
novo fim."

Chico Xavier

Resumo

SZCZEPANIAK, Roberta Foerstnow. **BIOMONITORAMENTO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E NÍVEIS DE ACETILCOLINESTERASE NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE ANIMAIS EXPOSTOS À POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA DA CIDADE DE PELOTAS – RS.** 2014. 82f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Na cidade de Pelotas, localizada ao sul do Brasil, o crescimento econômico das últimas décadas (aumento da produção industrial e crescimento da frota de veículos) gerou uma série de impactos sobre a saúde humana e meio ambiente. Algumas substâncias particuladas presentes na atmosfera podem ser responsáveis pelo aumento do estresse oxidativo e quadros inflamatórios em alguns órgãos alvo. O presente estudo teve como objetivo monitorar durante as estações do ano, os níveis ambientais de dióxido de nitrogênio (NO_2) e material particulado ($\text{MP}_{2.5}$) em 8 pontos da cidade de Pelotas distribuídos de acordo com sua localização: parte sul da cidade, região leste, zona central da cidade, região oeste, no sudoeste, na zona norte, no sudeste e na região nordeste, bem como estudar as alterações bioquímicas em ratos expostos a poluição atmosférica. A amostragem do NO_2 foi realizada utilizando o princípio da difusão do NO_2 atmosférico em filtros de celulose impregnados com uma solução absorvente. O equipamento “DustTrak” foi utilizado para análise do material particulado $2,5 \mu\text{m}$. A média percentual em todas as estações de $\text{MP}_{2.5}$ de 8 pontos analisados 6 ultrapassaram os limites preconizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) ($25 \mu\text{g}/\text{m}^3$). O ponto ao sul ultrapassou 95%, ponto ao leste 25.16%, zona central da cidade 58.24%, ponto oeste excedeu 21.12%, ponto sudeste ultrapassou 19.16% região norte 25.6%. Os pontos localizados na região sudoeste e nordeste não ultrapassaram os limites da OMS. Em relação ao monitoramento ambiental do NO_2 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) a média percentual dos pontos não ultrapassaram os valores preconizados pela OMS ($40 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Com intuito de verificar o efeito da exposição aguda ao material particulado em nível ambiental nas estações do inverno e verão foram utilizados ratos Wistar machos adultos, por períodos de 20 horas (4h/dia) durante 5 dias. Este procedimento foi realizado em dois locais distintos em relação à dispersão e concentração de poluentes. Foram analisados os níveis de acetilcolinesterase (AChE) e atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase, a produção de tióis e radicais livres por meio do ensaio do diclorofluoresceína em 3 estruturas do sistema nervoso central: córtex pré-frontal, hipotálamo e hipocampo. Os níveis de AChE no inverno foram maiores no córtex e no hipotálamo corroborando aos altos níveis de $\text{MP}_{2.5}$ em ambos os locais. Em relação ao Estresse Oxidativo podemos sugerir uma adaptação em relação aos níveis das enzimas antioxidantes uma vez que observamos no inverno e verão produção de tióis. O efeito da exposição à poluição atmosférica na cidade de Pelotas sofre influência do local avaliado bem como a estação do ano.

Palavras-chaves: Poluição atmosférica. Biomonitoramento. Acetilcolinesterase. Estresse oxidativo. $\text{MP}_{2.5}$. NO_2

Abstract

SZCZEPANIAK, Roberta Foerstnow. **BIO-MONITORING AND ASSESSMENT OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY AND ACETYLCHOLINESTERASE LEVELS IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF ANIMALS EXPOSED TO ATMOSPHERIC POLLUTION IN THE CITY OF PELOTAS – RS.** 2014. 82f
Dissertation (Master's) – Post Graduation Program in Biochemistry and Bioprospection. University Federal of Pelotas, Pelotas.

Pelotas, located in southern Brazil, the economic growth in the last decades (increase of industrial production and vehicle fleet) brought a series of impacts on the human health and environment. Some substances in particles found in the atmosphere may be responsible for the increase of the oxidative stress and inflammatory conditions in some target organs. The present study aimed to monitor the environmental levels of nitrogen dioxide (NO_2) during the seasons and material in particles ($\text{PM}_{2.5}$) in 8 locations in the city of Pelotas distributed according to location: southern part, east region, central zone, western, in the southwest, in the north, in southeast and northeast, as well as studying the biochemical changes in rats exposed to air pollution. The NO_2 sample was performed using the atmospheric NO_2 diffusion principle in cellulose filters impregnated with a specific absorbent solution for reaction with this gas. The equipment "DustTrak" was used for analysis of the material in particles $2.5\ \mu\text{m}$. The average percentage in all stations $\text{PM}_{2.5}$ the 8 points analyzed 6 points exceeded the limits recommended by the World Health Organization (WHO) ($25\ \text{mg}/\text{m}^3$). The south point exceeded 95%, point to the east 25.16%, the central zone 58.24%, point west 12.21% exceeded, southeast point exceeded 19.16% and northern 25.6%. Site located in the southwest and northeast region did not exceed the limits of WHO. Regarding the environmental monitoring of NO_2 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) the average percentage of points did not exceed the values recommended by WHO ($40\ \mu\text{g}/\text{m}^3$). In order to verify the effect of acute exposure to particulate matter in environmental levels in the winter and summer seasons Wistar adult male rats for periods of 20 hours (4h/day) during 5 days. This procedure was done in two separate locations relative to the dispersion and concentration of pollutants. The analysis of the levels of acetylcholinesterase (AChE) and antioxidant enzymes catalase, dismutase and glutathione peroxidase, superoxide production of thiols and free radicals through the dichlorofluorescein assay in 3 structures of the central nervous system were analyzed: prefrontal cortex, hypothalamus and hippocampus. The levels of AChE were greater in winter of the cortex and the hypothalamus corroborating the high levels of $\text{PM}_{2.5}$ in both local. Concerning oxidative stress can suggest an adaptation from the levels of antioxidant enzymes since we observed in winter and summer production of thiols. The effect of exposure to air pollution in Pelotas influenced local and as well as on the season.

Keywords: Atmospheric pollution. Bio-monitoring. Acetylcholinesterase. Oxidative stress. $\text{PM}_{2.5}$. NO_2

Lista de Figuras

Figura 1: Classificação aerodinâmica do material particulado	20
Figura 2: Camadas da atmosfera.....	22
Figura 3: Fenômeno da inversão térmica.....	23

Lista de Tabelas

Tabela 1. Índice da Qualidade do ar.....	17
---	----

Lista de abreviaturas e siglas

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterase
CAT	Catalase
CETESB	Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
CO	Monóxido de carbono
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CLE	Camada Limite Estável
CLP	Camada Limite Planetária
DCF	Diclorofluoresceína
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FMC	Fumaça
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GPx	Glutathione peroxidase
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
IL	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
MP	Material Particulado
MP ₁₀	Material Particulado Grosso entre 2,5 e 10µm
MP _{2,5}	Material Particulado Fino menor que 2,5µm
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase
NOx	Óxidos de nitrogênio
NO	Óxido nítrico
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
O ₃	Ozônio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PTS	Partículas Totais em Suspensão
PVN	Núcleo Paraventricular
SNC	Sistema Nervoso Central
SO ₂	Dióxido de enxofre
SOD	Superóxido dismutase

Sumário

RESUMO	
ABSTRACT	
LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELA	
LISTA DE ABREVIATURA	
SUMÁRIO	
1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
3.1 PADRÕES DE QUALIDADE DO AR.....	16
3.2 FONTES DE POLUIÇÃO DO AR.....	17
3.3 PRINCIPAIS POLUENTES ATMOSFÉRICOS.....	18
3.3.1 Óxidos de Carbono.....	18
3.3.2 Ozônio.....	18
3.3.3 Compostos de Enxofre.....	19
3.3.4 Óxidos de Nitrogênio.....	19
3.3.5 Partículas Inaláveis.....	20
3.4 INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES METEOROLÓGICAS SOBRE A POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA.....	21
3.5 EFEITOS DA POLUIÇÃO SOBRE SAÚDE HUMANA.....	24
3.5.1 Efeitos da poluição sobre o sistema cardio-respiratório.....	25
3.5.2 Efeitos da poluição sobre o sistema nervoso central (SNC).....	27
4. Manuscritos.....	30
4.1 Evaluation of weather conditions as well as NO ₂ and PM _{2.5} levels in the urban areas of South Brazil in different seasons.....	30
4.2 Effects of acute exposure to MP _{2.5} in the acetylcholinesterase levels and biochemical parameters in the central nervous system in southern Brazil.....	50
5. CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
ANEXO 1. Comprovante da submissão do artigo.....	82

1 INTRODUÇÃO

A poluição atmosférica é um problema ambiental e de saúde pública. Desde a Revolução Industrial o aumento de poluentes na atmosfera tem causado danos à saúde da população, aos ecossistemas e ao patrimônio da sociedade (KARNAE e JOHN, 2011; CETESB, 2007).

Pelotas é um município da região sul do estado do Rio Grande do Sul. Está localizada (31° 46' 34" Sul, 52° 21' 34" Oeste) em uma planície costeira, a área urbana do município situa-se em baixa altitude, em média, 7 metros acima do nível do mar. A cidade encontra-se a menos de 50 km do Oceano Atlântico, o que define a regularidade dos ventos e a alta umidade do ar durante o ano todo. O clima subtropical é controlado, principalmente, pela atuação das massas polar e tropical atlântica, com verões quentes e invernos relativamente frios, com geadas frequentes, como indica a Estação Agroclimatológica de Pelotas situada no Campus da Universidade Federal de Pelotas. A passagem das frentes frias polares pode ocasionar bruscas mudanças no tempo em qualquer estação do ano. O município de Pelotas está posicionado às margens do Canal São Gonçalo, que liga as Lagoas dos Patos e Mirim, as maiores bacias do Brasil. Esta localização tem importantes reflexos sobre os aspectos físicos e econômicos do município. Distante a 250 km de Porto Alegre, capital do estado, Pelotas possui 328.000 habitantes sendo considerada a terceira cidade mais populosa do estado (IBGE, 2013). Nas últimas décadas houve um crescimento econômico da região traduzido pelo aumento da produção industrial e pelo crescimento da frota de veículos determinando elevada concentração de poluentes na atmosfera no qual representam um risco direto para a saúde da população (IONOV e POBEROVSKII, 2012). Destacando a necessidade de monitoramento constante, intensificação de ações públicas e controle das fontes emissoras. Apesar do grande número de estudos em diversas cidades, nenhum estudo sobre a qualidade do ar foi encontrado na literatura para a cidade de Pelotas.

Em grandes cidades, a emissão veicular é a principal responsável pela difusão de óxidos de nitrogênio. O dióxido de nitrogênio (NO₂) é um poluente primário que se origina durante os processos de combustão, tendo como principais fontes as industriais e a combustão veicular (CETESB, 2007; DONNELLY et al., 2012).

O material particulado é um poluente atmosférico constituído por uma mistura de partículas que podem ser sólidas, líquidas ou ambas, suspensas no ar, constituídas por vários elementos químicos, como por exemplo, metais e compostos de carbono. Estes elementos são geralmente associados à poluição urbana tendo como principais fontes emissoras os veículos automotores e as indústrias. O tamanho das partículas está diretamente relacionado ao seu potencial para causar problemas de saúde. As partículas são classificadas de acordo com o tamanho em: grossas (entre 2.5 e 10 μm) representando a massa de partículas inaláveis, ou seja, pequenas o suficiente para penetrar no sistema respiratório, as finas (diâmetro inferior a 2.5 μm , $\text{MP}_{2.5}$) e as ultrafinas (diâmetro inferior a 0.1 μm ou 100 nm). As partículas finas possuem maior probabilidade de deposição nas vias aéreas condutoras mais finas e nos alvéolos pulmonares, podendo estar relacionadas ao desenvolvimento de doenças respiratórias e cardiovasculares. (KELLY e FUSSELL, 2012; KAMPA e CASTANAS, 2008; BERGAMASCHI et al., 2007).

Estudos epidemiológicos determinaram um aumento de morbidade e mortalidade associadas às doenças cardiovasculares em populações expostas ao material particulado menor ou igual a $\text{MP}_{2.5}$. Consequentemente, o aumento no número de internações hospitalares em períodos de maior nível de poluentes (DEMETRIOU et al., 2012; POPE et al., 2009; CANÇADO et al., 2006). No entanto, o mecanismo fisiopatológico que comanda a relação entre a exposição às fontes poluidoras e o aumento de mortes por doenças cardiovasculares não está completamente estabelecido. O estresse oxidativo desempenha um papel fundamental neste processo no qual substâncias reativas, produzidas durante o metabolismo que fisiologicamente são neutralizadas por reações do sistema antioxidante, como o dióxido de nitrogênio (NO_2) e o ozônio (O_3), com capacidade de induzir a formação de espécies reativas de oxigênio. Assim, a poluição atmosférica determina um estresse oxidativo os quais atuam em diferentes alvos biológicos como proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (ARCEGO et al., 2013; SIMKHOVICH et al., 2011; ZANCHI et al., 2010).

Processos oxidativos são igualmente associados aos impactos de poluentes atmosféricos sobre os sistemas respiratório e cardiovascular. Estes danos oxidativos e inflamatórios têm sido estabelecidos como mecanismos básicos através dos quais a poluição atmosférica causa alterações ao sistema nervoso central (ZELIKOFF et al., 2002; BLOCK et al., 2007; MILLS et al., 2009).

O sistema nervoso central (SNC) é extremamente suscetível ao estresse oxidativo, o qual compreende o desequilíbrio entre a elevada concentração de oxidantes em relação à baixa quantidade de antioxidantes com produção de dano celular (HALLIWELL, 1994; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Poluentes atmosféricos podem atingir áreas mais profundas do encéfalo e provocar danos irreparáveis em estruturas importantes como o córtex e hipocampo (ZANCHI et al., 2010). Em consequência de alterações neuroquímicas no SNC, a exposição aos poluentes pode ser associada com funções cognitivas e comportamentais, como aprendizagem e memória, onde a acetilcolinesterase (AChE) desempenha um papel importante no SNC. A AChE é uma enzima pertencente à família das colinesterases, responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos nas sinapses colinérgicas e também pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh) (JAQUES et al., 2011; ANWAR et al., 2012). Além disso, é um marcador biológico da ação de compostos neurotóxicos para o organismo (OLIVEIRA et al., 2007). Na literatura existem poucos estudos epidemiológicos e experimentais no qual correlacionam sistema nervoso central, estresse oxidativo e acetilcolinesterase com poluição atmosférica.

A poluição do ar tem sido associada a diversos efeitos sobre a saúde humana, dentre eles, o crescimento das taxas de internações e de atendimentos de emergência, o aumento de problemas respiratórios crônicos, como por exemplo, a asma, e a diminuição da função pulmonar, incluindo um aumento no risco de mortalidade. Dados epidemiológicos recentes sugerem que fatores meteorológicos como temperatura, umidade, precipitação e pressão atmosférica influenciam a qualidade do ar (CHEN et al., 2012; DEMETRIOU et al., 2012; DELFINO et al., 2011; CANÇADO et al., 2006). A dispersão de poluentes como NO_2 e $\text{MP}_{2.5}$ é dependente da sazonalidade e de fatores meteorológicos. Desta forma, as diferentes estações do ano como, por exemplo, inverno e verão possuem características distintas e por esse motivo, podem acarretar em alterações biológicas distintas (BIERMANN et al., 2009).

Neste contexto, justifica-se a importância de investigar-se a poluição atmosférica e seus efeitos na exposição aguda aos poluentes na cidade de Pelotas, uma vez que nesta região existem poucos estudos relacionados ao monitoramento ambiental de poluentes, bem como estudos biológicos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Monitorar os níveis ambientais de dióxido de nitrogênio e material particulado MP_{2.5} na cidade de Pelotas em 8 pontos distintos, bem como avaliar as alterações bioquímicas e níveis de acetilcolinesterase em animais expostos ao MP em nível ambiental no inverno e verão.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar monitoramento ambiental dos níveis de dióxido de nitrogênio e material particulado 2,5 µm na cidade de Pelotas nas quatro estações do ano 2012;
- Determinar os níveis de acetilcolinesterase em diferentes estruturas do sistema nervoso central: hipocampo, hipotálamo e córtex;
- Avaliar a atividade das enzimas antioxidantes catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase em diferentes estruturas do sistema nervoso: hipocampo, hipotálamo e córtex;
- Verificar se a exposição ao MP, a nível ambiental, causa estresse oxidativo por meio do ensaio do diclorofluoresceína (DCF);
- Determinar os efeitos da exposição à poluição sobre produção de tióis.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PADRÕES DE QUALIDADE DO AR

A qualidade do ar é determinada pela presença de baixos níveis de poluentes na atmosfera. Desta forma, torna-se importante a regulamentação e o controle das emissões de poluentes referentes às indústrias, bem como outras fontes emissoras. Estudos epidemiológicos demonstram um crescimento de internações hospitalares associadas aos efeitos tóxicos dos agentes poluidores presentes na atmosfera. A partir de tal contestação foram criados os padrões de exposição humana aos poluentes (SALDIVA et al., 1994; CETESB, 2007; CANÇADO et al., 2006; DEMETRIOU et al., 2012).

A Tabela 1 apresenta padrões de qualidade do ar legalmente estabelecidos pelo CONAMA, resolução nº 003/1990, para os seguintes poluentes: partículas totais em suspensão (PTS), fumaça (FMC), partículas inaláveis (MP_{10}), dióxido de enxofre (SO_2), monóxido de carbono (CO), ozônio (O_3) e dióxido de nitrogênio (NO_2). De acordo com a Resolução CONAMA n.º 003/1990, são considerados padrões de qualidade do ar as concentrações de poluentes atmosféricos que, se ultrapassadas, poderão interferir na saúde, na segurança e no bem-estar da população, bem como ocasionar danos à flora e à fauna, aos materiais e ao meio ambiente em geral.

O índice de qualidade do ar é um indicador padronizado do nível de poluição do ar, sendo que a qualidade boa deve apresentar pouco ou nenhum risco à saúde e a péssima apresenta sérios riscos de manifestações de doenças respiratórias e cardiovasculares. A legislação brasileira que estipula os padrões de qualidade do ar nacionais encontra-se defasada em relação aos demais países. Datada da década de 90, a Resolução CONAMA N° 003/1990 que define os padrões de qualidade do ar nacionais (DELFINO et al., 2011; CETESB, 2007).

Tabela 1 Índice da Qualidade do ar

Classificação e Faixa do Índice	PTS Média 24h $\mu\text{m}/\text{m}^3$	PM10 Média 24h $\mu\text{m}/\text{m}^3$	SO ₂ Média 24h $\mu\text{m}/\text{m}^3$	NO ₂ Média 1h $\mu\text{m}/\text{m}^3$	O ₃ Média 1h $\mu\text{m}/\text{m}^3$	CO Média 8h $\mu\text{m}/\text{m}^3$
Bom	0-80	0-50	0-80	0-100	0-80	0-4500
Regular	81-240*	51-150*	81-365*	101-320*	81-160*	4501-9000*
Inadequada	241-375	151-250	365-800	321-1130	161-200	9001-15000
Má	376-625	251-420	801-1600	1131-2260	201-800	15001-30000
Péssima	626-875	421-500	1601-2100	2261-3000	801-1000	30001-40000
Crítica	876-1000	501-600	2101-2620	3001-3750	1001-1200	40001-50000

Fonte: CONAMA 03/1990

A legislação brasileira não estipula padrões de qualidade do ar para material particulado fino (MP_{2.5}). Entretanto, a Organização Mundial da Saúde recomenda o padrão de qualidade do ar para MP_{2.5} com base nos efeitos à saúde conhecidos, tanto de curto quanto de longo prazo (WHO, 2006). Além disso, muitos países têm inserido o parâmetro MP_{2.5} como padrão de qualidade do ar em suas legislações ambientais, tais como Estados Unidos, países da União Européia, Canadá, México, dentre outros (LEE, 2010).

3.2 FONTES DE POLUIÇÃO DO AR

As fontes emissoras de poluentes atmosféricos são classificadas em estacionárias ou móveis. As principais fontes estacionárias estão ligadas a processos de combustão decorrentes da produção industrial, de usinas termoeletricas ou da queima de resíduos sólidos, em serviços urbanos de tratamento de resíduos. Quanto às fontes móveis, são representadas, principalmente, pelos veículos automotores. A magnitude do lançamento dessas emissões, seu transporte e diluição na atmosfera, determinam o estado atual da qualidade do ar atmosférico (CANÇADO et al., 2006).

Os poluentes são classificados em primários ou secundários. Os primários são aqueles lançados diretamente pelas indústrias, veículos ou operações de queima de combustíveis fósseis como o monóxido de carbono, o dióxido de enxofre, óxidos de nitrogênio (NO_x) entre outros. Os secundários são aqueles poluentes provenientes dos primários, formados na atmosfera, constituindo novos poluentes como, por exemplo, o ácido sulfúrico (H₂SO₄) e o ozônio (O₃).

Os poluentes após sua emissão na atmosfera são submetidos a processos complexos de transporte, mistura e transformação química, que originam em uma distribuição variável das suas concentrações na atmosfera. Na maioria das vezes, as distribuições das concentrações de poluentes na atmosfera dependem das condições de emissão e das condições meteorológicas, podendo alguns poluentes ser transportados a grandes distâncias antes de atingirem o nível do solo (SANTOS et al., 2009).

A concentração dos contaminantes reduz-se à proporção em que são dispersos na atmosfera, o que depende de fatores climatológicos, como a temperatura, a velocidade do vento, o movimento de sistemas de alta e baixa pressão e a interação destes com a topografia local, como montanhas e vales, por exemplo (CETESB, 2007; SCHIRMER e LISBOA, 2008).

3.3 PRINCIPAIS POLUENTES ATMOSFÉRICOS

Em relação à diversidade de poluentes atmosféricos, os órgãos governamentais que controlam a poluição atmosférica em diversos países listam os poluentes que se apresentam com maior frequência, causando efeitos adversos tanto para o meio ambiente como para a população, que contribui para o controle dos mesmos. Para tanto, de acordo com a CETESB (2007), apresenta-se os principais poluentes e uma sucinta explicação acerca de seus efeitos.

3.3.1 Óxidos de carbono: Os óxidos de carbono (monóxido de carbono – CO e dióxido de carbono – CO₂) são emitidos diariamente à atmosfera, sendo oriundos de processos naturais (fogos florestais, atividade vulcânica) e antropogênicos (queima de combustíveis fósseis). O CO é um poluente que apresenta grande toxicidade ao ser humano, sendo um gás incolor, inodoro e sem sabor.

3.3.2 Ozônio: A formação do ozônio (O₃) está diretamente relacionada com a emissão de poluentes, tais como óxidos de nitrogênio, compostos orgânicos voláteis (material particulado pequeno) e monóxido de carbono. Desse modo, o O₃ é classificado como um poluente secundário. Depois de formado na atmosfera, o O₃ tem uma meia-vida de dias a semanas, podendo ser transportado por longas distâncias. É o mais persistente poluente do ar urbano e é o principal

responsável pela formação da névoa fotoquímica urbana mais conhecida como *smog*.

3.3.3 Compostos de enxofre: Embora fontes naturais como às erupções vulcânicas possam colaborar em determinadas regiões para a formação dos níveis ambientais atuais de gases sulfurosos, nas áreas urbanas o motivo de preocupação volta-se para as contribuições antropogênicas. Entre as principais, destacam-se as que utilizam combustíveis fósseis ricos em enxofre (carvão mineral e óleo diesel), geração de energia elétrica e em veículos motorizados. O enxofre libertado na queima de combustíveis combina com o oxigênio do ar e dá origem ao SO_2 (dióxido de enxofre) que, após oxidação, pode ser transformado em trióxido de enxofre. Na presença da umidade do ar o composto dá origem ao ácido sulfúrico e respectivos sais, contribuindo para a formação de chuvas ácidas, responsáveis pela acidificação das águas e dos solos.

3.3.4 Óxidos de nitrogênio: Os óxidos de nitrogênio são formados durante as combustões do nitrogênio do ar, o que torna seu controle mais difícil. Esses óxidos provocam irritações nos olhos e mucosas em geral, além de enfisema pulmonar (CHEN et al., 2012).

As maiores fontes de dióxido de nitrogênio (NO_2) são resultantes da ação antropogênica, principalmente dos processos de combustão por fontes estacionárias (usinas de energia) e em fontes móveis (veículos automotores). O NO_2 é um poluente atmosférico gasoso que em altas concentrações representa um risco para a saúde humana. Dessa forma, a exposição à alta concentração de NO_2 reduz a imunidade, causa infecções no trato respiratório como a laringite, bronquite e pneumonia (RAJARATHNAM et al., 2011). Estudos recentes realizados em várias cidades na Europa (CHIUSOLO et al., 2011; SAMOLI et al., 2006) e no Canadá (BURNETT et al., 2004) comprovam a associação de curto prazo entre NO_2 e aumento do risco de mortalidade. Berger et al. (2006) e Dockery et al. (2005) também confirmaram associação de NO_2 com o aumento do risco de taquicardia supraventricular em homens com doença cardíaca coronária. O NO_2 quando inalado, atinge as porções mais periféricas do pulmão devido a sua baixa solubilidade em água, dando origem as nitrosaminas, que podem ser carcinogênicas. Cançado et al. (2006) relacionam seu efeito tóxico ao fato de ser um agente oxidante e irritante das mucosas, principalmente em crianças.

3.3.5 Partículas inaláveis: Também denominadas de material particulado (MP) são pequenas partículas suspensas no ar, que podem causar efeitos negativos na saúde da população. As partículas inaláveis são classificadas de acordo com o diâmetro em finas ($2,5\ \mu\text{m}$), ultrafinas ($0,1\ \mu\text{m}$) e grossas ($2,5\ \mu\text{m}$ a $10\ \mu\text{m}$).

Nos últimos anos, órgãos governamentais de muitos países têm monitorado os materiais particulados. As principais fontes de emissão do MP são a fumaça, poeiras e a queima de combustíveis fósseis, provenientes da combustão dos veículos automotores e indústrias (LÓPEZ et al., 2011; KELLY e FUSSELL, 2012). A Figura 1 relaciona os diferentes tipos e tamanhos de material particulado.

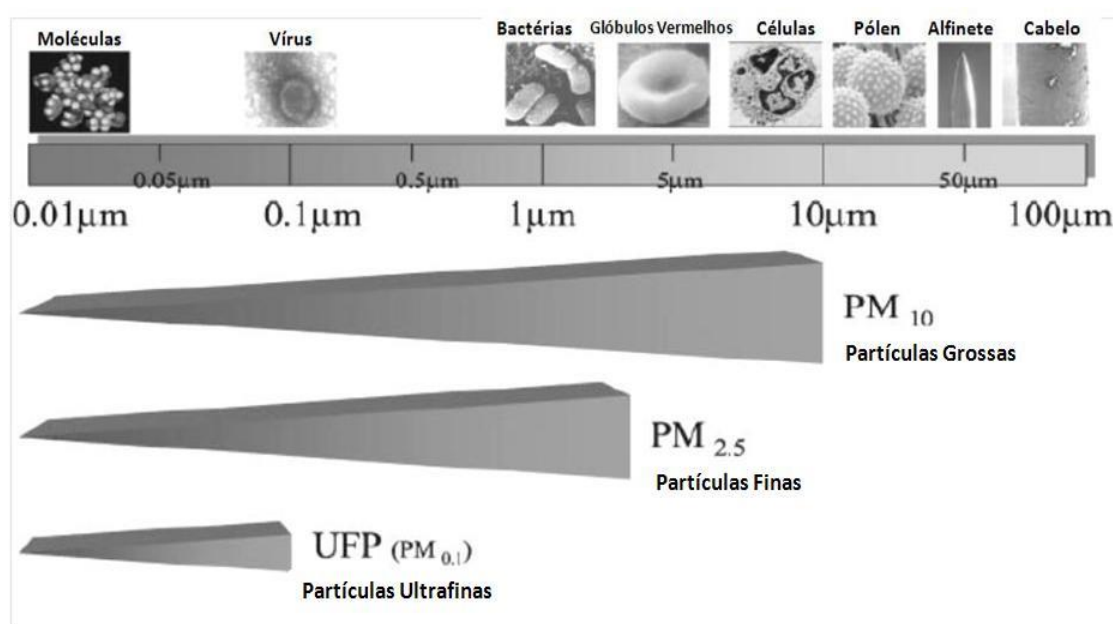


Figura 1. Classificação aerodinâmica do material particulado adaptado de BROOK et al., 2004.

A toxicidade das partículas está associada não só com a massa de partículas, mas também com variações no tamanho, na forma e composição química. Além disso, as espécies químicas ocorrem nas frações de tamanho, muito finas, que podem atingir as regiões alveolares dos pulmões e agravar problemas respiratórios. Os elementos químicos derivados de fontes antropogênicas geralmente estão presentes na fração fina ($< 2,5\ \mu\text{m}$), enquanto os derivados de fontes naturais estão geralmente presentes na fração grosseira ($> 10\ \mu\text{m}$) (KARNAE e JOHN, 2011).

A legislação ambiental em vigor no Brasil (CONAMA N° 003/1990) determina os parâmetros de qualidade do ar que devem ser monitorados, apresentando padrões de qualidade do ar para MP_{10} (material particulado de

diâmetro aerodinâmico inferior a $10\mu\text{m}$) e PTS (partículas totais em suspensão), mas não apresenta padrão para $\text{MP}_{2,5}$. Entretanto, a Organização Mundial da Saúde indica o padrão de qualidade do ar para $\text{MP}_{2,5}$ com base nos efeitos à saúde conhecidos tanto de curto e longo prazo (WHO, 2006).

3.4 INFLUÊNCIA DAS CONDIÇÕES METEOROLÓGICAS SOBRE A POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA

A dispersão de poluentes na atmosfera sofre influência das diferentes condições meteorológicas como as chuvas, o vento e a umidade relativa do ar (SCHIRMER e LISBOA, 2008; GONZALES et al., 2012). Outro fator importante de interferência na concentração de poluentes na atmosfera está relacionado às diferentes fontes emissoras, como as vias de tráfego, indústrias de diversos seguimentos, portos, aeroportos, emissões residenciais e comerciais etc. (SCHIRMER e LISBOA, 2008; GONZALES et al., 2012).

A atmosfera é uma camada de gases que envolve a terra e dividida em quatro camadas: troposfera, estratosfera, mesosfera, termosfera (Figura 2). A troposfera é a camada atmosférica mais próxima à superfície terrestre e é nela que encontra-se uma mistura de gases constituída por: nitrogênio (78,08%), oxigênio (20,95%), argônio (0,93%), dióxido de carbono (0,035%) e outros gases. O dióxido de carbono e o vapor de água, dependendo da localização e estação do ano, possuem concentrações variáveis (OGA et al., 2008). A parte inferior da troposfera, também denominada de camada limite planetária (CLP), é onde se concentram a maior parte dos poluentes emitidos por diversas fontes emissoras terrestres (MOREIRA e TIRABASSI, 2004). Essa camada possui um comportamento determinante nos processos de dispersão de poluentes.

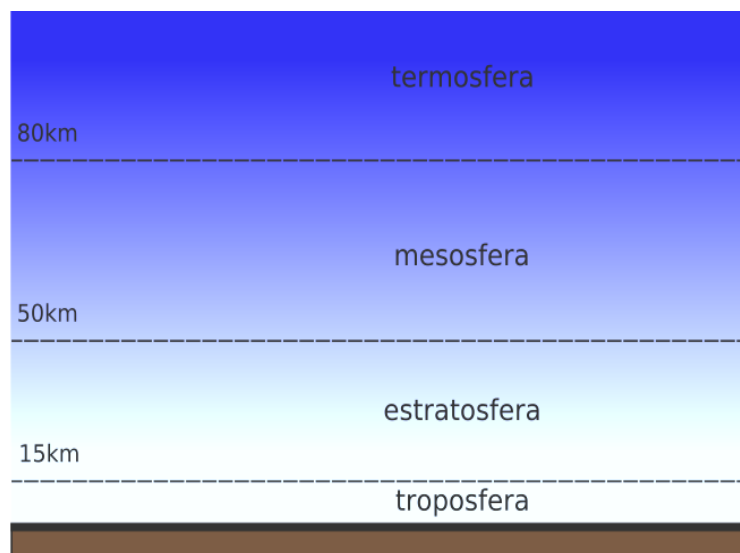


Figura 2. Camadas da atmosfera adaptado de BAIRD, 2002.

O aquecimento da superfície terrestre pelo sol gera um fluxo de calor transportado por meio de correntes termais que sofre a influência de fatores meteorológicos como, por exemplo, a umidade, a temperatura, os ventos e, até mesmo, as concentrações de poluentes (GEHRING e BUCHMANN, 2003).

No inverno é possível evidenciar o fenômeno denominado de inversão térmica, que favorece a concentração de poluentes nas camadas mais próximas da atmosfera devido às condições meteorológicas. A inversão térmica é importante para determinar a dispersão da poluição local (SANTOS, et al., 2009). Esse fenômeno ocorre em condições em que o ar, próximo à CLP, está em constante movimento vertical por causa do processo convectivo dos ventos (correntes de convecção) (MORAES, 2010). A radiação solar aumenta a temperatura do solo aquecendo o ar que o circunda. O ar quente, menos denso que o ar frio, sobe (movimento vertical ascendente) e o ar frio, por ser mais denso, desce (movimento vertical descendente). O ar frio em contato com a superfície do solo recebe calor e fica menos denso, o que resulta em um ciclo de movimentos ascendentes de ar quente e descendentes de ar frio. Quando isso acontece, o ar quente que se deslocou para a camada superior gera um bloqueio impedindo os movimentos verticais de convecção. Assim sendo, as fumaças e os gases produzidos pelas chaminés e pelos veículos não se dispersam pelas correntes verticais. Os efeitos dessa inversão térmica estão ilustrados na Figura 3.

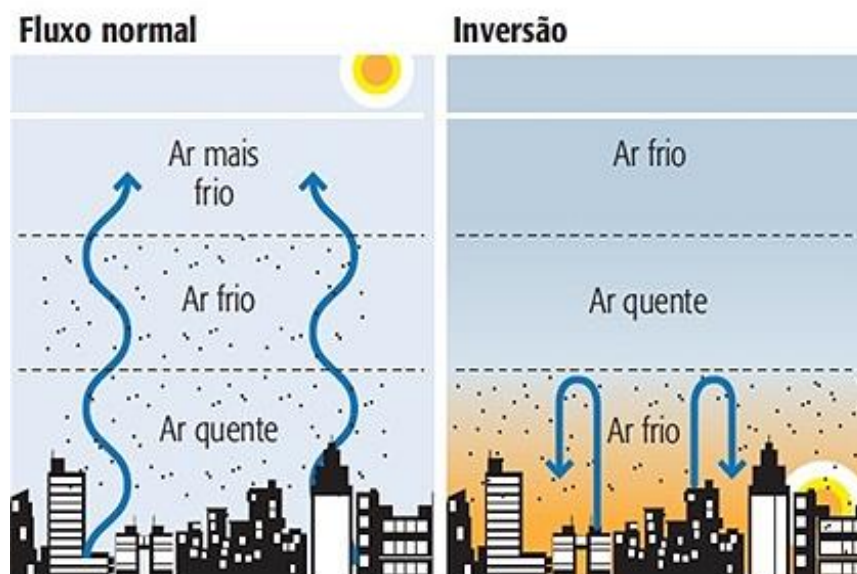


Figura 3. Fenômeno da inversão térmica adaptado de CETESB, 2007.

A qualidade do ar também sofre a influência dos ventos. A velocidade dos ventos pode interferir na concentração de poluentes. Quanto maior a velocidade dos ventos, maior será a dispersão de contaminantes numa determinada área (SANTOS et al., 2009).

A urbanização tem uma importante influência sobre o campo de vento. Sua velocidade, geralmente, diminui com o atrito produzido pela superfície, pois edifícios de uma área urbana colocam resistência ao fluxo do vento em relação à área rural. Grandes cidades com topografia complexa, com vales ou cadeias montanhosas, experimentam elevadas concentrações de contaminantes do ar. A frequência das precipitações pluviométricas é outro fator determinante na dispersão dos poluentes, porque removem material particulado e interagem com alguns poluentes, facilitando a sua deposição seca ou úmida (MOREIRA e TIRABASSI, 2004).

Zhao et al. (2009), avaliando as concentrações de material particulado fino na região urbana de Pequim (China), encontraram os menores valores no verão e os maiores no inverno. No qual atribuíram essa diferença ao aumento de emissões pelas fontes de aquecimento e o topo mais baixo da CLP durante o inverno e também ao fato de que na primavera e no verão a CLP apresenta condições mais favoráveis à dispersão dos contaminantes, em razão da CLP apresentar uma altura maior e também em função dos ventos serem mais fortes e a precipitação mais abundante durante esse período.

A forma mais eficiente de dispersão de poluentes na atmosfera é através do transporte pelos ventos. Entre os processos de remoção de contaminantes da atmosfera, destacam-se os mecanismos de deposição seca e úmida. O primeiro se refere à ação gravitacional sobre as partículas dos contaminantes, que, de forma contínua, as atraem em direção à superfície. O segundo mecanismo está relacionado com a captura das partículas na formação de nuvens e na precipitação, e é a principal forma de remoção, embora esporádica (WALLACE e HOBBS, 2006).

3.5 EFEITOS DA POLUIÇÃO SOBRE SAÚDE HUMANA

A concentração de poluentes na atmosfera acarreta grandes prejuízos à saúde da população especialmente no inverno, pois os fenômenos de inversões térmicas são mais frequentes. Os efeitos da poluição do ar têm sido observados tanto na mortalidade quanto por causas específicas como doenças cardiovasculares, crises de asma, alergias, rinite, bronquite, irritação nos olhos e pele ressecada (POPE et al., 2009; DOCKERY et al., 2005; BROOK et al., 2004). Efeitos na morbidade também têm sido examinados e incluem aumentos nos sintomas respiratórios em crianças, redução na função pulmonar, acréscimo nos episódios de doença respiratória como asma e bronquite (SCHWARTZ, 2001; GOLDBERG et al. 2001; KAMPA e CASTANAS 2008), em especial, em grupos de indivíduos suscetíveis como o dos idosos (principalmente indivíduos de risco portadores de doenças do pulmão e do coração) e crianças (pelo metabolismo ser mais rápido, acabam inalando mais poluentes), que associados à exposição em longo prazo, pode reduzir a longevidade e aumentar o índice de mortalidade por doenças cardíacas e principalmente câncer de pulmão. Contudo, essas exposições crônicas persistem mesmo a baixas concentrações de poluentes e também à exposições agudas (BROOK et al., 2004; ANALITIS et al., 2006; CANÇADO et al., 2006; MAHESWARAN et al., 2005). Alguns poluentes presentes na atmosfera como, por exemplo, $MP_{2.5}$ podem ser responsáveis pelo aumento do estresse oxidativo e pela promoção de quadros inflamatórios em alguns órgãos alvo como no pulmão e coração (ZANCHI et al., 2010; PEREIRA et al., 2007). Conforme descrito por Gurgueira e colaboradores (2002), a exposição de ratos por 5 horas em um concentrado de partículas, causava aumento do estresse oxidativo no pulmão e no coração dos animais. Dados obtidos por Rhoden e

colaboradores (2004) corroboraram com os achados de Gurgueira e colaboradores (2002), pois demonstraram que o estresse oxidativo é um mediador importante da resposta inflamatória pulmonar induzida pela exposição ao MP.

Os poluentes atmosféricos induzem uma resposta inflamatória por instigarem a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Os radicais livres de oxigênio são substâncias nos quais o elétron não pareado está num átomo de oxigênio e são produzidos em condições normais do metabolismo. As ERO são produzidas em baixos níveis nas células dos mamíferos por vários processos metabólicos, como a atividade da NADPH oxidase, a cadeia respiratória na mitocôndria e o metabolismo oxidativo do ácido araquidônico. As ERO são espécies extremamente oxidantes, capazes de afetar a estrutura e a função de distintos componentes celulares. O balanço redox fisiológico das células é mantido pelo sistema antioxidante, que pode ser enzimático ou não enzimático (KEHRER, 2000).

O sistema antioxidante enzimático é composto por enzimas como a superóxido dismutase (SOD), que converte radical superóxido em peróxido de hidrogênio, a catalase (CAT), que promove a degradação do peróxido de hidrogênio, e a glutathione peroxidase (GPx), que fomenta a degradação de peróxidos, especialmente os derivados da oxidação dos fosfolípidos de membrana (ARCEGO et al., 2011).

Porém, em situações de desequilíbrio entre pró-oxidação e antioxição, devido a uma inadequada disponibilidade de substâncias neutralizadoras, referidas como antioxidantes. A elevação endógena de seus níveis caracteriza o processo do estresse oxidativo, no qual os lipídios, tanto em membranas internas, como em membranas plasmáticas, as proteínas e o DNA celular são oxidados (HALLIWELL e CROSS, 1994; KELLY, 2003) O estresse oxidativo tem sido implicado na patogênese de inúmeras doenças, como a arteriosclerose, insuficiência cardíaca, síndrome do desconforto respiratório no adulto e alguns tipos de câncer.

3.5.1 Efeitos da poluição sobre o sistema cardiorrespiratório

A presença de substâncias oxidantes no ar causa uma resposta inflamatória no aparelho respiratório, gerando aumento na acidez, viscosidade e

consistência do muco, produzidos pelas vias aéreas. Tais alterações acarretam na diminuição da resposta e/ou eficácia do sistema mucociliar (BASCON et al., 1996; CANÇADO et al., 2006). A literatura científica possui estudos relacionando a exposição aguda e a poluição do ar sobre a saúde (BRUNEKREEF e HOLGATE, 2002). Muitos estudos correlacionam o aumento do número de admissões hospitalares e atendimentos de emergência aos problemas respiratórios e cardiovasculares devido à elevação das concentrações do material particulado no ar de grandes cidades, como Porto Alegre (DALLAROSA et al., 2008), São Paulo (ANDRADE et al., 2012; SALDIVA et al., 1994), China (YU et al., 2012), Los Angeles (OSTRO et al., 2001), Boston (PETERS et al., 2001) entre outras.

Estudo realizado por Saldiva e colaboradores (1995), demonstrou que pessoas idosas portadoras de algum tipo de doença respiratória quando expostas à poluição, apresentavam uma redução na expectativa de vida em 4 anos. A mesma análise foi realizada avaliando os portadores de doenças cardíacas e observou-se uma redução na expectativa de vida em 10 anos. Desta forma, indivíduos com problemas cardiorrespiratórios são mais suscetíveis aos efeitos da exposição à poluição. Saldiva et al. (1994) observaram a diminuição na expectativa de vida em 19 anos para crianças portadoras de doenças respiratórias.

Freitas et al., (2003) demonstraram uma relação diretamente proporcional entre concentração de MP_{10} e atendimentos de emergência por doenças respiratórias preexistentes. Além disso, observaram aumento no número de óbitos em idosos. Corroborando com Freitas et al. (2003), Bhatnagar (2004) relacionou o aumento no número de admissões hospitalares por doença isquêmica cardíaca em pacientes com doença arterial coronariana estável, pela exposição ao material particulado, bem como ao NO_2 (KUNZLI et al., 2005; HOFFMANN et al., 2007; BROOK et al., 2010).

A forma mais nociva dos óxidos de nitrogênio para a saúde é o dióxido de nitrogênio (NO_2). O NO_2 por ser um gás lipossolúvel possui grande capacidade de penetração nas vias aéreas inferiores. Seus principais efeitos sobre a saúde humana são: desenvolvimento de enfisema pulmonar em longo prazo e edema pulmonar, em caso de intoxicação aguda, por causar lipoperoxidação lipídica (OGA et al., 2008; Yang et al., 2009). Animais de laboratório expostos ao NO_2 apresentaram um aumento na peroxidação lipídica em pulmão, bem como

oxidação de cisteínas e tirosinas por compostos relacionados aos processos oxidativos do NO₂. Por esse motivo, o NO₂ pode ter uma ação amplificada, causando modificação na função de muitas proteínas alvo.

Deste modo, a poluição determina um estresse oxidativo no tecido pulmonar levando a alterações inflamatórias e lesão celular (MENZEL, 1994; TAO et al., 2003; PINHO et al., 2004).

A exposição aguda à poluição atmosférica tem sido associada com inflamação sistêmica pulmonar, podendo ser o principal mecanismo para aceleração da aterosclerose (MILLS et al., 2007; TORNQVIST et al., 2007; RUCKERL et al., 2006). Estudos experimentais realizados em animais expostos aos poluentes atmosféricos revelaram que a fragilidade e o rompimento da placa aterosclerótica podem estar correlacionados à exposição ao MP e ao excesso de mortes por doenças cardiovasculares (LEWTAS, 2007).

Pereira et al. (2007) utilizaram um modelo animal de exposição aguda à poluição atmosférica na cidade de Porto Alegre e demonstraram que o dano oxidativo nos pulmões de animais foi tempo-dependente. Os animais que foram expostos ao MP₁₀ por um período de 20 horas apresentaram o dobro dos níveis de peroxidação lipídica no pulmão quando comparado aos animais expostos por 6 horas.

3.5.2 Efeitos da poluição sobre o sistema nervoso central (SNC)

O sistema nervoso central (SNC) apresenta sensibilidade elevada à ação de poluentes atmosféricos. Dados da literatura demonstram que a exposição à poluentes atmosféricos está relacionada a alterações nos processos de aprendizagem e memória (CALDERÓN-GARCIDUEÑAS et al., 2002; BLOCK e CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, 2009; MIGLIORE e COPPEDÈ, 2009).

A exposição ao material particulado é captada por terminações nervosas do epitélio nasal e por meio de translocação axonal via bulbo olfatório, atinge estruturas do SNC (CALDERÓN-GARCIDUEÑAS et al., 2002; 2004; 2007; ODERDÖSTER et al., 2005; PETERS et al., 2006). A associação entre a exposição à poluição atmosférica e a neuroinflamação foi descrita em estudos de coorte realizado em adultos que relataram elevação na transcrição da enzima ciclooxigenase no hipocampo e no córtex-prefrontal (CALDERÓN-GARCIDUEÑAS et al., 2004).

A inflamação pulmonar persistente em seres humanos, devida à deposição de partículas finas e ultrafinas em várias partes do sistema respiratório, acarreta a liberação de citocinas na circulação sanguínea. Por meio destes mediadores inflamatórios, interleucinas 6 (IL-6), 1β (IL- 1β) e fator de necrose tumoral α (TNF α), ocorre a ativação de receptores do endotélio vascular da barreira hematoencefálica, promovendo o aumento de sua permeabilidade (CALDERÓN-GARCIDUEÑAS et al., 2008b). Além disso, esses poluentes também induzem a formação de macrófagos que, ao cruzarem a barreira hematoencefálica, diferenciam-se em microglia no sistema nervoso e são capazes de promover neuroinflamação por meio da liberação de substâncias como óxido nítrico, proteases, derivados do ácido araquidônico e de proteína precursora β -amilóide. Esse agregado de peptídeo beta amiloide é característica patogênica do encéfalo de pacientes portadores de Alzheimer (CALDERÓN-GARCIDUEÑAS et al., 2008a; 2008b; BLOCK e CALDERÓN- GARCIDUEÑAS, 2009).

Logo, tanto os processos oxidativos como os inflamatórios têm sido definidos como mecanismos básicos por meio dos quais a poluição atmosférica impõe danos ao sistema nervoso (ZELIKOFF et al., 2002; BLOCK et al., 2004; MILLS et al., 2009).

Baseado na recente evidência que o SNC é afetado pela exposição das partículas presentes na atmosfera é importante verificar a possível influência dessa exposição sobre alterações neurocomportamentais (CALDERÓN-GARCIDUEÑAS et al., 2007; SUGLIA et al., 2008).

Calderón-Garcidueñas et al. (2008b) corroboraram a relação entre o processo neuroinflamatório determinado pela inalação de material particulado por crianças e adolescentes, com idades entre 7 e 17 anos, e a redução no tamanho do córtex pré-frontal, estrutura relacionada ao aprendizado. Suglia et al. (2008) confirmaram a relação entre a inalação de partículas de carbono, resultantes da frota veicular, e o declínio das funções cognitivas originadas através de testes de inteligência verbal, não verbal e memória.

Análises realizadas em camundongos recém-nascidos de fêmeas expostas às partículas resultantes da combustão de óleo diesel, segundo Hougaard et al. (2008) não apresentaram diferença no aprendizado referente à localização espacial. No entanto, Zanchi et al. (2008) demonstraram que ratos adultos expostos, através da instilação intranasal, apresentaram aumento de lipoperoxidação no estriado, assim como diminuição da atividade motora no

campo aberto. Em trabalho complementar, o mesmo grupo de pesquisadores ressaltou que não havia prejuízo na capacidade de habituação destes animais quando expostos a situações sequenciais a um mesmo ambiente (ZANCHI et al., 2010).

Atualmente, o impacto da poluição atmosférica tanto nas doenças (agudas e crônicas) como nas mortes prematuras tem sido avaliado mundialmente. Segundo a Organização Mundial de Saúde (2006) mais de 3 milhões de pessoas morrem devido aos efeitos da poluição do ar.

4 Manuscrito

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de um manuscrito. Os itens Métodos, Resultados e Discussão, e Referências Bibliográficas encontram-se inseridos no manuscrito. A apresentação do manuscrito segue as normas de publicação da revista: Environmental Science and Pollution Research

4.1 Manuscrito: Evaluation of weather conditions as well as NO₂ and PM_{2.5} levels in the urban areas of South Brazil in different seasons

Submetido à Environmental Science and Pollution Research

Evaluation of weather conditions as well as NO₂ and PM_{2.5} levels in the urban areas of South Brazil in different seasons

Roberta, Foerstnow Szczepaniak¹, Bruno, Bainy¹, Fabiano, Soares¹, Carina, Bork¹, Gustavo, Colares¹, Mauricio, Moresco², Alan, Fleck², Claudia, Rodhen², Giovana, Duzzo Gamaro¹

¹Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção (PPGBBio), Universidade Federal de Pelotas, *Campus Capão do Leão S/N Caixa Postal 354, CEP: 96010900 Phone: (53) 32757355 Pelotas/RS, Brazil*, Roberta_fs@yahoo.com.br, ggamaro@yahoo.com.br

²Laboratório de Estresse Oxidativo e Poluição Atmosférica, Universidade Federal de Ciências e Saúde de Porto Alegre

Abstract

Due to the ever-increasing importance of studying pollution effects on environment and population, the development of methodologies for the evaluation of atmospheric pollutants has allowed great advances concerning air quality monitoring. Nitrogen dioxide (NO₂) and fine particulate matters (PM_{2.5}) have as major sources vehicle engine exhausts and industrial processes. In the south of Brazil, the economical and industrial growth allied to the expansion of the local vehicle fleet have brought several impacts on human health and environment. For this region, there are few studies concerning air pollution monitoring and dispersion. Data were collected seasonally (summer, autumn, winter and spring) in eight points over area, aiming to have a picture of the south as a whole: point 1 southern part, 2 point east region, 3 central zone, point 4 western, point 5 in the southwest, 6 in the north, point 7 in Southeast and point 8 Northeast. Annual mean of the PM_{2.5} (µg/m³) measurements are: 1) 48.95, 2) 31.29, 3) 39.56, 4) 30.28, 5) 19.15, 6) 31.4, 7) 29.79, 8) 24.25 and annual mean for NO₂ (µg/m³) were: 1) 9.06, 2) 10.49, 3) 14.13, 4) 21.44, 5) 17.20, 6) 21.94, 7) 8.83, 8) 6.77. We conclude that there are significant differences in different sites, mainly due to traffic and human activities characteristics of each point. On the other hand, meteorological factors act similarly in all sites concerning the pollution dispersion.

Keywords: Air pollution, Fine particulate matter, Meteorological, Nitrogen dioxide, Exposure assessment, Seasons

1.Introduction

Atmospheric pollution is a global public health problem that causes millions of premature deaths per year worldwide. Moreover, atmospheric pollution is a factor that has been affecting humans and the environment (Yu et al. 2012; Karnae and John 2011).

Air quality has been a major cause of concern nowadays regarding the increasing concentration of pollutants in the atmosphere, which for many reasons exceed the established maximum standards. In urban areas, the main concern is related to the emission of pollutants by vehicle exhaust. Size and chemical composition are two of the main parameters that affect the way in which such pollutants correlate with population health. Ambient air pollution has been associated with a wide variety of effects on human health such as increased mortality risk, increased rates of hospital admissions and emergency department visits, exacerbation of chronic respiratory conditions (e.g., asthma), and decreased lung function. However, recently epidemiological data suggest a significant effect also of meteorological factors such as humidity, temperature, rainfall, and atmospheric pressure in interaction with pollution levels (Nastos and Matzarakis 2006; Samet and Krewski 2007; Chen et al. 2012). Particulate matter with aerodynamic diameter greater than 10 μm , or coarse particulate (PM_{10}) have been contributing to the incidence and severity of respiratory diseases, mainly in urban areas. PM_{10} can penetrate into human lungs. Particulate matter with aerodynamic diameter smaller than 2.5 μm , or fine particulate ($\text{PM}_{2.5}$) may contain a high proportion of various toxic metals and organic compounds, among others. The increasing level of $\text{PM}_{2.5}$ has been shown to reduce pulmonary function and exasperate respiratory problems in respiratory compromised people, such as asthmatics (Cançado et al. 2006; López et al. 2011; Pant et al. 2012).

Nitrogen dioxide (NO_2) is an air pollutant usually used as an indicator for air pollution generated by mobile and stationary sources. Gaseous nitrogen oxides are not exclusively radioactive or chemically active compounds, but they may exhibit hazardous toxins, which in high concentrations represent a direct dangerous for human health (Ionov and Poberovskii 2012; Chen et al. 2012; Gonzales et al. 2012). Berger et al. (2006) found that increased risk of supraventricular tachycardia in men with coronary heart disease was associated with NO_2 , and Dockery et al. (2005) found similar responses associated with the exposure to NO_2 . Indeed, human exposure to high concentrations of NO_2 reduces the immunity and resistance to respiratory tract infections (a high risk of catarrh of the upper respiratory tract, bronchitis, and pneumonia) (Cançado et al. 2006; Ionov and Poberovskii 2012). Thus, the increasing evidence indicating that fine particulate matter in

the atmosphere is responsible for adverse effects on humans led to the imposition of regulative restrictions on the emission of $PM_{2.5}$ as well as on NO_2 .

There are several studies about the influence of meteorological systems on pollution dispersion from synoptic to micro and local scales, which include aspects of terrain features. Since pollutants are released in the lowest part of troposphere, named Atmospheric Boundary Layer (ABL), the characteristics and behaviour of this layer may determine the air pollution concentration even more than the emission rate itself. On clear sky conditions under an anticyclone regime, for instance, there is a well-characterized evolution of ABL, which starts as a turbulence with sunrise and develops until the afternoon. During this process, the ABL height may reach several hundreds of meters, and this factor combined with vertical air motions are extremely favourable to pollution dispersion. Moreover, the stronger horizontal wind helps the dispersion to occur. On the other hand, during clear night, sky turbulence is suppressed and the ABL height may falls to few tens of meters. Under these conditions, thermal inversion is likely to occur, confining pollution within the lowest meters above ground. Under a different condition, such as the action of a cyclone or convective system, mechanical turbulences generated by strong horizontal winds and rain are responsible for reducing the air pollution concentration through the processes of dispersion and wet deposition. Regarding topographical effects, the main features are the breezes (valley – mountain and sea/lake – land) due to their differential horizontal heating in microscale creating vertical circulation cells, which reach a few kilometres (Stull 1988). Gehrig and Buchmann (2003), while discussing the seasonal and spatial distribution of particulate matter over Switzerland, stated that the huge seasonal variation on the pollutant concentration is much more related to meteorological effects (seasonality) than to any possible emission fluctuations, corroborating the important topographical influence on the pollution dispersion. Zhao et al. (2009) found out that in the urban area of Beijing, the highest concentrations of $PM_{2.5}$ are observed in the winter and the lowest in the summer due to heat sources and lower ABL height during cold periods. They have also corroborate that in the summer and spring there are the most favourable conditions to dispersion: increased ABL height, stronger winds, and abundant precipitation.

The evaluated region is located in the southernmost state of Brazil on a coastal plain and its urban area is situated at low altitude, with an average of 7 meters above the mean sea level. The region it is located 250 Km away from Porto Alegre, the capital city of the state and 130 km from the Uruguay border. The Patos Lagoon lies to the East and the São Gonçalo Channel lies to the South, separating Pelotas from the city of Rio Grande (60 Km southeastwards). The area also hosts a significant agroindustrial park, important canneries, which have a production of more than 40 million cans of peaches a year, and the largest installed

capacity of cattle slaughtering statewide. The region is the largest benefactor of rice in Latin America and has a significant fleet of vehicles.

The climate is subtropical wet with warm and cold seasons. The two main meteorological systems responsible for rainfall are the extratropical cyclones (all over the year) and the convective systems (mainly in warm months). It is worth noting that, there are seasonal variations in human behavior and activities. In the winter, for instance, there is a large use of vegetal coal in house heating, and in the summer, there is a sharp increase in the population due to the proximity to the southern part of the Patos Lagoon, where the 7 point is located. Considering all the above mentioned reasons, in this study, we aimed at monitoring NO_2 and $\text{PM}_{2.5}$ of atmospheric pollution in all seasons of one year in the southern Brazil.

2. Methods

2.1 Points of Environmental Monitoring

The eight points were chosen in order to represent the distribution of pollutants in the region as a whole (Fig I)

The chosen sites are briefly described in Table I.

2.2 Measurement of Particulate Matter 2.5 micrometre ($\text{PM}_{2.5}$)

For the measurement of particulate matter (PM), we used the DustTrak equipment, Model 8520, TSI Incorporated, St. Paul, MN, USA. This equipment is designed to separate the particulate matter suspended in the air as inhalable (with maximum aerodynamic diameter smaller than $10\text{ }\mu\text{m}$) or thin (with maximum aerodynamic diameter less than $2.5\text{ }\mu\text{m}$) measuring the concentration of particulates on a filter bed, which has an infrared laser. In the case of this experiment, we monitored the portion of fine particulate material corresponding to $\text{MP}_{2.5}$ for 48 h in all seasons (unless for some exception, for which the monitoring time ranged from 24 – 48h).

2.3 Monitoring Nitrogen Dioxide (NO_2)

The sampling of NO_2 is based on the principle of diffusion of atmospheric NO_2 on filters in pulp impregnated with an absorbing solution for reaction with the gas (Lodge 1989). The exposure of the filters

was performed by means of plastic tube attached to trees in a stand of wood at a height of 2 meters at the monitoring points for 7 consecutive days in all seasons. In each monitoring point, a support containing six filters for sampling and another white filter were provided. The white filter consists of a filter sample not exposed to the atmosphere, which remained in a clear plastic bag and sealed. After the extraction process, the samples were analyzed by photocolourimetry, and the samples were read in a spectrophotometer (Lambda 35 UV / VIS - Perkin Elmer ®) at 550 nm.

2.4 Statistical Analysis

Data were expressed as mean $\pm$ standard error. To assess the statistical difference between the concentrations of MP at different points, we applied the test of analysis of variance followed by Tukey post-hoc test, the significance level was set at 5% ($P \leq 0.05$). Data analysis was performed using SPSS version 11.0 (SPSS Inc., an IBM Company Headquarters, Chicago, IL, USA).

2.5 Meteorological Data

Meteorological data were provided by the Department of Meteorology from the Federal University of Pelotas (UFPEL), for every ten-minute interval. For wind speed and direction, the hourly means were computed. For precipitation data, the hourly totals were computed.

3. Results and Discussions

The Brazilian National Ambient Air Quality Standard (NAAQS) sets the 24-h limit for coarse inhalable particulate matter ($PM_{2.5-10}$) at $150 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Nevertheless, for fine particles ($PM_{2.5}$) there is no NAAQS (CETESB 2009).

In 2006, the annual mean PM_{10} concentration was $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ and was therefore (assuming again that $PM_{2.5}$ accounts for 60% of PM_{10}) estimated to be $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ annual mean and 24-h mean $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ for $PM_{2.5}$ (WHO 2006).

The results of $PM_{2.5}$ in the eight points in all seasons of the year are presented in Table II.

The analyses of $PM_{2.5}$ ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) during the summer sampling showed that the hugest concentration occurred in the points 1 (27.9 ± 1.3), possibly due to the storage of rice production and 2 (25.9 ± 1.7), which provides access to the Patos Lagoon, where a great part of population spend time in the summer. Those

points statistically distinguished from the others (ANOVA followed by Tuckey $P < 0.05$). The points 3 (11.91 ± 0.76), 5 (11.82 ± 1.09) and 7 (8.91 ± 0.35) presented the smallest concentrations of $PM_{2.5}$. According to Miranda (2012), the great metropolitan area of Porto Alegre (about 250 km northwards from area) has more than 4 million inhabitants and 0.6 million vehicles and the average concentration of $PM_{2.5}$ was $13.9 \mu\text{g}/\text{m}^3$ in 2008, under the maximum established by World Health Organization (WHO). Porto Alegre is the major urban area of Rio Grande do Sul. Its climate is strongly influenced by cold air masses migrating from the polar region, the seasons are clearly defined and the rain is well distributed throughout the year (Dallarosa et al. 2008).

The results of time evolution for rainfall, wind speed and concentration of $PM_{2.5}$ in summer for all points studied are presented in Figure II.

Figure II shows the time evolution for rainfall, wind speed and concentration of $PM_{2.5}$. It is noticeable that for almost all the monitored point (excepting for the 7 point) there was an excess of fine particulate matter, at least in one hour. One interesting fact is that for the days 23 and 24, despite the significant rainfall (which is likely to favour wet deposition), there were reports of high concentrations of the pollutant. The concentrations also tend to respond the wind speed with a little delay. For example, a little time after the wind speed increases, there is a trend in reducing the $PM_{2.5}$ concentration. According to the synoptic analysis, the most favourable days to high concentration of pollution would have been between days 26 and 31 due to favourable conditions to atmospheric stability, suppressing convection and air mixing, excepting days 27 and 28, when the rain should have carried away some of the total pollution. It is worth remembering that during summer time the ABL is more developed, that is, it has its top higher than in a cold period, which means that there is more volume of air available to dilute the pollution.

The highest $PM_{2.5}$ averaged concentration registers in autumn were in the points 1 (69.6 ± 9.1) and 4 (52.5 ± 3.6). The latter has a very important avenue that connects the centre to the district (4) and to the highway that goes to the Federal University of Pelotas and the neighbouring city, Rio Grande (about 60 km southeastwards from Pelotas). The points 7 (7.9 ± 1.03), 2 (25.1 ± 3.8), 5 (17.7 ± 1.35) and 8 (18.7 ± 2.8) did not exhibit difference between each other as well as the points 6 (40.9 ± 3.4) and 3 (42.6 ± 3.17) (ANOVA followed by Tuckey $P < 0.05$). In a comparison, the results obtained by Dallarosa et al. (2008) for the autumn in Porto Alegre were smaller ($29.70 \mu\text{g}/\text{m}^3$) than in 6 and 3.

The results of time evolution for rainfall, wind speed and concentration of $PM_{2.5}$ in autumn for all points studied are presented in Figure III.

Figure III shows some important aspects about the evolution of $PM_{2.5}$ concentration and weather conditions. There was clearly less rainfall accumulate and the wind speed was lower when comparing to summer, which means that there was smaller wet deposition and advection. On the other hand, the mean concentration of fine particulate matter had a sharp increase. Excepting for the points 5 and 7, all the other points seem to have a straight match to the simultaneously measured points, such as for 6 and 1, despite their distance. In this sampling, the crossing of the $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ occurred over a great part of the time.

In the winter, there is a clear and accentuated increase in $PM_{2.5}$ concentration, over all the sampling points. The points 7 (88.10 ± 7.22) and 1 (84.6 ± 13.9) presented high values of $PM_{2.5}$, and were statistically different from the points 5 (36.5 ± 4.9) and 8 (37.69 ± 6.16) (ANOVA followed by Tukey $P < 0.05$), which registered the lowest concentration values, although crossing the $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ WHO recommendation. According to the Air Quality Monitoring Network (FEPAM), the mean concentration in Porto Alegre downtown during the winter of 2002 was $109.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$. In comparison with Miranda (2012), in 2008 the average concentration during the whole winter in Porto Alegre was $19.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$, and in Rio Grande it reached $29.4 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Rio Grande is the most important port city in the state and has one of the most important maritime ports in Brazil. The climate is very similar to evaluated region; it is subtropical and mild, with a strong oceanic influence and relatively cool winters, warm summers and regular precipitation all year.

The results of time evolution for rainfall, wind speed and concentration of $PM_{2.5}$ in winter for all points studied are presented in Figure IV.

Data shown in Figure IV indicate that the referred period of winter was highly favourable to retain pollutants on the lowest troposphere. This is particularly the case in which there is strong atmospheric stability suppress the development of the mixing layer on the ABL during the day (that would be responsible for stirring the layer) and maintaining a strong stable layer closer to the ground at night. This is why the major peaks of concentrations happened during night time (by 0 UTC – 9 pm local time). The mean wind speed, just like in autumn, was relatively lower, and there was quite a few rainfall during the sampling period.

The results from spring show that for the points 6 (29.42 ± 2.53), 8 (25.21 ± 2.48) and 3 (25.09 ± 6.21), it was registered the greatest concentration crossing the $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ WHO boundary. Those points were statistically different from the other points (ANOVA followed by Tukey $P < 0.05$). The points 2 (10.29 ± 1.05), 5 (10.63 ± 0.28), 4 (11.28 ± 0.82), 1 (13.66 ± 0.81) and 7 (14.22 ± 0.79) presented smaller concentrations and did not differ

statistically between each other. According to FEPAM, the mean concentration in the spring for Rio Grande (mobile sampling station) was computed as $21 \mu\text{g}/\text{m}^3$, whereas in Porto Alegre it was $25.98 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (Dallarosa et al. 2008).

The results of time evolution for rainfall, wind speed and concentration of $\text{PM}_{2.5}$ in spring for all points studied are presented in Figure V.

Figure V indicates that the sampling period in the spring had the greatest accumulate rainfall and mean wind speed among all the other periods. It also depicts a huge variability on the $\text{PM}_{2.5}$ concentration, which remained below the $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ value in most of the time, but had extremely high peaks, including two not shown in the point 3 (270 and $190 \mu\text{g}/\text{m}^3$, respectively). In agreement to all the other previous experiments we carried out, the concentration peaks occurred all within the first hours in the morning or the first hours in the evening, which are the most intense traffic hours. There is also a clear relationship of inverse proportionality of the pollutant concentration and the wind speed and precipitation.

The current WHO guideline value of $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (annual mean) was determined to support the public from the health effects of gaseous NO_2 . The reason for this was that most of the abatement methods specific for NO_x are not designed to control other co-pollutants and may even increase their emissions. Accordingly, NO_2 is monitored as a marker for complex combustion-generated pollution mixture, thus a lower annual guideline value should be used.

The results of NO_2 in the eight points in all seasons of the year are presented in Table III.

The points that presented the greatest concentration of NO_2 ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) in the summer were 3 (18.86 ± 1.24) and 6 (18.86 ± 2.07), both within the WHO established values ($40 \mu\text{g}/\text{m}^3$). The points 2 (2.92 ± 0.22) and 8 (1.60 ± 0.42) were statistically different from the points 1 (10.77 ± 1.30), 3 (18.86 ± 1.24) and 6 (18.86 ± 2.07), (ANOVA $P < 0.05$ followed by Tukey). Furthermore, the smallest records for NO_2 concentration were in the sites 8 (1.60 ± 0.42), 2 (2.92 ± 0.22), 4 (9.26 ± 0.46), 5 (9.00 ± 0.47) and 7 (5.93 ± 4.49). According to FEPAM (2006), the concentration of NO_2 in the summer in Porto Alegre ($47 \mu\text{g}/\text{m}^3$) was much higher than in evaluated region.

In the autumn, NO_2 data revealed that the great concentration sites were 5 (36.68 ± 0.81), 4 (34.29 ± 0.78) and 6 (28.51 ± 0.82), being statistically different from the other points. Nevertheless, none of them recorded values exceeding the WHO limit. The points 8 (4.90 ± 1.57), 3 (8.88 ± 0.78), 1 (12.26 ± 0.78) and 7 (13.35 ± 1.92) recorded smaller concentration and did not statistically differ from each other. In 2006, the autumn average of NO_2 concentration in Porto Alegre ($86 \mu\text{g}/\text{m}^3$) was much higher than in evaluated area.

The winter greatest values were reached in the sites 3 (19 ± 2.3), 6 (23.6 ± 2.2), and 4 (25.52 ± 0.38), but not crossing the WHO standard. In 1 (9.1 ± 2.1) and 5 (10.6 ± 3.9) we observed smallest NO_2 concentration, differing statistically from the other points. Data from FEPAM showed that, in 2002, the average NO_2 concentration over the central Porto Alegre in the winter was lower ($54.2 \mu\text{g}/\text{m}^3$) than in the city of Rio Grande ($61.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$). In the spring, the points 6 (16.81 ± 1.10) and 4 (16.70 ± 0.62) registered the greatest concentration values and were statistically different from the other sites. The sites 7 (3.63 ± 0.20), 1 (4.08 ± 1.10) and 2 (4.57 ± 1.32) had smaller concentration and did not differ from each other statistically. Data from the mobile air quality station in Rio Grande registered in the spring an average concentration of NO_2 of $74.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$, higher than in Porto Alegre ($60 \mu\text{g}/\text{m}^3$), which registered lower concentration values, although crossing the $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$ WHO recommendation.

4. Conclusion

We can notice that the different sites studied did not follow a pattern together, that is, there are significant differences in levels of pollution within the same area. Such differences can be due to the characteristics of each region with respect to the traffic of vehicles or other human activities.

The knowledge of pollution dispersion locally applied is tremendously important for the evaluation of the emission impacts. Since there are no indicatives that social and industrial activities drastically change in the different seasons, the highly variable pollution records for each site may be well explained by the different meteorological conditions, which may change seasonally or daily with respect to wind, precipitation and other variables. The only exception is for the 7 point, where many people spend days or weeks during summer.

Though the experiments were made in short periods and were meant to be southern representative area, the results obtained in this study clearly indicate that the region as a whole is a potential host for critical air quality episodes, overall during winter. The results also show the importance of implementing programs focused on controlling the emissions of fine particulate matter in urban areas.

Acknowledgement: Financial support for the study was provided through the “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Edital 14/2009 and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior for scholarship. We also would like to thank the Laboratório de Estresse Oxidativo e Poluição Atmosférica –Universidade Federal Ciências da Saúde de Porto Alegre – RS- Brasil

References

- Andrade MF, Miranda RM, Fornaro A, Kerr A, Oyama B, Andre PA, Saldiva P (2012) Vehicle emissions and PM_{2.5} mass concentrations in six Brazilian cities. *Air Qual Atmos Health* 5:79–88.
- Berger A, Zareba W, Schneider A., Ruickerl R, Ibaldo-mull A, Cyrus J, Wichmann HE, Peters A (2006) Runs of ventricular and supraventricular tachycardia triggered by air pollution in patients with coronary heart disease. *J. Occup. Environ. Med.* 48, 1149–1158.
- Cançado JED, Braga A, Pereira LAA, Arbex MA, Saldiva PHN, Santos UP (2006) Clinical repercussions of exposure to atmospheric pollution. *J Bras Pneumol.* 32(Supl1):S5-S11.
- CETESB (2009) Relatório de Qualidade do Ar no Estado de São Paulo. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, Relatórios/CETESB ISSN 0103-4103. São Paulo
- Chen R, Samoli E, Wong CM, Huang W, Wang Z, Chen B, Kan H (2012) Associations between short-term exposure to nitrogen dioxide and mortality in 17 Chinese cities: The China Air Pollution and Health Effects Study. *Environment International* 45, 32–38.
- Dallarosa J, Teixeira EC, Meira L, Wiegand F (2008) Study of the chemical elements and polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particles of PM₁₀ and PM_{2.5} in the urban and rural areas of South Brazil. *Atmospheric Research.* 89, 76–92.
- Dockery D W, Luttmann-Gibson H, Rich D Q, Link M S, Mittleman M A, Gold DR, Koutrakis P, Schwartz JD, Verrier R L (2005) Association of air pollution with increased incidence of ventricular tachyarrhythmias recorded by implanted cardioverter defibrillators. *Environ. Health Perspect.* 113, 670–674.
- FEPAM-Fundação Estadual de Proteção Ambiental. Air Quality. Porto Alegre: Fepam, 2012
- Gehrig R, Buchmann B (2003) Characterising seasonal variations and spatial distribution of ambient PM₁₀ and PM_{2.5} concentrations based on long-term Swiss monitoring data. *Atmospheric Environment* 37, Issue 19, p. 2571–2580.
- Gonzales M, Myers O, Smith L, Olvera HA, Mukerjee S, Li W, Pingitor E N, Amaya M, Burchiel S, Berwick M, Study A (2012) Evaluation of land use regression models for NO₂ in El Paso, Texas, USA. *Science of the Total Environment* 432, 135–142.
- Pant P, Harrison RM (2012) Critical review of receptor modelling for particulate matter: A case study of India. *Atmospheric Environment.* 49, 1-12.
- Ionov DV, Poberovskii AV (2012) Nitrogen Dioxide in the Air Basin of St. Petersburg: Remote Measurements and Numerical Simulation. *Atmospheric And Oceanic Physics* .Vol. 48 No. 4.
- Karnae S, John K (2011) Source apportionment of fine particulate matter measured in an industrialized coastal urban area of South Texas. *Atmospheric Environment.* 45, 769, 3776.
- Miranda RM, Andrade MF, Fornaro A, Astolfo R, Andre PA, Saldiva P (2012) Urban air pollution: a representative survey of PM_{2.5} mass concentrations in six Brazilian cities. *Air Qual Atmos Health.* 5:63–77.
- Nastos P, Matzarakis A (2006) Weather impacts on respiratory infections in Athens, Greece. *International Journal of Biometeorology* 50, 358e369.
- Lodge JP. Methods of Air sampling and analysis -3^a ed. Intersociety Comité 1989; 399-402.
- López ML, Ceppi S, Palancar GG, Olcese LE, Tirao G, Toselli BM (2011) Elemental concentration and source identification of PM₁₀ and PM_{2.5} by SR-XRF in Córdoba City, Argentina. *Atmospheric Environment.* 45.
- Samet J, Krewski D (2007) Health effects associated with exposure to ambient air pollution. *J Toxicol Environ Health.* 70:227–42.

Stull RB (1988) An introduction to Boundary Layer Meteorology, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS - Dorcrecht, 666p.

Yu ITS, ZhangY, Tam WWST, Yan QH, Xu Y, Xun X, Wu W, Ma W, Tian LW, Tse LA, Lao XQ (2012) Effect of ambient air pollution on daily mortality rates in Guangzhou, China. *Atmospheric Environment* 46, 528e535.

WHO—World Health Organization (2006) Air quality guidelines, global update 2005: particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulphur dioxide. Germany; chap. 10:217–305

Zhao X, Zhang X, Xu X, Xu J, Meng W, Pu W (2009) Seasonal and diurnal variations of ambient PM_{2.5} concentration in urban and rural environments in Beijing. *Atmospheric Environment* 43, 2893–2900

Legends

Figure I Sampling area locations in Pelotas

Figure II **a)** Time evolution for hourly rainfall , **b)** Hourly averaged wind speed (red line for total average) and **c)** Hourly averaged PM_{2.5} concentration for the monitored points (purple horizontal line for 25 $\mu\text{m.m}^{-3}$), for the summer sampling. Hours expressed in Universal Time Coordinate (UTC – Greenwich Meridian Time); Local time = UTC - 2 (summer) and UTC - 3 for the remaining seasons.

Figure III **a)** Time evolution for hourly rainfall , **b)** Hourly averaged wind speed (red line for total average) and **c)** Hourly averaged PM_{2.5} concentration for the monitored points (purple horizontal line for 25 $\mu\text{m.m}^{-3}$), for the autumn sampling. Hours expressed in Universal Time Coordinate (UTC – Greenwich Meridian Time); Local time = UTC - 2 (autumn) and UTC - 3 for the remaining seasons.

Figure IV **a)** Time evolution for hourly rainfall , **b)** Hourly averaged wind speed (red line for total average) and **c)** Hourly averaged PM_{2.5} concentration for the monitored points (purple horizontal line for 25 $\mu\text{m.m}^{-3}$), for the winter sampling. Hours expressed in Universal Time Coordinate (UTC – Greenwich Meridian Time); Local time = UTC - 2 (winter) and UTC - 3 for the remaining seasons.

Figure V **a)** Time evolution for hourly rainfall , **b)** Hourly averaged wind speed (red line for total average) and **c)** Hourly averaged PM_{2.5} concentration for the monitored points (purple horizontal line for 25 $\mu\text{m.m}^{-3}$), for the spring sampling. Hours expressed in Universal Time Coordinate (UTC – Greenwich Meridian Time); Local time = UTC - 2 (spring) and UTC - 3 for the remaining seasons.

Table I: The monitoring sites and their respective characteristics

Table II: Mean $\pm$ Standard Errors concentrations of PM_{2.5} in the eight points of all the seasons ($\mu\text{g/m}^3$)

Table III: Mean $\pm$ Standard Errors concentrations of NO₂ in the eight points of all the seasons ($\mu\text{g/m}^3$)

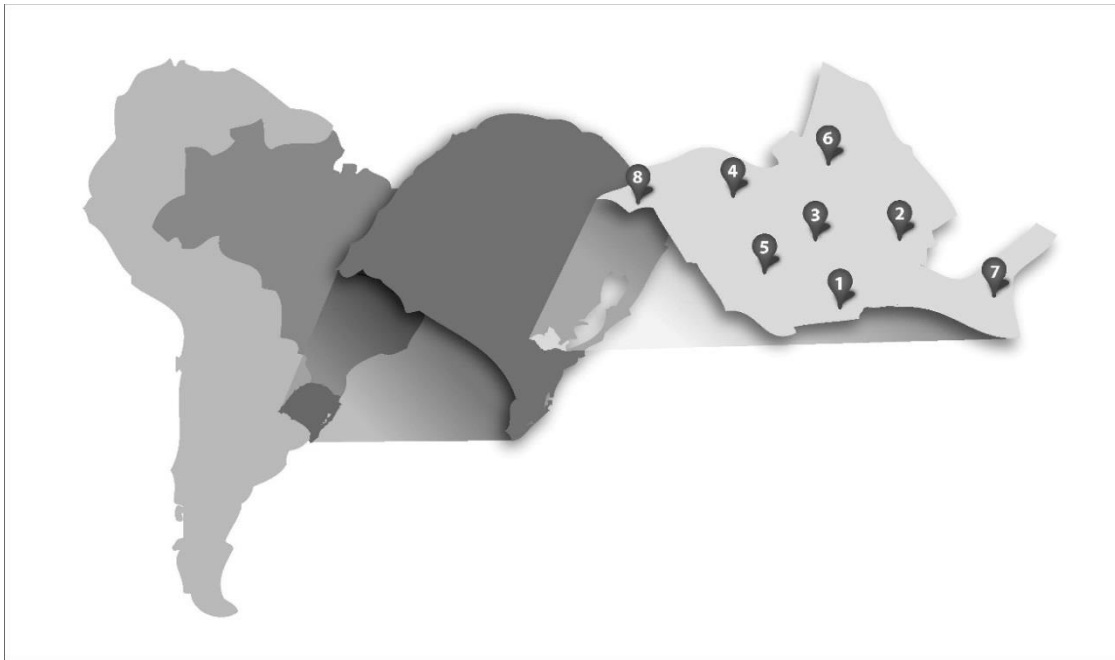


Figure I

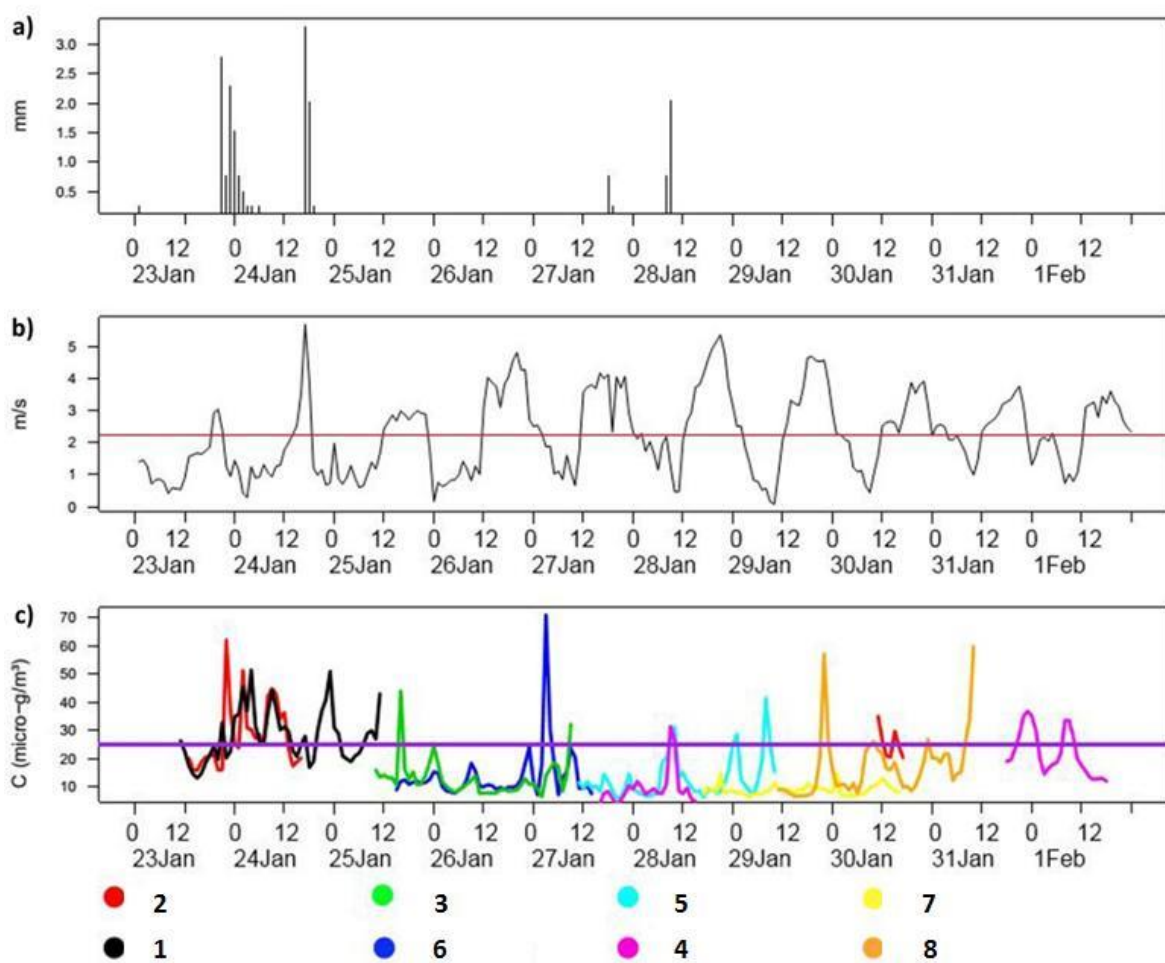


Figure II

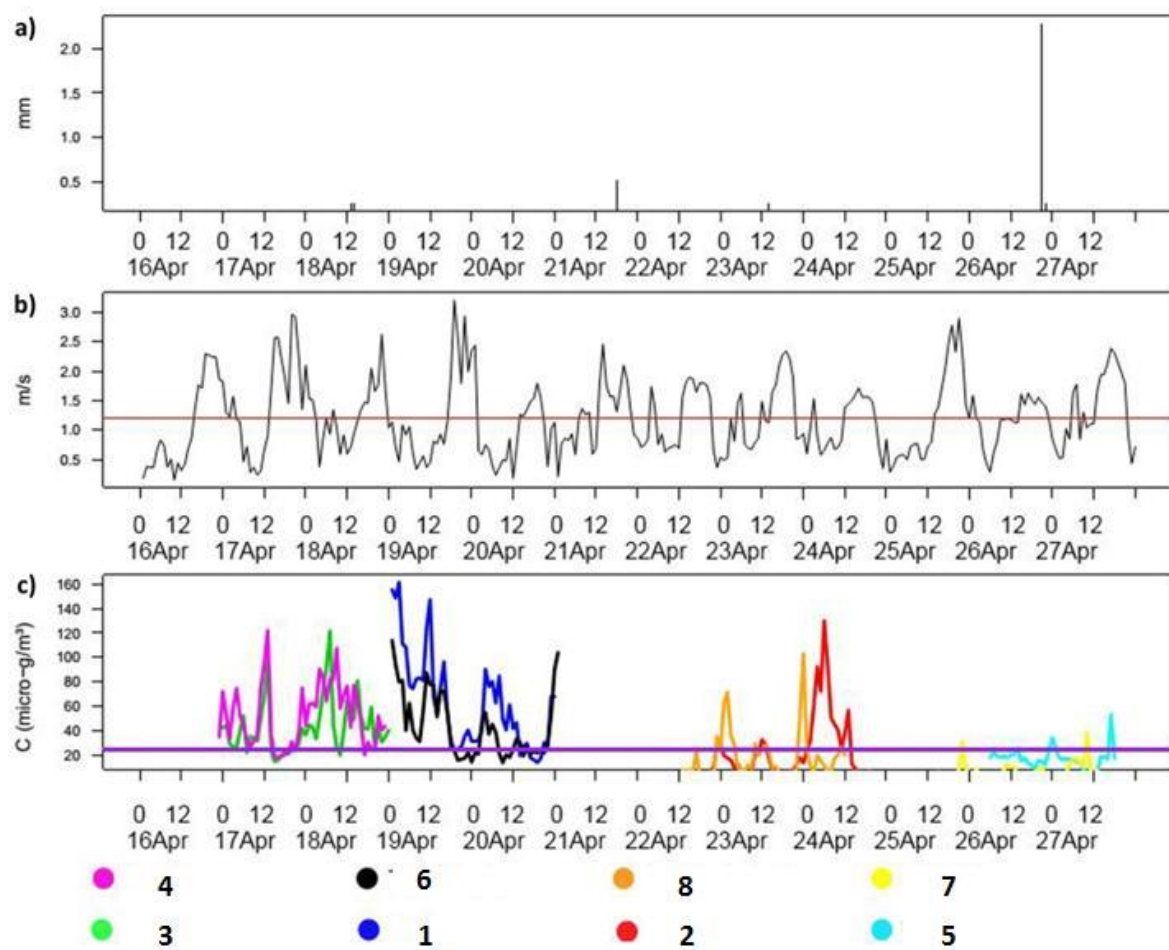


Figure III

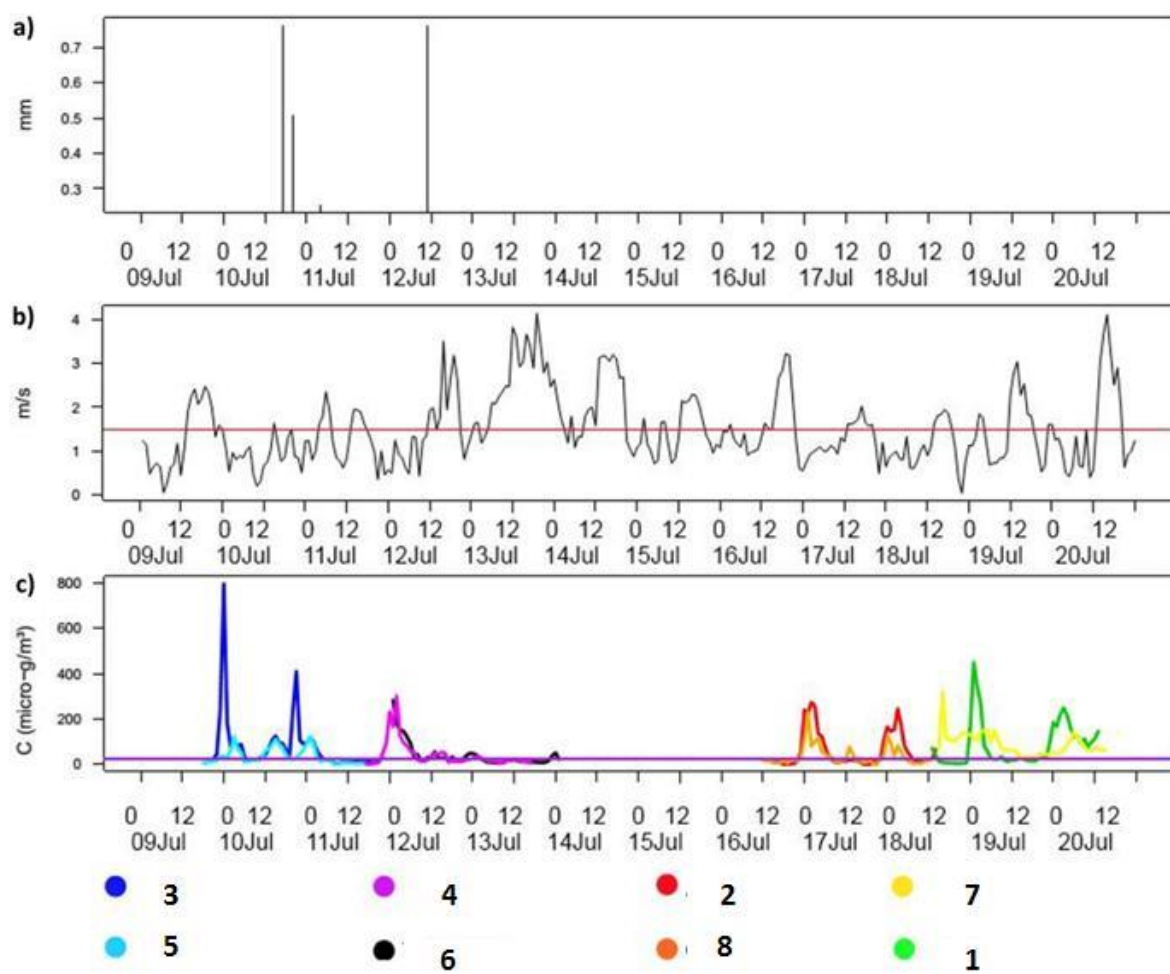


Figure IV

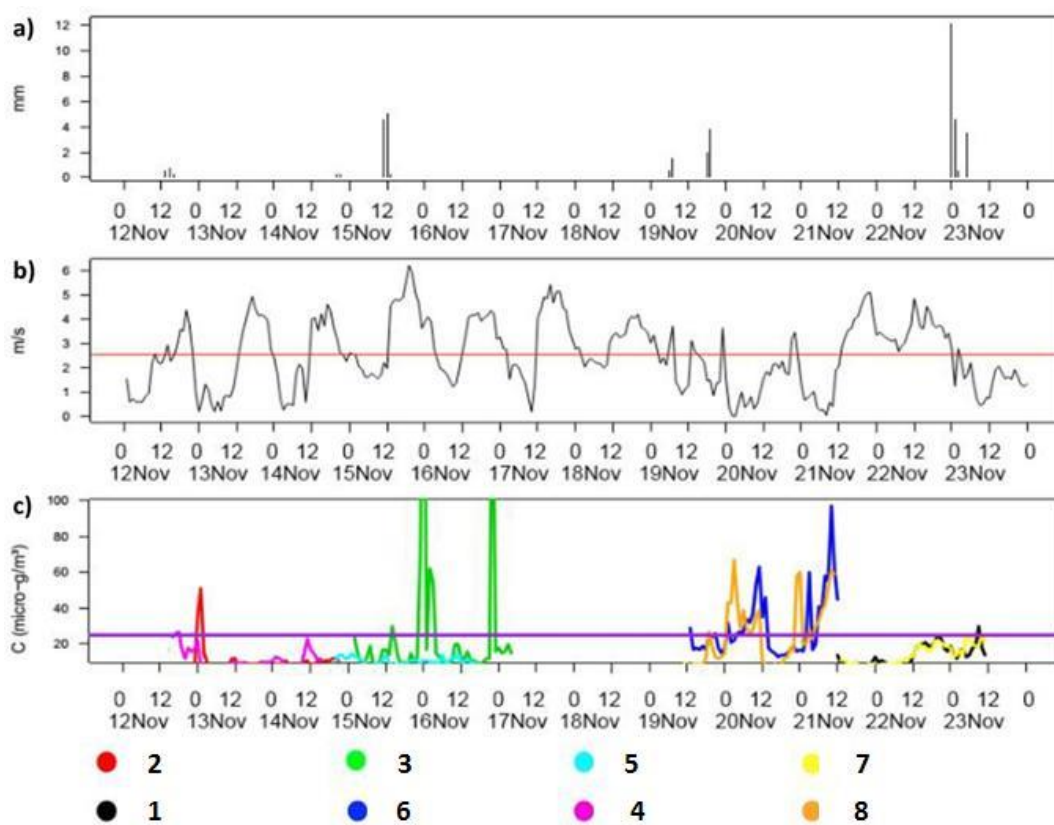


Figure V

Table I:

	Site	Characteristic
1	31°46'53"S 52°20'04"W	Fluvial harbour, poorly populated.
2	31°45'11"S 52°18'44"W	Urban area, highly populated. Way to the Patos Lagoon.
3	31°25'48"S 52°20'30"W	Downtown – high traffic rate.
4	31°45'42"S 52°21'37"W	Urban area, highly populated.
5	31°46'02"S 52°21'10"W	Close to downtown and to a train line.
6	31°44'01"S 52°20'40"W	Urban area, highly populated. Main entrance to the town.
7	31°45'39"S 52°14'53"W	A <i>beach</i> at the Patos Lagoon. Area poorly populated in all the seasons but in the summer.
8	31°45'46"S 52°25'08"W	Poorly populated, but close to a highway. Near the biggest University Campus, where meteorological data were collected.

Table II

Seasons	Summer	Autumn	Winter	Spring
Points				
1	27.93 $\pm$ 1.30*	69.62 $\pm$ 9.12*	84.59 $\pm$ 13.92*	13.66 $\pm$ 0.81
2	25.97 $\pm$ 1.71*	25.10 $\pm$ 3.8	63.80 $\pm$ 11.71	10.29 $\pm$ 1.05
3	11.91 $\pm$ 0.76	42.60 $\pm$ 3.17	78.66 $\pm$ 18.07	25.09 $\pm$ 6.21*
4	16.20 $\pm$ 1.63	52.58 $\pm$ 3.68	41.06 $\pm$ 8.26	11.28 $\pm$ 0.82
5	11.82 $\pm$ 1.09	17.68 $\pm$ 1.35	36.47 $\pm$ 4.94	10.63 $\pm$ 0.28
6	14.44 $\pm$ 1.78	40.97 $\pm$ 3.44	40.77 $\pm$ 7.48	29.42 $\pm$ 2.53*
7	8.91 $\pm$ 0.35	7.95 $\pm$ 1.03	88.10 $\pm$ 7.22*	14.22 $\pm$ 0.79
8	8.91 $\pm$ 0.35	18.68 $\pm$ 2.82	37.69 $\pm$ 6.16	25.21 $\pm$ 2.48*

Data are expressed as mean $\pm$ SEM. *There is significative difference between places of exposition [ANOVA $P < 0,05$ post hoc Tuckey $P < 0,05$].

Table III

Seasons	Summer	Autumn	Winter	Spring
Points				
1	10.77 $\pm$ 1.30	12.26 $\pm$ 0.78	9.13 $\pm$ 0.89*	4.08 $\pm$ 1.10
2	2.92 $\pm$ 0.22*	17.09 $\pm$ 1.09	17.39 $\pm$ 1.16	4.57 $\pm$ 1.32
3	18.86 $\pm$ 1.24	8.88 $\pm$ 0.78	19.01 $\pm$ 0.96	9.77 $\pm$ 0.58
4	9.00 $\pm$ 0.46	34.29 $\pm$ 0.78*	25.52 $\pm$ 0.38	16.70 $\pm$ 0.62*
5	11.82 $\pm$ 0.47	36.68 $\pm$ 0.81*	10.68 $\pm$ 1.60*	12.45 $\pm$ 1.10
6	18.86 $\pm$ 2.07	28.51 $\pm$ 0.82*	23.61 $\pm$ 0.90	16.81 $\pm$ 1.10*
7	5.93 $\pm$ 4.79	13.35 $\pm$ 1.92	12.44 $\pm$ 0.98	3.63 $\pm$ 0.20
8	1.60 $\pm$ 0.42*	4.90 $\pm$ 1.57	10.81 $\pm$ 0.59	9.80 $\pm$ 0.48

Data are expressed as mean $\pm$ SEM. *There is significative difference between places of exposition [ANOVA $P < 0,05$ post hoc Tuckey $P < 0,05$].

4.2 Manuscrito: Effects of acute exposure to $MP_{2.5}$ in the acetylcholinesterase levels and biochemical parameters in the central nervous system in southern Brazil

Formatado de acordo com as normas Environmental Science and Pollution
Research

Effects of acute exposure to MP_{2.5} in the acetylcholinesterase levels and biochemical parameters in the central nervous system in southern Brazil

Roberta, Foerstnow Szczepaniak¹, Bruno, Bainy¹, Fabiano, Soares¹, Carina, Bork¹, Gustavo, Colares¹, Pamela, Vitória Salermo² Danusa, Mar Arcego³, Rachel, Krolow³, Carla, Dalmaz³, Claudia, Ramos Rhoden⁴, Giovana, Duzzo Gamaro¹

¹Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção (PPGBBIO), Universidade Federal de Pelotas, *Campus Capão do Leão S/N Caixa Postal 354, CEP: 96010900 Phone:(53) 32757355 Pelotas/RS, Brazil*, Roberta_fs@yahoo.com.br, ggamaro@yahoo.com.br

²Programa de Pós Graduação em Nutrição e Alimentos (PPGNA), Universidade Federal de Pelotas

³ Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Lab. 37, Universidade Federal Rio Grande do Sul

⁴Laboratório de Estresse Oxidativo e Poluição Atmosférica, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Abstract

In large cities the main air pollutants are related to the traffic of motor vehicles and are composed of fine particulate material, affecting the health of the population. The exposure to pollutants can cause oxidative damage as well as being associated with cognitive and behavioral functions such as learning and memory in which the acetylcholinesterase (AChE) plays an important role in the central nervous system (CNS). The objectives of this study were verify the biochemical changes and the levels of AChE in rats exposed to air pollution in different structures of the central nervous system: Hippocampus, hypothalamus and cortex in Pelotas City and at the both campus Capão and Porto during the winter and the summer. Adult male Wistar rats were exposed to particulate material (2.5) in environmental level or filtered air for periods of 20 hours (4h/day) for 5 days. After exposure the animals were euthanized and dissected into three cortex structures, hippocampus and hypothalamus for analysis of the levels of acetylcholinesterase (AChE) and antioxidant enzymes catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GPx) it was also analyzed the production of free radicals and thiols by testing the dichlorofluorescein (DCF). The exposure to air pollution in the city of Pelotas showed high levels of AChE in winter both in the cortex as in the hypothalamus. Regarding to Oxidative Stress, an increase in the levels of antioxidant enzymes in winter and summer were highlighted.

Keywords: Atmospheric pollution. Acetylcholinesterase. Oxidative stress. Central nervous system, Fine particulate material

1.Introduction

The atmospheric pollution is a mixture composed by several components, including particulate material (PM, the particle components of air pollution), gases, and metals (Akimoto 2003). Exposure to environmental particulate material significantly increases morbidity and mortality in the general population. In urban areas of South Brazil, motor vehicle emissions are the main source of fine particulate material (PM_{2.5}) (Simkhovich 2011 and Miranda 2012).

Air pollution exhibition are linked to oxidative stress, neuroinflammation and neurodegeneration, and it has been associated with an increased risk in human health, and in particular harmful impact of high environment concentrations of fine particles (Calderón-Garcidueñas et al. 2013).

Consistent with human reports, recent animal studies reveal that exposure to diverse forms of air pollution by inhalation, such as urban PM (Ghelfi et al. 2008 and Rhoden 2004), results in a common pro-inflammatory response and oxidative stress in the brain (Morgan 2011 and Levesque 2011).

Reactive oxygen species (ROS) are believed to be involved in tissue damage resulting from a wide variety of insults. These substances can directly damage cellular proteins, DNA, and lipids, and thereby affect all cellular functions (Cochrane 1991). Indeed to neutralize the effects of reactive species, the cell uses antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) (Halliwell and Gutteridge, 2007). The brain is especially vulnerable to free radical-induced damage because of its high oxygen consumption, abundant lipid content and relative paucity of antioxidant enzymes (Halliwell and Gutteridge 2007; Olanow 1992), and oxidative injury has been proposed as an etiopathology of several CNS disorders (Bolaños et al. 1997; Noschang 2009).

Although ROS participate in normal physiological processes, when in abundance they may cause oxidative damage to biomolecules and cellular structures. In addition to the increase of the production of ROS, there is also a decrease in antioxidant defenses, a state of oxidative stress develops, which is involved in the pathogenesis of many diseases (Gutteridge 2000). The brain is especially vulnerable to free radicals and many studies have demonstrated their action on the hippocampus and prefrontal cortex (Vasconcellos 2006; Filipović 2011).

Garciduenas-Calderón et al. (2008) were able to demonstrate a relationship between the neuroinflammatory process caused by MP inhaling for children and adolescents, aged between 7 to 17, and a decrease in the size of the prefrontal cortex - structure linked to the learning process. Suglia et al. (2008) corroborated these findings when revealed the relation between inhalation of carbon particles resulting from

the vehicle fleet, and decline of cognitive functions determined through verbal intelligence, non-verbal, and memory tests.

Several studies have investigated inhibitors of acetylcholinesterase (AChE), a key enzyme involved in the cognitive function, and verified an improvement in global cognitive functioning (Ammon 1992) by increasing the neurotransmitter acetylcholine concentration at cholinergic synapses located throughout the brain (Stahl 2000 and Jaques et al. 2012).

Pelotas, the evaluated city, is located in the extreme south of Brazil, it is positioned on a coastal plain, the urban area is situated at low altitude, with an average of 7 meters above the sea level. Pelotas is the third most populous in the southern state of Rio Grande do Sul. Pelotas is located at 250 km from Porto Alegre, the capital of the state, and at 130 km from the Uruguay border. The city also hosts a significant agro industrial park and canning food, with production of more than 40 million cans of peaches a year, and it has the largest installed capacity cattle slaughtering statewide. Pelotas is also the largest benefactor of rice in Latin America, in addition to a significant fleet of vehicles, which, according to the National Traffic Department in 2011 increased by 29.9% over the past five years.

Considering that particles may cause damage to the CNS (Calderón-Garcidueñas et al. 2008, 2013; Zanchi et al. 2010) and the recent report that cognitive function may be affected by airborne pollutants (Suglia et al. 2008) were the main motivations of the present study.

2. Material and Methods

2.1 Points of Environmental Monitoring

2.1.1 Point Campus Porto (1) in the southern part of the city of Pelotas. Porto is located on the bank of São Gonçalo waterway, which connects the Patos and Mirim lagoons. It has three bonded warehouses, with 6000 m² of covered area for cargo storage, and a terminal for coal, with 5,000 sqm, besides a particular terminal. Porto is equipped with wharves for three berths with a total length of 500 m and a draft of 19 feet.

2.1.2 Point Campus Capão do Leão (2) located west of the city of Pelotas, with exits onto the road that gives access to the Rio Grande and to BR 116 where there is a large flow of cars and trucks.

Figure I shows the monitoring points at Campus Porto (1) and Campus Capão do Leão (2)

2.2 Animals

All animal procedures were approved by the Institutional Ethical Committee of the Universidade Federal de Pelotas (CEEAA 0656) and by the Brazilian Law on the use of animals (Federal Law 11.794/2008), and by the Brazilian Federation of Societies of Experimental Biology. All efforts were done to minimize animal suffering, as well as to reduce the number of animals needed for this study (Lanziotti et al. 1994).

Adult 2-month-old male Wistar rats from the Animal Facility of Universidade Federal de Pelotas (UFPel) were used. Animals were kept under 12-h light-dark periods and had free access to food and water before and during the exposure. Rats were exposed to environment particles (polluted group) or filtered air (control group) for periods of 20h (4h/day), during 5 days as described Pereira et al. 2007. The animals were allowed to move freely in the cage during the exposure and both groups were exposed and tested simultaneously. After the exposure, animals were killed by decapitation. This procedure was performed at Campus Porto (11/9 to 17/9) and at Campus Capão (9/8 to 27/8) in winter season in the year of 2012 and in summer in the year of 2013 (15/02 to 28/02 Campus Porto and 5/03 to 16/03 Campus Capão). The brain was collected and removed (prefrontal cortex, hypothalamus and hippocampus) and frozen at -70°C for further analysis.

2.3 Exposure chambers

Exposure chambers were made of glass (30 x 30 x 50 cm) and were hermetically closed, with the exception of one entrance (connected to the outdoor environment) and one exit. A vacuum pump was connected to the exit and pumped outdoor air through the exposure chambers at a flow rate of 10 L/min. Inhalation chambers were located at the two different Campus of UFPel, Campus Porto and Campus Capão. One of the chambers (designated as filtered air) was equipped with a 37-mm Teflon filter (Millipore, Carrigtwohill, Ireland) in the inlet, which prevented the admission of environmental particles, whereas the other received atmospheric air without the a filtering system (designated as Exposed). The temperature in the room and in the chamber was $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

2.4 Measurement of Particulate Material 2.5 micrometre (PM_{2.5})

For measurement of Particulate Material it was used the DustTrak equipment, Model 8520, TSI Incorporated, St. Paul, MN, USA, which is designed to separate the particulate material suspended in the air in categories: inhalable (with maximum aerodynamic diameter smaller than 10 µm) or thin (with maximum aerodynamic diameter less than 2.5 µm) measuring the concentration of particulates on a filter bed which has an infrared laser. In the case of this experiment, it was monitored portion of fine particulate material, corresponding to MP2.5. It was used a sampling period of 5 days for each of the monitoring points in the two seasons, winter and summer.

2.5 AChE Assay in Brain Structures

Brain structures hippocampus (HC), cerebral cortex (CX) and hypothalamus (HT) were separated and placed in a solution of 10 mM Tris - HCl, pH 7.4, on ice. Brain structures were homogenized in a glass potter in Tris - HCl solution. Aliquots of resulting brain structure homogenates were stored at – 80°C until utilization. Protein varied for each structure: HC (0.8 mg/mL), CX (0.7 mg/mL), and HT (0.6 mg/mL). The AChE enzymatic assay in brain regions was determined by a modification of the spectrophotometric method of Ellman et al. 1961 as previously described by Rocha et al. 1993. The reaction mixture (2 mL final volume) was composed of 50 mM K⁺-phosphate buffer, pH 7.5 and 1 mM of DTNB. The method is based on the formation of yellow anion, 4,4 - dithio-bis-acid-nitrobenzoic measured by absorbance at 412 nm for 2 min incubation at 25°C. The reaction was initiated by adding 0.8 mM acetylcholine iodide. All samples were run in duplicate or triplicate, and the enzyme activity was expressed in micromole AcSCh/h/mg of protein.

2.6 Biochemical analysis

For determination of antioxidant enzyme activities in the prefrontal cortex, hypothalamus and hippocampus, each brain structure was homogenized in 10 volume (w:v) ice-cold 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), containing 1 mM EDTA. The homogenate was centrifuged at 960 ×g for 10 min at 4 °C and the supernatant was analyzed.

2.6.1 Superoxide Dismutase Activity

Superoxide dismutase activity was determined using a RANSOD kit (Randox Labs., USA) which was based on the procedure described by Delmas-Beauvieux et al. (1995) This method employs xanthine and xanthine oxidase to generate superoxide radicals that react with 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenol)-5-phenyltetrazolium chloride to form a formazan dye that is assayed spectrophotometrically at 492 nm at 37°C. The inhibition in production of the chromogen is proportional to the activity of SOD present in the sample (Arcego 2013).

2.6.2 Catalase Activity

Catalase is an enzyme able to degrade peroxides, including hydrogen peroxide (H_2O_2), and its activity assessment is based upon establishing the rate of H_2O_2 degradation spectrophotometrically at 240 nm at 25°C (AEBI, 1984). CAT activity was calculated in terms of micromoles of H_2O_2 consumed per minute per mg of protein, using a molar extinction coefficient of 43.6 $M^{-1} cm^{-1}$ (Noschang 2009).

2.6.3 Glutathione Peroxidase Activity

Glutathione peroxidase activity was determined according to Wendel (1981), with modifications. The reaction was carried out at 37°C in 200 μ l of solution containing 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.7), 1.1 mM EDTA, 0.44 mM sodium azide, 0.5 mM NADPH, 2 mM glutathione and 0.4 U glutathione reductase. The activity of GPx was measured taking tert-butylhydroperoxide as the substrate at 340 nm. The contribution of spontaneous NADPH oxidation was always subtracted from the overall reaction ratio. GPx activity was expressed as pmol NADPH oxidized per minute per mg protein (Marcolin 2012).

2.6.4 Evaluation of Free Radical Production by the Chemical Oxidation of Dichlorodihydrofluorescein (DCFH)

The samples were incubated with 20, 70-dichlorodihydrofluorescein diacetate (100 μ M) at 37 °C for 30 min. DCFH was released by cellular esterases and oxidized by reactive oxygen/nitrogen species. The formation of the fluorescent derivative dichlorofluorescein (DCF) was monitored by excitation and emission wavelengths of 488 and 525 nm, respectively, using a spectrum photometer. The formation of oxidized reactive

oxygen/nitrogen species was quantified using a DCF standard curve and results were expressed as nmol of DCF formed per mg of protein (Arcego et al. 2013; Sriram et al. 1997)

2.6.5 Total thiol content

Total thiol content was determined spectrophotometrically based on the reduction of 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) by thiol groups, which become oxidized (disulfide), yielding a yellow compound (TNB), whose absorption is measured at 412 nm (Arcego et al. 2013 and Aksenov and Markesbery 2001).

2.6.6 Protein Assay

The total protein concentrations were determined using the method described by Lowry et al. (1951) with bovine serum albumin as the standard (Krolow 2013)

2.6.7 Statistical analysis

Data were presented as mean $\pm$ standard error of the mean (SEM), as indicated in the figure legends. A two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni post hoc test was used. Analyses were performed using Prism Graph 6.0 software (Graph-Pad Software, San Diego, CA). A statistically significance level was achieved when $P \leq 0.05$.

3. Results and Discussions

Several authors have evaluated only PM_{10} concentrations, estimates of $PM_{2.5}$ concentrations being based on the knowledge that $MP_{2.5}$ typically accounts for 60% of the MP_{10} mass. In 2006, the annual mean MP_{10} concentration was $20 \mu\text{g}/\text{m}^3$ and was therefore (assuming again that $MP_{2.5}$ accounts for 60% of MP_{10}) estimated to be $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ annual mean and 24-hour mean $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ for $PM_{2.5}$ (WHO 2006).

The results of $MP_{2.5}$ at Capão do Leão and Porto points in the winter and summer seasons of the years 2012- 2013 are presented in Table I.

The analysis of particulate material $2.5 (\mu\text{g}/\text{m}^3)$ during the winter sampling show that the hugest concentration occurred in Capão do Leão and Porto above the maximum established by World Health Organization (WHO). Capão do Leão is poorly populated, but close to a highway. Near the biggest

University Campus and Porto possibly due to the storage of rice production. The points during summer season do not exceed the values recommended by WHO.

The results of Acetylcholinesterase levels cerebral cortex (A, B), hippocampus (C, D) and hypothalamus (E, F) in animals exposed to atmospheric pollution and filtered air in Capão do Leão and Porto in the winter and summer seasons are presented in Figure II.

The levels of acetylcholinesterase in the cortex of animals exposed and not exposed to air pollution in winter (A) at the two different points, Campus Capão do Leão and Campus Porto, did not differ between groups [two-way ANOVA, $F(1,16) = 2.09$, followed by Bonferroni $P = 0.16$]. Although there was difference between the exposure sites [two-way ANOVA, $F(1, 16) = 5.48$, followed by Bonferroni $P = 0.03$]. Assuming that AChE is an enzyme marker of neurotoxicity.

In summer season (B) there was no significant difference between groups and between local exposure [two-way ANOVA, $F(1,16) = 0.92$, followed by Bonferroni $P = 0.35$]. By analyzing the hippocampus there was no significant difference between groups in both evaluated points (winter and summer) (C, D) [two-way ANOVA followed by Bonferroni $P > 0.05$]. The levels of acetylcholinesterase in the hypothalamus showed similar behavior to those obtained in the cortex in the winter with no change in the summer (E, F). In the winter observed higher levels of AChE in Porto corroborating the results of $MP_{2.5}$ despite being lower than the $MP_{2.5}$ values in winter in Capão do Leão, exceeded the limits recommended by OMS.

The importance of the cholinergic system in learning and memory processes is undeniable, and thus, alteration to AChE activity, as well as in the acetylcholine neurotransmitter levels, is neurochemically associated with cognitive deficits. Jaques et al. (2012) found increased AChE activity in the blood and in all cerebral structures of the smoke-exposed groups.

Central nervous system (CNS) is a potential target to oxidative damage since it has high energy consumption and high cellular content of lipids and proteins with low levels of endogenous antioxidants, such as catalase and superoxide dismutase. Zanchi et al (2010) reported, at the first time, CNS (striatum and cerebellum) lipid peroxidation, as well as, a decrease of motor activity in rats exposed to intranasal instillation of residual oil fly ash (ROFA). Moreover, the same groups of authors have also detected lipid peroxidation in hippocampus of rats exposed chronically to PM nasal instillation. These findings are in

agreement with the idea that nano size particles which are able to cross the blood brain barrier and physically enter the CNS of animals.

The result of antioxidant enzyme activities, total thiol and free radicals (DCFH test) production in cerebral cortex of animals exposed to atmospheric pollution and filtered air in Capão do Leão and Porto in winter and summer seasons are presented in Table II.

There was no significant difference [two-way ANOVA, $F(1,16) = 1.19$, followed by Bonferroni $P = 0.29$] in the levels of catalase in the structure of the cortex in animals exposed in comparison to those unexposed in winter on both evaluated points. However in the summer it was only found difference between the exposure points [two-way ANOVA, $F(1, 16) = 5.73$, followed by Bonferroni $P = 0.02$].

At both Campus, Capão do Leão and Porto there was no difference in the activity of superoxide dismutase in both seasons similar between groups exposed to pollution [Two-way ANOVA followed by Bonferroni $P > 0.05$].

The results in Capão do Leão and Porto points and the exposed and unexposed groups in campus Capão do Leão were not significant in winter [two-way ANOVA, $F(1,16) = 0.39$, followed by Bonferroni $P = 0.53$]. However, in the summer the points were significant [two-way ANOVA, $F(1,16) = 36.40$, followed by Bonferroni $P = 0.0001$] for glutathione peroxidase activity, as well as those groups [two-way ANOVA, $F(1, 16) = 11.97$, followed by Bonferroni $P = 0.003$].

In the winter season there was no significant difference between the groups [two-way ANOVA, $F(1,16) = 3.30$, followed by Bonferroni $P = 0.08$] and between the exposure locals [two-way ANOVA, $F(1, 16) = 0.09$, followed by Bonferroni $P = 0.77$]. Nevertheless, in the summer the locals and groups were significant [two-way ANOVA, $F(1,16) = 12.45$, followed by Bonferroni $P = 0.002$] with dichlorofluorescein in the cortex.

Capão do Leão and Porto points were significant [two-way ANOVA, $F(1,16) = 14.65$, followed by Bonferroni $P = 0.0015$] although the groups did not differ in winter [two-way ANOVA, $F(1,16) = 0.46$, followed by Bonferroni $P = 0.50$]. Similar results were found in the summer where local differ [two-way ANOVA, $F(1,16) = 7.12$, followed by Bonferroni $P = 0.016$] but the groups were not significant for the production of thiols [two-way ANOVA, $F(1, 16) = 0.02$, followed by Bonferroni $P = 0.88$].

The oxidative index demonstrated by Zanchi (2010) an excess of cortical exposed groups catalase concentration to detoxified H_2O_2 . As consequence of the higher concentration of H_2O_2 from cellular metabolism, there was an increase in tGSH because of higher activity of GPx.

Calderón-Garcidueñas et al. (2013) observed the oxidative damage to frontal cortex in this young urbanite cohort poses a significant cause for concern in terms of developmental and cognitive effect.

The result of antioxidant enzyme activities, total thiol and free radicals (DCFH test) production in hippocampus of animals exposed and filtered air to atmospheric pollution in Capão and Porto in the winter and summer seasons are presented in Table III.

In the winter the points Capão do Leão and Porto were significant for catalase activity in the hippocampus [two-way ANOVA, $F(1,15) = 4.69$, followed by Bonferroni $P = 0.04$] but did not differ from exposed and unexposed groups [two -way ANOVA, $F(1,15) = 2.01$, followed by Bonferroni $P = 0.17$]. Unlike the summer where both points and groups results were not significant [two-way ANOVA, $F(1,15) = 0.06$, followed by Bonferroni $P = 0.80$].

Results in both sites Capão do Leão and Porto were significant in winter [two-way ANOVA, $F(1,16) = 8.17$, followed by Bonferroni $P = 0.01$] as well as in the summer [two-way ANOVA, $F(1,16) = 15.47$, followed by Bonferroni $P = 0.001$] for the activity of superoxide dismutase. The results also coincided for the groups exposed and not exposed to pollution no difference in winter and summer seasons [two-way ANOVA, $F(1,16) = 1.62$, followed by Bonferroni $P > 0.05$].

Capão do Leão and Porto points were significant in winter for the activity of glutathione peroxidase [two-way ANOVA, $F(1,16) = 11.05$, followed by Bonferroni $P = 0.004$], however the groups did not differ [two-way ANOVA, $F(1,16) = 0.01$, followed by Bonferroni $P = 0.92$]. In the summer season both in the groups as in the points were not significant [two-way ANOVA, $F(1,16) = 1.57$ followed by Bonferroni $P = 0.22$] for the activity of glutathione peroxidase.

There was no difference between the groups and also in points in both winter seasons [two-way ANOVA, $F(1,16) = 0.67$, followed by Bonferroni $P = 0.42$] and summer [two-way ANOVA, $F(1,16) = 1.49$, followed by Bonferroni $P = 0.23$] with dichlorofluorescein in the hippocampus.

In winter the points and groups were not significant [two-way ANOVA, $F(1,16) = 4.21$, followed by Bonferroni $P = 0.056$]. It was analyzed significant spots in Capão do Leão and in Porto [two-way ANOVA, $F(1,16) = 35.88$, followed by Bonferroni $P = 0.0001$] for the production of thiols, however the groups did not differ [two-way ANOVA, $F(1,16) = 0.10$ followed by Bonferroni $P = 0.75$].

Zanchi et al (2008) described some support to the concept that exposure to ambient particles may induce changes in cognition base on the finding of oxidative damage to hippocampus was detected after instillation of particles during a relatively short period of time.

The result of antioxidant enzyme activities, total thiol and free radicals (DCFH test) production in hypothalamus of animals exposed to atmospheric pollution and filtered air in Capão and Porto in the winter and summer seasons are presented in Table IV.

By analyzing the activity of superoxide dismutase in the hypothalamus Porto and Capão do Leão points differed in winter [two-way ANOVA, $F(1,12) = 6.25$, followed by Bonferroni $P = 0.02$], however the groups were not significant [two-way ANOVA, $F(1,12) = 4.31$, followed by Bonferroni $P = 0.06$]. In the summer season as both groups did not differ in points [two-way ANOVA, $F(1, 14) = 0.37$, followed by Bonferroni $P = 0.55$].

In the winter season, Porto and Capão do Leão points were significant [two-way ANOVA, $F(1,12) = 6.94$, followed by Bonferroni $P = 0.02$] glutathione peroxidase activity although the groups did not differ [two-way ANOVA, $F(1,12) = 0.46$, followed by Bonferroni $P = 0.51$]. In summer the results in both places and groups were not significant [two-way ANOVA, $F(1, 16) = 3.97$, followed by Bonferroni $P = 0.06$].

In winter the points and groups were not significant with dichlorofluorescein in the hypothalamus [Two-way ANOVA, $F(1, 12) = 1.75$, followed by Bonferroni $P = 0.21$]. However in the summer season the points differed with dichlorofluorescein [two-way ANOVA, $F(1,16) = 7.38$, followed by Bonferroni $P = 0.01$] unlike the groups in which they were not significant [two-way ANOVA, $F(1,16) = 1.43$, followed by Bonferroni $P = 0.24$].

The results for the production of thiols in the hypothalamus in Porto and Capão do Leão points differ in winter [two-way ANOVA, $F(1,9) = 6.54$, followed by Bonferroni $P = 0.03$], but the groups were not significant [two-way ANOVA, $F(1,9) = 1.03$ followed by Bonferroni $P = 0.33$]. In summer the points were also significant [two-way ANOVA, $F(1, 12) = 7.67$, followed by Bonferroni $P = 0.01$] as well as the exposed and unexposed groups [two-way ANOVA, $F(1,12) = 9.03$, followed by Bonferroni $P = 0.01$].

4. Conclusion

Acute exposure to air pollution in the city of Pelotas showed high levels of acetylcholinesterase in the winter, there was a significant difference in the levels of AChE activity in the cortex of animals exposed and filtered air to air pollution in relation to the two different sites: Campus Capão do Leão and Porto. Higher levels of enzyme were found in Capão do Leão campus. Acetylcholinesterase levels in the hypothalamus showed similar results to those obtained in the cortex in winter performance; however an increase in the levels of the enzyme were observed in campus Porto. According to high levels PM_{2.5} in winter of two points. The humans and animals utilize an antioxidant defense system to neutralize the biological oxidative damage and protect the organs by scavenging the ROS. This system is composed of the enzymes CAT, SOD and GPx. Our results demonstrated that oxidative stress highlighted an adaptation in relation to the levels of antioxidant enzymes since it was observed production of thiols in winter and summer.

Acknowledgement: Financial support for this study was provided by the “Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Edital 14/2009 and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior for scholarship. We also would like to thank the Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Lab. 37, Universidade Federal Rio Grande do Sul – RS- Brasil

References

- Aebi H (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105:121–126. doi:10.1016/S0076-6879(84)05016-3
- Akimoto H (2003) Global air quality and pollution. *Science* 302:1716-1719.
- Aksenov MY, Markesbery WR (2001) Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 302 (2–3), pp. 141–145
- Ammon HP, Anazodo MI, Safayhi H, Dhawan BN, Srimal RC (1992) Curcumin: a potent inhibitor of leukotriene B₄ formation in rat peritoneal polymorphonuclear neutrophils (PMNL). *Planta Med* 58:226.
- Arcego D, Krolow R, Lampert C, Noschang C, Pettenuzzo L, Marcolin M, Toniazzi A, Dalmaz C (2013) Stress During the Pre-pubertal Period Leads to Long-Term Diet-Dependent Changes in Anxiety-Like Behavior and in Oxidative Stress Parameters in Male Adult Rats. *Neurochem Res* 38:1791–1800 DOI 10.1007/s11064-013-1083-3
- Bolaños JP, Almeida A, Stewart V. et al. (1997) Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 68: 2227–2240
- Calderón-Garcidueñas L, Solt AC, Henriquez-Roldán C, Torres-Jardón R, Nuse B, Herritt L, Villarreal-Calderón R, Osnaya N, Stone I, García R, Brooks DM, González-Maciel A, Reynoso-Robles R, Delgado-Chávez R, Reed W (2008) Long-term air pollution exposure is associated with neuroinflammation, an altered innate immune response, disruption of the blood-brain barrier, ultrafine particulate deposition, and accumulation of amyloid beta-42 and alpha-synuclein in children and young adults. *Toxicol. Pathol.* 36(2):289-310

- Calderón-Garcidueñas L, Serrano-Sierra A, Torres-Jardón R, Zhu H, Yuan Y, Smith D, Delgado-Chávez R, Cross J, Medina-Cortina H, Kavanaugh M, Guilarte T (2013) The impact of environmental metals in young urbanites' brains. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 65, 503– 511
- Cochrane CG (1991) Mechanisms of oxidant injury of cells. *Mol Aspects Med* 12:137–147. doi:10.1016/0098-2997(91)90009-B
- Delmas-Beauvieux MC, Peuchant E, Dumon MF et al. (1995) Relationship between red blood cell antioxidant enzymatic system status and lipoperoxidation during the acute phase of malaria. *Clin Biochem* 28:163–169. doi:10.1016/0009-9120(94)00071-3
- Ellman GL, Courtney DK, Andres V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 7, 88–95.
- Filipović D, Zlatković J, Inta D, Bjelobaba I, Stojiljkovic M, Gass P (2011) Chronic isolation stress predisposes the frontal cortex but not the hippocampus to the potentially detrimental release of cytochrome c from mitochondria and the activation of caspase-3. *J Neurosci Res*. 89(9):1461–70.
- Ghelfi E, Rhoden CR, Wellenius GA, Lawrence J, Gonzalez-Flecha B (2008) Cardiac Oxidative Stress and Electrophysiological Changes in Rats Exposed to Concentrated Ambient Particles are Mediated by TRP-Dependent Pulmonary Reflexes. *Toxicological Sciences* 102(2), 328–336 doi:10.1093/toxsci/kfn005
- Gutteridge JMC, Halliwell B (2000) Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. *Ann N Y. Acad Sci.* 899:136–47.
- Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) Free radicals in biology and medicine, 4a edn. Oxford University Press, Oxford
- Jaques JAS, Rezer JFP, Carvalho FB, Rosa MM, Gutierrez JM, Gonçalves JF, Schmatz R, Bairros AV, Mazzanti CM, Rubin MA, Schetinger, MRC, Leal DBR (2012) Curcumin protects against cigarette smoke-induced cognitive impairment and increased acetylcholinesterase activity in rats. *Physiology & Behavior*. 106, 664–669
- Krolow R, Noschang C, Arcego D., Huffell AP, Marcolin ML, Benitz, NA, Lampert, C, Fitarelli, RD, Dalmaz C (2013) Sex-specific effects of isolation stress and consumption of palatable diet during the prepubertal period on metabolic parameters. *Metabolism Clinical And Experimental*. 62 (2013) 1268 – 1278
- Lanziotti VMN, Barros HMT, Tannhauser SL, Tannhauser M (1994) *Rev. Pesq. Med.* 28:26-30
- Levesque S, Surace M J, McDonald J, Block ML (2011) Air pollution & the brain: Subchronic diesel exhaust exposure causes neuroinflammation and elevates early markers of neurodegenerative disease. *Journal of Neuroinflammation*. Vol.8, p.105
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL et al. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265–275
- Marcolin ML, Benitz AND, Arcego DM, Noschang C, Krolow R, Dalmaz C (2012) Effects of early life interventions and palatable diet on anxiety and on oxidative stress in young rats. *Physiology & Behavior*. 106, 491–498
- Miranda RM, Andrade MF, Fornaro A, Astolfo R, Andre PA, Saldiva P (2012) Urban air pollution: a representative survey of PM_{2.5} mass concentrations in six Brazilian cities. *Air Qual Atmos Health*. 5:63–77 DOI 10.1007/s11869-010-0124-1
- Morgan TE, Davis DA, Iwata N, Tanner JA, Snyder D, Ning Z, Kam W, Hsu YT, Winkler JW, Chen JC, Petasis NA, Baudry M, Sioutas C, Finch CE (2011) Glutamatergic Neurons in Rodent Models Respond to Nanoscale Particulate Urban Air Pollutants In Vivo and In Vitro. *Environmental Health Perspectives*. Vol.119(7)

- Noschang CG, Krolow R, Pettenuzzo LF, Ávila MC, Fachin A, Arcego D, Toigo E, Crema L, Diehl L A, Vendite D, Dalmaz C (2009) Interactions Between Chronic Stress and Chronic Consumption of Caffeine on the Enzymatic Antioxidant System. *Neurochem Res.*34:1568–1574. DOI 10.1007/s11064-009-9945-4
- Olanow CW (1992) An introduction to the free radical hypothesis in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 32(Suppl):S2–S9. doi:10.1002/ana.410320703
- Pereira CEL, Heck TG, Saldiva PHN, Rhoden CR (2007) *Braz J Med Biol Res.* 40:1353-1359
- Rhoden CR, Lawrence J, Godleski JJ, GONZALEZ-FLECHA B (2004) N-Acetylcysteine Prevents Lung Inflammation After Short-Term Inhalation Exposure to Concentrated Ambient Particles. *Toxicological Sciences.* 79, 296–303 DOI: 10.1093/toxsci/kfh122
- Rocha JBT, Emanuelli T, Pereira ME (1993) Effects of early undernutrition on kinetic parameters of brain acetylcholinesterase from adult rats. *Acta Neurobiol. Exp.* 53 431–437.
- Simkhovich B Z, Kleinman MT, Mehrian-Shai R, Hsu Y, Meacher D, Gookin G, Kinnon MM, Salazar K, Willet P, Feng G, Lin SM, Kloner RA (2011) Chronic exposure to ambient particulate matter alters cardiac gene expression patterns and markers of oxidative stress in rats. *Air Qual Atmos Health.* 4:15–25 DOI 10.1007/s11869-010-0089-0
- Sriram, K.; Pai, K.S.; Boyd, M.R.; Ravindranath, V. (1997) Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: in vitro and in vivo studies in mice. *Brain Res* 749(1):44–52
- Stahl SM (2000) The new cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease, Part 2: illustrating their mechanisms of action. *J Clin Psychiatry.* 61:813–4.
- Suglia SF, Gryparis A, Wright RO, Schwartz J, Wright R.J (2008) Association of black carbon with cognition among children in a prospective cohort study. *Am. J. Epidemiol.* 167:280-286.
- Vasconcellos AP, Nieto FB, Crema LM, Diehl LA, Almeida LM, Prediger ME, et al. (2006) Chronic lithium treatment has antioxidant properties but does not prevent oxidative damage induced by chronic variate stress. *Neurochem Res.* 31(9):1141-51.
- Wendel A (1981) Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 77:325–333. doi:10.1016/S0076-6879(81)77046-0
- WHO—World Health Organization (2006) Air quality guidelines, global update 2005: particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulphur dioxide. Germany; chap. 10:217–305
- Zanchi AC, Venturini C, Saiki M, Saldiva PHN, Barros HMT, Rhoden CR (2008) Chronic nasal Instillation of Residual-Oil Fly Ash (ROFA) induces brain lipid peroxidation and behavioral changes in rats. *Inh. Toxicol.* 20:795-800.
- Zanchi AC, Fagundes LS, Barbosa F JR, Bernardi R, Rhoden CR, Saldiva PH, Do Valle C (2010) Pre and post-natal exposure to ambient level of air pollution impairs memory of rats: the role of oxidative stress. *Inhal Toxicol.* 22:910-8.

Legends

Table I Mean $\pm$ Standard Errors concentrations of MP_{2.5} at two points in the winter and summer seasons ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)

Table II Antioxidant enzyme activities, total thiol and free radicals (DCFH test) production in cerebral cortex of animals exposed (E) to atmospheric pollution and filtered air (FA) in Capão and Porto in winter and summer seasons.

Table III Antioxidant enzyme activities, total thiol and free radicals (DCFH test) production in hippocampus ex of animals exposed (E) to atmospheric pollution and filtered air (FA) in Capão and Porto in the winter and summer seasons

Table IV Antioxidant enzyme activities, total thiol and free radicals (DCFH test) production in hypothalamus ex of animals exposed (E) to atmospheric pollution and filtered air (FA) in Capão and Porto in the winter and summer seasons

Fig. I Sampling locations in the campus area of the University Federal of Pelotas

Fig.II Acetylcholinesterase levels expressed in micromole AcSCh/h/mg of protein in different structures of nervous central system in animals Exposed to atmospheric pollution and Filtered air in Capão and Porto: A) cerebral cortex in winter; B) cerebral cortex in summer. C) hippocampus in winter; D) hippocampus in summer. E) hypothalamus in winter; F) hypothalamus in summer. Data expressed by means $\pm$ SEM (N = 10/group).



Figure I

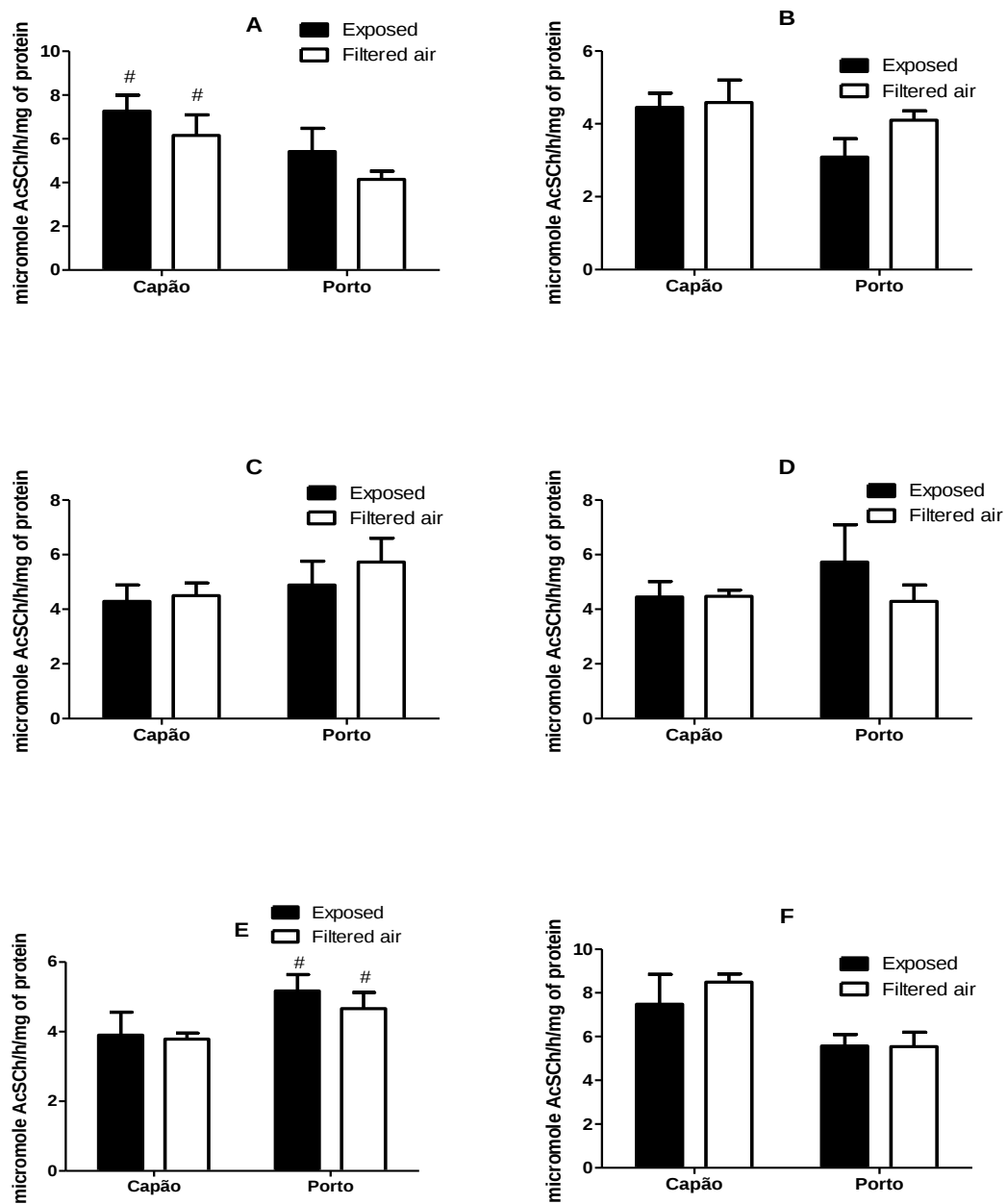


Figure II

Table I

Points	Winter	Summer
Capão do Leão	40.75 ± 4.61	12.91 ± 0.96
Porto	28.66 ± 0.60	17.16 ± 0.66

Table II

	Winter				Summer			
	Capão		Porto		Capão		Porto	
	E	FA	E	FA	E	FA	E	FA
CAT	1.6±0.2	1.4±0.2	1.7±0.2	2.0±0.2	1.5±0.2	1.5±0.1	1.7±0.3*	2.5±0.2*
SOD	4.4±0.3	4.1±0.3	8.0±1.1	7.9±0.9	4.6±0.6	5.4±0.2	10.4±2.0	17.7±3.0
GPX	0.09±0.1	0.12±0.1	0.13±0.01	0.14±0.02	0.12±0.1	0.14±0.01	0.2±0.03*	0.3±0.01*
DCFH	3.2±0.09	3.0±0.6	3.8±0.2	3.7±0.2	1.6±0.06	4.8±0.7*	3.6±0.2*	3.6±0.4*
THIOL	36.6±1.2	39.9±2.0	54.4±5.1*	57.4±7.3*	30.3±1.2	34.8±1.1	62.6±11.2*	61.3±18.8*

Data are expressed as mean ± SEM. N = 5/group. *There is significative difference between places of exposition [two way ANOVA P < 0,005 post hoc Bonferroni P < 0,005]. SOD (expressed as U/mg protein), CAT (expressed as micromoles of H₂O₂ consumed/ min/mg protein), GPx (expressed as nmol NADPH oxidized/min/mg protein), Total Thiol (expressed as nmol TNB/mg protein) and DCFH (expressed as nmol of DCF formed/mg protein)

Table III

	Winter				Summer			
	Capão		Porto		Capão		Porto	
	E	FA	E	FA	E	FA	E	FA
CAT	1.6±0.1*	2.0±0.06*	1.2±0.1	1.4±0.4	1.4±0.06	1.6±0.3	1.4±0.1	1.7±0.09
SOD	11.9±0.7*	9.4±0.6*	7.9±0.2	8.0±0.3	16.6±2.4*	13.8±2.1*	8.5±0.3	8.7±0.5
GPX	0.1±0.07*	0.09±0.01*	0.07±0.04	0.06±0.01	0.08±0.01	0.1±0.01	0.13±0.04	0.1±0.01
DCFH	1.9±0.04	18.0±0.09	1.8±0.1	1.8±0.1	2.4±0.1	2.6±0.2	3.0±0.4	2.3±0.5
THIOL	65.1±2.1	68.3±2.3	74.6±2.7	67.9±2.1	40.6±1.5	44.4±1.2	81.8±10*	74.2±5.9*

Data are expressed as mean ± SEM. N = 5/group. *There is significative difference between places of exposition two way ANOVA $P < 0,005$ post hoc Bonferroni $P < 0,005$). SOD (expressed as U/mg protein), CAT (expressed as micromoles of H_2O_2 consumed/ min/mg protein), GPx (expressed as nmol NADPH oxidized/min/mg protein), Total Thiol (expressed as nmol TNB/mg protein) and DCFH (expressed as nmol of DCF formed/mg protein)

Table IV

	Winter				Summer			
	Capão		Porto		Capão		Porto	
	E	FA	E	FA	E	FA	E	FA
CAT	3.8±0.7	3.6±0.1	4.2±0.1	2.8±0.5	4.4±0.3*	4.0±0.6*	2.6±0.4	2.1±0.4
SOD	21.4±1.7	16.8±0.8	32.2±2.1*	22.8±4.7*	19.6±1.2	18.7±3.5	14.1±2.1	16.1±1.4
GPX	0.13±0.01*	0.13±0.08*	0.11±0.01	0.10±0.08	0.14±0.01	0.13±0.01	0.09±0.03	0.15±0.02
DCFH	3.8 ±1.3	2.3±0.1	2.9±0.06*	3.5±0.6*	2.9±0.1	3.3±0.6	3.9±0.2	4.5±0.3
THIOL	74.8±11.9	63.3±4.6	86.9±3.6*	85.0±7.1*	81.5±2.4	67.7±2.6	83.6±3.7*	80.9±1.9

Data are expressed as mean ± SEM. N = 5/group. *There is significative difference between places of exposition two way ANOVA P < 0,005 post hoc Bonferroni P < 0,005). SOD (expressed as U/mg protein), CAT (expressed as micromoles of H₂O₂ consumed/ min/mg protein), GPx (expressed as nmol NADPH oxidized/min/mg protein), Total Thiol (expressed as nmol TNB/mg protein) and DCFH (expressed as nmol of DCF formed/mg protein)

5 CONCLUSÕES

Monitoramento dos níveis de material particulado (MP_{2.5}) e dióxido de nitrogênio (NO₂)

- Podemos notar que os diferentes locais estudados não seguem um padrão e existem diferenças significativas nos níveis de poluição dentro de uma mesma cidade.
- O ponto 1 localizado ao sul da cidade apresentou maiores concentrações de MP_{2.5} nas estações do verão, outono e inverno no entanto o ponto 5 localizado ao sudoeste apresentou menores concentrações de MP_{2.5} em todas as estações. Entretanto o ponto 3 situado na zona central da cidade obteve maiores concentrações de NO₂ em todas as estações contudo o ponto 8 localizado na parte nordeste atingiram menores concentrações de NO₂ no verão, outono e inverno.
- Os resultados obtidos neste estudo indicam que a cidade de Pelotas como um todo tem potencial para episódios críticos da qualidade do ar, sobretudo no período de inverno em todos os pontos.
- Os resultados também mostram a importância da implementação de programas voltados para o controle das emissões.

Parâmetros bioquímicos da exposição aguda à poluição atmosférica

- No inverno houve diferença significativa nos níveis de acetilcolinesterase (AChE) no córtex de animais expostos e não expostos à poluição atmosférica em relação aos dois diferentes locais de exposição. Foram encontrados maiores níveis da enzima no Campus Capão do Leão.
- Os níveis de AChE no hipotálamo apresentaram comportamento similar aos obtidos no córtex no inverno, porém um aumento nos níveis da enzima foi observado no Campus Porto.
- Os resultados obtidos tanto no córtex como no hipotálamo foram de elevados níveis de AChE no inverno corroborando aos altos níveis de MP_{2.5} em ambos os locais.
- No córtex houve diferença significativa nos níveis de catalase, glutational peroxidase no verão entre os pontos de exposição no ponto Porto houve um aumento nos níveis das enzimas. Do mesmo modo, os níveis de DCFH no córtex

foram maiores no Campus Porto. A produção de Tióis foi aumentada no Porto nas duas estações do ano avaliadas.

- No entanto no hipocampo ambos os grupos expostos e não expostos do Capão do Leão apresentaram maiores atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutathione peroxidase no inverno. Entretanto no verão os níveis de superóxido dismutase foram maiores nos animais expostos e não expostos à poluição no Campus Capão do Leão. Os níveis de tióis totais no verão foram maiores para o Campus Porto.

- No hipotálamo os grupos expostos e não expostos à poluição do Campus Capão do Leão apresentaram maior atividade da enzima glutathione peroxidase no inverno. O Campus Porto alcançou maiores níveis da atividade de superóxido dismutase, também os níveis de DCFH além da produção de Tióis foram aumentados no inverno. No verão ambos os grupos expostos e não expostos do Capão do Leão apresentaram maiores níveis da catalase. No verão os animais expostos à poluição do Campus do Porto apresentaram maiores níveis de tióis.

- Os resultados do Estresse Oxidativo podem sugerir uma adaptação em relação aos níveis das enzimas antioxidantes uma vez que observamos no inverno e verão produção de tióis. O efeito da exposição à poluição atmosférica na cidade de Pelotas sofre influência do local avaliado bem como a estação do ano.

Referências Bibliográficas

- ANALITIS, A.; KATSOUYANNI, K.; DIMAKOPOULOU, K.; SAMOLI, E.; NIKOLOULOPOULOS, A.K.; ARISTIDIS, K.; PETASAKIS, Y.; TOULOUMI, G.; SCHWARTZ, J.; ANDERSON, H.R.; CAMBRA, K.; FORASTIERE, F.; ZMIROU, D.; VONK, J.M.; CLANCY, L.; KRIZ, B.; BOBVOS, J.; PEKKANEN, J. Short-term effects of ambient particles on cardiovascular and respiratory mortality. **Epidemiology**. 17:230-3. 2006.
- ANDRADE, M.F.; MIRANDA, R.M.; FORNARO, A.; KERR, A.; OYAMA, B.; ANDRE, P.A.; SALDIVA, P. Vehicle emissions and PM_{2.5} mass concentrations in six Brazilian cities. **Air Qual Atmos Health** 5:79–88. 2012.
- ANWAR, J., SPANEVELLO R.M THOMÉ, G., STEFANELLO, N. SCHMATZ, R. GUTIERRES, J., VIEIRA, J., BALDISSARELLI, J. CARVALHO, F.B, ROSA, M., RUBIN, M.A, FIORENZA, MORSCH, V.M., SCHETINGER, M.R.C. Effects of caffeic acid on behavioral parameters and on the activity of acetylcholinesterase in different tissues from adult rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior** 103 386–394. 2012.
- ARCEGO, D.M.; NOSCHANG, C.; KROLOW, R.; FITARELLI, L.D.; LAUREANO, D.; HUFFELL, A.P.; FONTELLA, F.U.; DALMAZ, C. Early life interventions: prepuberty stress alters oxidative parameters in distinct CNS structures in adult female rats. **J. Med. Med. Sci.** 2:741-9. 2011.
- ARCEGO, D.; KROLOW, R.; LAMPERT, C.; NOSCHANG, C.; PETTENUZZO, L.; MARCOLIN, M.; TONIAZZO, A.; DALMAZ, C. Stress During the Pre-pubertal Period Leads to Long-Term Diet-Dependent Changes in Anxiety-Like Behavior and in Oxidative Stress Parameters in Male Adult Rats. **Neurochem Res**. 38:1791–1800. 2013.
- BAIRD, C. **Química Ambiental**, 2ª ed. Porto Alegre: Bookman, 622p. 2002.
- BASCOM, R.; BROMBERG, P.A.; COSTA, D.A.; DEVLIN, R.; DOCKERY, D.W.; FRAMPTON, M.W.; LAMBERT, W.; SAMET, J.M.; SPEIZER, F.E.; UTELL, M. State Of The Art. Health Effects Of Outdoor Pollution. **Am. J. Respir. Crit. Care Med**. 153(1):3-50. 1996.
- BERGAMASCHI, C.; RIZZIO, E.; GIAVERI, G.; LOPPI, S.; GALLORINI, M. Comparison between the accumulation capacity of four lichen species transplanted to a urban site. **Environmental Pollution**. 148: 468-476. 2007.
- BERGER, A.; ZAREBA, W.; SCHNEIDER, A.; RUCKERL, R.; IBALD-MULLI, A.; CYRYS, J.; WICHMANN, H. E.; PETERS, A. Runs of ventricular and supraventricular tachycardia triggered by air pollution in patients with coronary heart disease. **J. Occup. Environ. Med**. 48, 1149–1158. 2006.

BIERMANN, T.; STILIANAKIS, N.; BLEICH, S.; THÜRAUF, N.; KORNHUBER, J.; REULBACH, U. The hypothesis of an impact of ozone on the occurrence of completed and attempted suicides. **Med. Hypotheses**, 72, 338-341. 2009.

BLOCK, M.L.; ZECCA, L.; HONG, J.S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. **Nat Rev Neurosci**. 8:57-69. 2007.

BLOCK, M.L.; CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, L. Air pollution: mechanisms of neuroinflammation and CNS disease. **Trends Neurosc**. 32, 506-516. 2009.

BHATNAGAR A. Cardiovascular pathophysiology of environmental pollutants. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 286:479-85. 2004

BROOK, R.D. Air Pollution and Cardiovascular Disease: A Statement for Healthcare Professionals From the Expert Panel on Population and Prevention Science of the American Heart Association. **Circulation**, v.109, p.2655-2671. 2004.

BROOK, R.D.; RAJAGOPALAN, S.; POPE, C.A. III. Particulate matter air pollution and cardiovascular disease: an update to the scientific statement from the American Heart Association. **Circulation**. 121:2331–2378. 2010.

BRUNEKREEF, B.; HOLGATE, S.T. Air pollution and health. **Lancet**. 360(9341):1233-42. 2002.

BURNETT, R.T.; DEWANJI, A.; DOMINICI, F.; GOLDBERG, M.S.; COHEN, A.; KREWSKI, D. On the Relationship between Time-Series Studies, Dynamic Population Studies, and Estimating Loss of Life Due to Short-Term Exposure to Environmental Risks. **Environ Health Perspect**. 111(9):1170-4. 2003.

CANÇADO, J.E.D.; BRAGA, A.; PEREIRA, L.A.A.; ARBEX, M.A.; SALDIVA, P.H.N.; SANTOS, U.P. Repercussões clínicas da exposição à poluição atmosférica. **J Bras Pneumol**.32:S5-S11. 2006.

CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, L.; AZZARELLI, B.; ACUNA, H.; GARCIA, R.; GAMBLING, T.M.; OSNAYA, N.; MONROY, S.M.R.; CARSON, J.L.; VILLARREAL-CALDERON, A.; REWCASTLE, B. Air pollution and brain damage. **Toxicol Pathol**. 30, 373–389. 2002.

CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, L.; REED, W.; MARONPOT, R.R.; HENRIQUEZ-ROLDAN, C.; DELGADO-CHAVEZ, R.; CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, A.; DRAGUSTINOVIS, I.; FRANCO-LIRA, M.; ARAGON-FLORES, M.; SOLT, A.C.; ALTENBURG, M.; TORRES-JARDON, R.; SWENBERG, J.A. Brain inflammation and Alzheimer's like pathology in individuals exposed to severe air pollution. **Toxicol Pathol**. 32, 650–658. 2004.

CALDERON-GARCIDUEÑAS, L.; FRANCO-LIRA, M.; TORRES-JARDON, R.; HENRIQUEZ-ROLDAN, C. Pediatric Respiratory and Systemic Effects of Chronic Air Pollution Exposure: Nose, Lung, Heart, and Brain Pathology . **Toxicologic Path**. 35:154–62. 2007.

CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, L.; MORA-TISCAREÑO, A.; ONTIVEROS, E.; GÓMEZ-GARZA, G.; BARRAGÁN-MEJÍA, G. Air pollution, cognitive deficits and brain abnormalities: a pilot study with children and dogs. **Brain Cogn.** 68:117-27. 2008a.

CALDERÓN-GARCIDUEÑAS, L.; SOLT, A.C.; HENRIQUEZ-ROLDÁN, C.; TORRES-JARDÓN, R.; NUSE, B.; HERRITT, L.; VILLARREAL-CALDERÓN, R.; OSNAYA, N.; STONE, I.; GARCÍA, R.; BROOKS, D.M.; GONZÁLEZ-MACIEL, A.; REYNOSO-ROBLES, R.; DELGADO-CHÁVEZ, R.; REED, W. Long-term air pollution exposure is associated with neuroinflammation, an altered innate immune response, disruption of the blood-brain barrier, ultrafine particulate deposition, and accumulation of amyloid beta-42 and alpha-synuclein in children and young adults. **Toxicol. Pathol.** 36(2):289-310. 2008b.

CETESB. **Relatório da Qualidade do Ar da cidade de São Paulo: 2007.** São Paulo, 2007.

CHEN, R.; SAMOLI, E.; WONG, C.M.; HUANG, W.; WANG, Z.; CHEN, B.; KAN, H. Associations between short-term exposure to nitrogen dioxide and mortality in 17 Chinese cities: The China Air Pollution and Health Effects Study. **Environment International** 45, 32–38. 2012.

CHIUSOLO, M.; CADUM, E.; STAFOGGIA, M.; GALASSI, C.; BERTI, G.; FAUSTINI, A. Short term effects of nitrogen dioxide on mortality and susceptibility factors in ten Italian cities: the EpiAir study. **Environ Health Perspect.** 2011.

CONAMA (1990) – Conselho Nacional de Meio Ambiente. Dispõe sobre padrões de qualidade do ar, previstos no PRONAR. Resolução CONAMA n. 08, **Diário Oficial da União**, 6 de dezembro de 1990.

DALLAROSA, J.; TEIXEIRA, E.C.; MEIRA, L.; WIEGAND, F. Study of the chemical elements and polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric particles of PM10 and PM2.5 in the urban and rural areas of South Brazil. **Atmospheric Research.** 89, 76–92. 2008.

DELFINO, R.J.; STAIMER, N.; VAZIRI, N.D. Air pollution and circulating biomarkers of oxidative stress. **Air Quality, Atmosphere & Health**, v.4, p.37–52, 2011.

DEMETRIOU, C.A.; RAASCHOU-NIELSEN, O.; LOFT, S.; MOLLER, P.; VERMEULEN, R.; PALLI, D.; MARC CHADEAU-HYAM, M.; XUN, W.; VINEIS, P. Biomarkers of ambient air pollution and lung cancer: a systematic review. **Occup Environ Med.** 69:619–627. 2012.

DOCKERY, D. W.; LUTTMANN-GIBSON, H.; RICH, D. Q.; LINK, M. S.; MITTLEMAN, M. A.; GOLD, D. R.; KOUTRAKIS, P.; SCHWARTZ, J. D.; VERRIER, R. L. Association of air pollution with increased incidence of ventricular tachyarrhythmias recorded by implanted cardioverter defibrillators. **Environ. Health Perspect.** 113, 670–674. 2005.

DONNELLY, A.; BRODERICK, B.; MISSTEAR, B. Relating Background NO2 Concentrations in Air to Air Mass History Using Non-Parametric Regression

Methods: Application at Two Background Sites in Ireland. **Environ Model Assess.** 17:363–373. 2012.

FREITAS, C.; BREMNER, A.S.; OWMAN, C.; PERSON, H.; SJÖBERG, N.O. Histochemical and pharmacological associations with air pollution in São Paulo, Brazil, [1993 to 1997]. **Rev Saúde Publica.** 38: 751-57. 2003.

GEHRIG, R.; BUCHMANN, B. Characterising seasonal variations and spatial distribution of ambient PM₁₀ and PM_{2.5} concentrations based on long-term Swiss monitoring data. **Atmospheric Environment**, v. 37, p. 2571–2580, 2003.

GOLDBERG, M.S.; BURNETT, R.T.; BAILAR, J.C. III; TAMBLYN, R.; ERNST, P.; FLEGEL, K.; BROOK, J.; BONYALOT, Y.; SINGH, R.; VALOIS, M.F.; VINCENT, R. Identification of persons with cardiorespiratory conditions who are at risk of dying from the acute effects of ambient air particles. **Environ Health Persp.** 109(4): 487-94. 2001.

GONZALES, M.; MYERS, O.; SMITH, L.; OLVERA, H. A.; MUKERJEE, S.; LI, W.; PINGITORE, N.; AMAYA, M. BURCHIEL, S.; BERWICK, M.; STUDY A. Evaluation of land use regression models for NO₂ in El Paso, Texas, USA. **Science of the Total Environment** 432; 135–142. 2012.

GURGUEIRA, S.A.; LAWRENCE, J.; COULL, B.; MURTHY, G.G.K.; GONZÁLEZ-FLECHA, B. Rapid increases in the steady-state concentration reactive oxygen species in the lung and heart after particulate air pollution inhalation. **Inhalation. Environmental Health Perspectives.** 110(8): 749-755. 2002.

HALLIWELL, B.; CROSS, C.E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Health Perspect.** 102:5-12. 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine.** 4th ed., New York, Oxford University Press, 2007.

HOFFMANN, B.; MOEBUS, S.; MOHLENKAMP, S. Heinz Nixdorf Recall Study Investigative Group. Residential exposure to traffic is associated with coronary atherosclerosis. **Circulation.** 116:489–496. 2007.

HOUGAARD, K.; JENSEN, K.A.; NORDLY, P.; TAXVIG, C.; VOGEL, U. Effects of prenatal exposure to diesel exhaust particles on postnatal development, behavior, genotoxicity and inflammation in mice. **Particle and Fibre Toxicology.** 2008.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Cidades. Acessado em: 8 fev 2014. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/>>

IONOV, D.V.; POBEROVSKII, A.V. Nitrogen Dioxide in the Air Basin of St. Petersburg: Remote Measurements and Numerical Simulation. **Atmospheric And Oceanic Physics** .v.48 n.4. 2012.

JAKUES, J.A.; REZER, J.F.; GONCALVES, J.F.; SPANEVELLO, R.M.; GUTIERRES, J.M.; PIMENTEL, V.C. The effect of curcumin in the ectonucleotidases and cetylcholinesterase activities in synaptosomes from the

cerebral cortex of cigarette smoke-exposed rats. **Cell Biochem Funct.** 29:703-7. 2011.

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

KARNAE, S.; JOHN K. Source apportionment of fine particulate matter measured in an industrialized coastal urban area of South Texas. **Atmospheric Environment** 45, 2011.

KEHRER, J.P. The Haber-Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology.**149:43-50. 2000.

KELLY, F. J. Oxidative stress: its role in air pollution and adverse health effects. **Occup. Environ. Med.** v. 60, p. 612-616. 2003.

KELLY, F. J.; FUSSELL, J. C. Size, source and chemical composition as determinants of toxicity attributable to ambient particulate matter. **Atmospheric Environment.** 60, 504e526. 2012.

KUNZLI, N.; JERRETT, M.; MACK, W.J. Ambient air pollution and atherosclerosis in Los Angeles. **Environ Health Perspect.** 113:201–206. 2005.

LEE, S. Fine particulate matter measurement and international standardization for air quality and emissions from stationary sources. **Fuel.** v. 89, p. 874-882. 2010.

LEWTAS, J. Air pollution combustion emissions: Characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. **Mutation Res.** 636, 95-133. 2007.

LÓPEZ, M.L.; CEPPI, S.; PALANCAR, G.G.; OLCESE, L.E.; TIRAO, G.; TOSELLI, B.M. Elemental concentration and source identification of PM10 and PM2.5 by SR-XRF in Córdoba City, Argentina. **Atmospheric Environment.** 45, 2011.

MAHESWARAN, R.; HAINING, R.P.; BRINDLEY, P.; LAW, J.; PEARSON, T.; FRYERS, P.R.; WISE, S.; CAMPBELL, M.J. Outdoor air pollution and stroke in Sheffield, United Kingdom: a small-area level geographical study. **Stroke.** 36: 239-43. 2005.

MENZEL, D.B. The toxicity of air pollution in experimental animals and humans: the role of oxidative stress. **Toxicol Lett.** 72(1-3): 269-77. 1994.

MIGLIORE, L.; COPPEDÈ, F. Environmental-induced oxidative stress in neurodegenerative disorders and aging. **Mutat Res.** 31:73-84. 2009.

MILLS, N.L.; TÖRNQVIST, H.; GONZALEZ, M.C.; VINK, E.; ROBINSON, S.D.; SÖDERBERG, S. Ischemic and thrombotic effects of dilute diesel-exhaust inhalation in men with coronary heart disease. **N Engl J Med.** 357(11):1075-82. 2007.

MILLS, N.L. Adverse cardiovascular effects of air pollution. **Nat Clin Pract Cardiovasc Med.** 6, 36–44. 2009.

MORAES, O. L. L. Meteorologia e Poluição Atmosférica: **Teoria, Experimentos e Simulação**. Santa Maria: FACOS-UFSM, 240p. 2010.

MOREIRA, D.; TIRABASSI, T. Modelo matemático de dispersão de poluentes na atmosfera: um instrumento técnico para a gestão ambiental. **Ambiente & Sociedade**. Vol. VII nº2, p.159-171. 2004.

OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTER, E.; OBERDÖRSTER, J. Nanotoxicology: na emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environ. Health Perspect.** 113 (7):823-839. 2005.

OGA, S.; CAMARGO, M.M.A; BATISTUZZO, J.A.O. **Fundamentos de Toxicologia**. 3ª edição. São Paulo: Atheneu Editora, 677p. 2008.

OLIVEIRA, M.M.; SILVA, M.V.; CUNHA BASTOS, V.L.F.; FERNANDES, F.C.; CUNHA, B.J. Brain acetylcholinesterase as a marine pesticide biomarker using Brazilian fishes. **Marine Environmental Research**. 63, p.303-312, 2007.

OSTRO, B.; LIPSETT, M.; MANN, J.; BRAXTON-OWENS, H.; WHITE, M. Air pollution and exacerbation of asthma in African-American children in Los Angeles. **Epidemiology**. 12: 200-8. 2001.

PEREIRA, C.E.L.; HECK, T.G.; SALDIVA, P.H.N.; RHODEN, C.R. Ambient particulate air pollution from vehicles promotes lipid peroxidation and inflammatory responses in rat lung. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 40: 1353-1359. 2007.

PETERS, A.; DOCKERY, D.W.; MULLER, J.E.; MITTLEMAN, M.A. Increased particulate air pollution and the triggering of myocardial infarction. **Circulation**. 103(23): 2810-5. 2001.

PETERS, A.; VERONESI, B.; CALDERON-GARCIDUENAS, L.; GEHR, P.; CHEN, L.C.; GEISER, M. Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update. **Partic Fibre Toxicol.** 3:13. 2006.

PINHO, R.A.; BONATTO, F.; ANDRADES, M.; FROTA, M.L. JR.; RITTER, C.; KLAMT, F.F. Lung oxidative response after acute coal dust exposure. **Environ Res** 96:290-7. 2004.

POPE III, C.A.; EZZATI, M.; DOCKERY, D.W. Fine-particulate air pollution and life expectancy in the United States. **New England Journal of Medicine**. 360(4):376-386. 2009.

RAJARATHNAM, U.; SEHGAL, M.; NAIRY, S.; PATNAYAK, R.C. Time-series study on air pollution and mortality in Delhi. **Res Rep Health Eff Inst.** 47-74. 2011.

RHODEN, C.R.; LAWRENCE, J.; GODLESKI, J.J.; GONZALEZ-FLECHA, B.N. N-acetylcysteine prevents lung inflammation after short-term inhalation exposure to concentrated ambient particles. **Toxicol. Sci.** 79(2):296-303. 2004.

RUCKERL, R.; IBALD-MULLI, A.; KOENIG, W. Air pollution and markers of inflammation and coagulation in patients with coronary heart disease. **American Journal Of Respiratory And Critical Care Medicine**.173(4)432-441. 2006.

SALDIVA, P.H.; LICHTENFELS, A.J.; PAIVA, P.S.; BARONE, I.A.; MARTINS, M.A.; MASSAD, E.; PEREIRA, J.C.; XAVIER, V.P.; SINGER, J.M.; BOHM, G.M. Association between air pollution due to respiratory diseases in children. **Environ. Res.** 65:218- 225. 1994.

SALDIVA, P.H.; POPE, C.A.; SHWARZ, J.; DOCKERY, D.W.; LICHTENFELS, A.J.; SALGE, J.M.; BARONE, I.; BOHM, G.M. Air pollution and mortality in elderly people a timeseries study in São Paulo, Brazil. **Arch. Environ. Health.** 50:159-163. 1995.

SAMOLI, E.; AGA, E.; TOULOUMI, G.; NISIOTIS, K.; FORSBERG, B.; LEFRANC, A. Short-term effects of nitrogen dioxide on mortality: an analysis within the APHEA project. **Eur Respir J.** 27:1129–38. 2006.

SANTOS, J. M.; GRIFFITHS, R. F.; REIS, Jr. N. C.; MAVROIDIS, I. Experimental investigation of averaging time effects on building influenced atmospheric dispersion under different meteorological stability conditions. **Building and Environment.** V. 44, p. 1295–1305. 2009.

SCHIRMER, W. N.; LISBOA, H. M. Química da Atmosfera: constituintes naturais, poluentes e suas reações. **Tecno-Lógica.** Santa Cruz do Sul, v. 12, p. 37-46. 2008.

SCHWARTZ, J. Air pollution and blood markers of cardiovascular risk. **Environ Health Perspect.** 109: 405-9. 2001.

SIMKHOVICH, B. Z.; KLEINMAN, M.T.; MEHRAN-SHA, I. R.; HSU, Y.; MEACHER, D.; GOOKIN, G.; KINNON, M.M. Chronic exposure to ambient particulate matter alters cardiac gene expression patterns and markers of oxidative stress in rats. **Air Qual Atmos Health.**4:15-25. 2011.

SIRIVELU, M.P.; MOHANKUMAR, S.M.J.; WAGNER, J.G.; HARKEMA, J.R.; MOHANKUMAR, P.S. Activation of the stress axis and neurochemical alterations in specific brain areas by concentrated ambient particle exposure with concomitant allergic airway disease. **Environ Health Perspect.**114:870–874. 2006.

STULL, R. B. An Introduction to Boundary Layer Meteorology. Dordrecht, Holanda: **Kluwer Academic Publishers**, 1988. 666p.

SUGLIA, S.F.; GRYPARIS, A.; WRIGHT, R.O.; SCHWARTZ, J.; WRIGHT, R.J. Association of black carbon with cognition among children in a prospective cohort study. **Am. J. Epidemiol.** 167:280-286. 2008.

TAO, F.; GONZALEZ-FLECHA, B.; KOBZIK, L. Reactive oxygen species in pulmonary inflammation by ambient particulates. **Free Radic Biol Med.** 35:327-40. 2003.

TÖRNQVIST, H.; MILLS, N.L.; GONZALEZ, M.; MILLER, M.R.; ROBINSON, S.D.; MEGSON, I.L.; MACNEE, W.; DONALDSON, K.; SÖDERBERG, S.; NEWBY, D.E.; SANDSTRÖM, T.; BLOMBERG, A. Persistent endothelial dysfunction in humans after diesel exhaust inhalation. **Am J Respir Crit Care Med.** 176(4):395-400. 2007.

YANG, W; OMAYE, S.T. Air pollutants, oxidative stress and human health. **Mutation Research.** 45-54. 2009.

YU, I.T.S.; ZHANG, Y.; TAM, W.T.; YAN, Q.H.; XU, Y.; XUN, X.; TIAN, L.W.; TSE, L.A. Effect of ambient air pollution on daily mortality rates in Guangzhou, China. **Atmospheric Environment.** 46, 528-535. 2012.

WALLACE, J. A.; HOBBS, P. V. **Atmospheric Science: An Introductory Survey**, 2.ed. San Diego: Academic Press. 504p. ISBN 0-12-732951-X. 2006.

WHO. World Health Organization. **Air quality guidelines, global update 2005:** particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulphur dioxide. Germany; chap. 10:217–305. 2006.

ZANCHI, A.C.; VENTURINI, C.; SAIKI, M.; SALDIVA, P.H.N.; BARROS, H.M.T.; RHODEN, C.R. Chronic nasal instillation of Residual-Oil Fly Ash (ROFA) induces brain lipid peroxidation and behavioral changes in rats. **Inh. Toxicol.** 20:795-800. 2008.

ZANCHI, A.C.; FAGUNDES, L.S.; BARBOSA, F. JR.; BERNARDI, R.; RHODEN, C.R.; SALDIVA, P.H.; DO VALLE, A.C. Pre and post-natal exposure to ambient level of air pollution impairs memory of rats: the role of oxidative stress. **Inhal Toxicol.** 22:910-8. 2010.

ZELIKOFF, J.T.; SCHERMERHORN, K.R.; FANG, K.; COHEN, M.D.; SCHLESINGER, R.B. A role for associated transition metals in the immunotoxicity of inhaled ambient particulate matter. **Environ Health Perspect.** 5:871-5. 2002.

ZHANG, M.; BALMADRID, C.; KELLEY, A.E. Nucleus accumbens opioid, GABAergic, and dopaminergic modulation of palatable food motivation: contrasting effects revealed by a progressive ratio study in the rat. **Behav Neurosci.** 117(2):202-11. 2003.

ZHAO, X.; ZHANG, X.; XU, X.; XU, J.; MENG, W.; PU, W. Seasonal and diurnal variations of ambient PM_{2.5} concentration in urban and rural environments in Beijing. **Atmospheric Environment** 43, 2893–2900. 2009.

ANEXO 1

Comprovante da submissão do artigo

Environmental Science and Pollution Research
Evaluation of weather conditions as well as NO₂ and PM_{2.5} levels in the urban areas
of South Brazil in different seasons
 –Manuscript Draft–

Manuscript Number:	
Full Title:	Evaluation of weather conditions as well as NO ₂ and PM _{2.5} levels in the urban areas of South Brazil in different seasons
Article Type:	Research Article
Keywords:	Air pollution; Fine particulate matter; Meteorological; Nitrogen dioxide; Exposure assessment; Seasons
Corresponding Author:	Giovana Duzzo Gamaro, Ph.D UFPEL Pelotas, BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	UFPEL
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Roberta Foerstnow Szczepaniak, graduate
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Roberta Foerstnow Szczepaniak, graduate Bruno Bayni Fabiano Soares Carina Bork Gustavo Colares Mauricio Moresco Alan Fleck Claudia Ramos Rhoden Giovana Duzzo Gamaro, Ph.D
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Due to the ever-increasing importance of studying pollution effects on environment and population, the development of methodologies for the evaluation of atmospheric pollutants has allowed great advances concerning air quality monitoring. Nitrogen dioxide (NO ₂) and fine particulate matters (PM _{2.5}) have as major sources vehicle engine exhausts and industrial processes. In the municipality of Pelotas, the economical and industrial growth allied to the expansion of the local vehicle fleet have brought several impacts on human health and environment. For this region, there are few studies concerning air pollution monitoring and dispersion. Data were collected seasonally (summer, autumn, winter and spring) in eight points (Porto, Areal, Centro, Fragata, Trem, Três Vendas, Laranjal, and Capão do Leão) over the city area, aiming to have a picture of the city as a whole. Annual mean $\pm$ standard deviation of the PM _{2.5} measurements are: Porto 48.95 $\pm$ 6.28, Areal 31.29 $\pm$ 4.56, Centro 39.56 $\pm$ 7.05, Fragata 30.28 $\pm$ 3.59, Trem 19.15 $\pm$ 1.9, Três Vendas 31.4 $\pm$ 3.80, Laranjal 29.79 $\pm$ 2.34, Capão do Leão 24.25 $\pm$ 3.21 and annual mean $\pm$ standard deviation for NO ₂ were: Porto 9.06 $\pm$ 1.51, Areal 10.49 $\pm$ 0.94, Centro 14.13 $\pm$ 0.89, Fragata 21.44 $\pm$ 0.56, Trem 17.20 $\pm$ 0.99, Três Vendas 21.94 $\pm$ 1.22, Laranjal 8.83 $\pm$ 1.97, Capão do Leão 6.77 $\pm$ 0.76. We conclude that there are significant differences in different sites of the city, mainly due to traffic and human activities characteristics of each point. On the other hand, meteorological factors act similarly in all sites concerning the pollution dispersion.

Powered by Editorial Manager® and Production Manager® from Aries Systems Corporation

Suggested Reviewers:	Melissa Gonzales mgonzales@salud.unm.edu
	Maria Laura López lopez@fq.unc.edu.ar
	Hebe Cameras hcameras@com.uncor.edu
Opposed Reviewers:	