



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Avaliação da qualidade bioquímica do ar: conteúdo proteico e lipídico do ar e seus potenciais impactos na saúde respiratória.

Mariana Isabel dos Santos Custódio

Orientador(es) | Célia Maria Antunes
Maria João Costa

Évora 2022



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado em Bioquímica

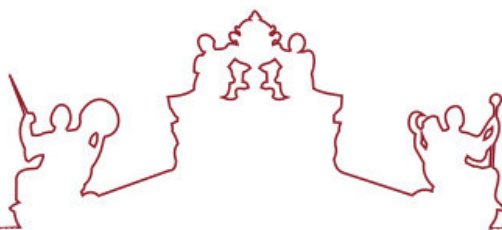
Dissertação

Avaliação da qualidade bioquímica do ar: conteúdo proteico e lipídico do ar e seus potenciais impactos na saúde respiratória.

Mariana Isabel dos Santos Custódio

Orientador(es) | Célia Maria Antunes
Maria João Costa

Évora 2022



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | Ana Vitória Dordio (Universidade de Évora)

Vogais | Ana Rodrigues Costa (Universidade de Évora) (Arguente)
Célia Maria Antunes (Universidade de Évora) (Orientador)

Para todos os que acreditaram em mim,
sem vocês esta dissertação não seria possível!

Índice

Agradecimentos	III
Agradecimentos pessoais.....	IV
Resumo	V
Abstract.....	VI
Índice de tabelas	VII
Índice de figuras	VIII
Lista de abreviaturas	IX
1. Nota Introdutória	1
2.Revisão Bibliográfica	1
2.1 Constituição da atmosfera	1
2.1.1 Gases Atmosféricos.....	2
2.1.2 Matéria Particulada	3
2.1.3 Black Carbon.....	4
2.1.4 Bioaerossóis	5
2.2 Efeitos da matéria particulada na saúde humana.....	7
2.3 Monitorização da matéria particulada	11
2.3.1 Monitorização de pólen e esporos fúngicos	11
2.3.2 Monitorização de <i>black Carbon</i>	12
2.4 Epitélio respiratório.....	15
2. 5 Mecanismos de resposta à matéria particulada	16
3. Objetivos.....	23
4. Metodologia.....	23
4.1 Caracterização da área de estudo	23
4.2 Material, equipamento e reagentes utilizados	24
4.3 Procedimento experimental.....	24
4.3.1 Colheita das amostras de PM	24
4.3.2 Colheita de dados de BC	25
4.3.3 Colheita de bioaerossóis.....	25
4.3.4 Seleção das amostras a analisar.....	25
4.3.5 Determinação do conteúdo em bioaerossóis	27
4.3.6 Determinação da proteína solúvel na PM.....	27
4.3.7 Determinação dos lípidos solúveis na PM	28
5. Resultados e Discussão de resultados.....	29

5.1 Caracterização sazonal do conteúdo polínico	29
5.2 Caracterização sazonal do conteúdo em esporos fúngicos	30
5.3 Caracterização sazonal do conteúdo em <i>Black Carbon</i>	33
5.4 Determinação da composição bioquímica da PM	34
5.4.1 Conteúdo proteico	34
5.4.2 Conteúdo lipídico	35
5.5 Análise da correlação entre a composição bioquímica da PM e o tipo de aerossol	37
6. Conclusão	41
7. Referências Bibliográficas.....	43
Anexo 1	47
- Material.....	47
- Equipamento	48
- Reagentes	48
- Soluções	49

Agradecimentos

Esta dissertação contou com o apoio de fundos nacionais através da FCT – Fundação para a Ciência e a Tecnologia, no âmbito do Instituto de Ciências da Terra - ICT, referência UIDB/04683/2020 e UIDP/04683/2020.



UNIVERSIDADE DE ÉVORA
ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA



Instituto de Ciências da Terra
Institute of Earth Sciences



UNIÃO EUROPEIA

Fundo Europeu
de Desenvolvimento Regional

FCT

Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR

Agradecimentos pessoais

Queria começar estes agradecimentos por agradecer aos meus pais, obrigada por todo o vosso esforço para eu conseguir fazer este mestrado e obrigada por terem compreendido todos os dias em que não consegui ir a Santarém e estar presente em certos momentos. Um agradecimento especial á minha mãe por nunca me ter deixado desistir.

Quero agradecer também á Professora Doutora Célia Antunes por ter concordado sem pestanejar ser a minha orientadora nesta dissertação e por ter estado sempre disponível para os incessantes 5 minutos que eu lhe pedia para rever protocolos ou para analisar resultados.

Á professora Doutora Maria João Costa por ter concordado em ser minha co-orientadora e por se ter disponibilizado para ajudar sempre que podia.

Às minhas colegas de laboratório, Ana Galveias e Mariana Marques, por me terem ensinado muita coisa neste mundo da investigação e por se terem sempre disponibilizado para me ajudar apesar do imenso trabalho que também tinham. Mariana, um obrigado especial por todas as conversas de incentivo e de apoio que aconteceram na sala de cultura celular, elas foram muito importantes para este meu trajeto.

Ao Miguel Serrano, meu colega de bancada e de casa durante a licenciatura, por todo o apoio quando os resultados não eram os esperados ou quando tudo falhava e o trabalho se atrasava.

Por último, quero agradecer ao Rafael Matos por todo o apoio nos últimos 2 anos, por ter aturado o mau humor quando as coisas não corriam tão bem. E por todas as palavras de encorajamento, se eu não desisti quando tudo desabou devo-o a ti.

MUITO OBRIGADA!

Avaliação da qualidade bioquímica do ar: conteúdo proteico e lipídico do ar e seus potenciais impactos na saúde respiratória

Resumo

A composição da atmosfera, em matéria particulada (PM) e gases, varia ao longo das diferentes estações do ano logo os efeitos nefastos na saúde humana expectáveis, devido à sua inalação, serão diferentes. Posto isto, este estudo teve como objetivo estudar a qualidade bioquímica do ar atmosférico ao longo de 12 meses e avaliar os seus potenciais riscos para a saúde respiratória.

O conteúdo em pólen, esporos fúngicos e *black carbon* (BC) varia sazonalmente, sendo a sua concentração mais elevada na primavera, no verão e no inverno, respetivamente. A maior concentração de proteína e de lípidos na PM registou-se na primavera, sugerindo que o pólen é principal fonte. Durante o inverno também se registou uma concentração elevada de proteína, associada a elevada concentração de BC.

Em conclusão, estes resultados sugerem elevado risco de doenças inflamatórias do sistema respiratório com etiologia diferente no inverno e na primavera.

Palavras-chave

Bioaerossóis; qualidade do ar; saúde respiratória; black carbon.

Evaluation of biochemical air quality: protein and lipid content of air and its potential impacts on respiratory health

Abstract

The composition of the atmosphere, in particulate matter (PM) and gases, varies throughout the different seasons of the year, so the expected harmful effects on health, due to their inhalation, is expected to be different. Therefore, this study aimed to study the biochemical quality of atmospheric air over 12 months and assess the potential risks to human respiratory health.

The content of pollen, fungal spores and black carbon (BC) varies seasonally, with the highest concentration in spring, summer and winter, respectively. The highest concentration of protein and lipids in PM was recorded in spring, suggesting that pollen is the main source. During the winter, a high concentration of protein in PM was also observed, associated with a high concentration of BC.

In conclusion, these results suggest high risk for respiratory inflammatory diseases with different aetiologies in the spring and winter seasons.

Keywords

Bioaerosols; air quality; respiratory health; black carbon.

Índice de tabelas

Tabela 1: Amostras analisadas, o período de colheita, o número de dias de colheita e o material colhido em cada amostra.....	26
Tabela 2: Amostras selecionadas de acordo com a sua composição como caso de estudo para determinação de lípidos.....	35

Índice de figuras

Figura 1: Diferentes dimensões dos bioaerossóis: (A) – proteínas; (B) – vírus; (C) – Bactérias; (D) – Esporos fúngicos e (E) – grãos de pólen.....	6
Figura 2: Métodos de amostragem volumétricos: a) - Captador do tipo Hirst (retirado de Jorge, 2022) e b) captador ChemVol 2400 - High Volume Cascade Impactor (fotografia retirada no Observatório localizado no Colégio António Luís Verney).....	12
Figura 3: Câmara de deteção existente no MAAP Model 5012.....	13
Figura 4:MAAP (Multi-angle Absorption Photometer) Model 5012.....	14
Figura 5:Diferentes tipos de células existentes no epitélio pulmonar. Retirado de Davis & Wypych, 2021	16
Figura 6: Efeito dos poluentes atmosféricos no epitélio das vias respiratórias.....	18
Figura 7:Mapa mostrando a envolvência do Observatório.....	24
Figura 8:Conteúdo polínico dos filtros analisados.....	29
Figura 9: Conteúdo em esporos fúngicos dos filtros analisados.....	31
Figura 10: Percentagens de prevalência dos esporos fúngicos identificados nas amostras de ar atmosférico.....	32
Figura 11: Conteúdo em Black Carbon dos filtros analisados.....	33
Figura 12:Concentração de proteína nas frações M e XL dos filtros analisados.....	34
Figura 13: Correlação positiva estatisticamente significativa entre a [proteína] na fração M e na fração XL.....	35
Figura 14: Conteúdo lipídico, polínico e esporos fúngicos encontrado nas frações M e XL dos casos de estudo.....	36
Figura 15: Cromatografias de camada fina realizadas.....	37
Figura 16: Variação da concentração de proteína no ar em função da concentração de pólen (a) e análise de correlação entre os dois fatores na primavera (b).....	37
Figura 17: Correlação positiva estatisticamente significativa entre a concentração de proteína e a concentração de pólen na fração XL (a) e M (b).....	38
Figura 18: Correlação entre o conteúdo fúngico e a [proteína total] (a). No gráfico b) e c) está representada a relação entre o conteúdo fúngico e [proteína] na fração M e XL, respetivamente.....	39
Figura 19: Correlação positiva estatisticamente significativa entre a [BC total] e a [proteína total] (a). No gráfico b) e c) está representada a relação entre a [BC Total] e [proteína] na fração M e XL, respetivamente.....	40

Lista de abreviaturas

PM – matéria particulada (do inglês “*particulate matter*”)

BC – carbono negro (do inglês “*black carbon*”)

DPOC - doença pulmonar obstrutiva crónica

PNEC - sistema de células pulmonares neuroendócrinas

AECs - células epiteliais das vias respiratórias

TJs - *tight junctions*

AJs - junções aderentes

DAMPs - padrões moleculares associados a perigo (do inglês “*damage associated molecular patterns*”)

IgE - imunoglobina E

ROS - espécies reativas de oxigénio (do inglês “*reactive oxygen species*”)

PAH - hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (do inglês “*polycyclic aromatic hydrocarbon*”)

AhR - recetor aril hidrocarboneto (do inglês “*aryl hydrocarbon receptor*”)

EGFR - recetor do fator de crescimento epidérmico (do inglês “*epidermal growth factor receptor*”)

IL-33 - interleucina - 33

IFN- γ - interferão - gama

TNF- α - fator de necrose tumoral – alfa (do inglês “*tumor necrosis factor alpha*”)

IL-4 - interleucina - 4

IL-13 - interleucina - 13

IL-17A - interleucina - 17A

IL-22 - interleucina – 22

PAMPs – padrões moleculares associados a patogénios (do inglês “*Pathogen-associated molecular pattern*”)

TLRs - recetores *toll like* (do inglês “*toll-like receptors*”)

PARs - recetores ativados por protéases (do inglês “*protéase-activated receptors*”)

rpm - rotações por minuto

TLC – cromatografia em camada fina (do inglês “*thin-layer chromatography*”)

R - Coeficiente de correlação de *Pearson*

1. Nota Introdutória

A atmosfera é constituída por gases e partículas em suspensão (aerossóis), entre as quais se inclui a matéria particulada (PM) de origem biológica, como pólen, fungos, vírus, bactérias, entre outros (European Environment Agency, 2013; Sénéchal et al., 2015). Além disto, a sua composição é variável ao longo das diferentes estações e, por isso, os efeitos nefastos para a saúde humana ao longo do ano vão ser diferentes consoante a composição da atmosfera (European Environment Agency, 2013).

A PM que existe na atmosfera é considerada como um dos poluentes mais nocivos para a saúde humana (World Health Organization (WHO), 2021). A exposição a PM, por inalação, dependendo da sua composição pode causar diversas respostas inflamatórias e/ou infecciosas (WHO, 2021). Contudo, apesar da sua importância, existe ainda pouco conhecimento sobre a variação sazonal da composição das PM no ar e, consequentemente, os efeitos reais sobre a saúde humana não estão totalmente esclarecidos. Assim, a hipótese deste estudo consiste em que a composição química e bioquímica da PM varia ao longo do ano tendo assim diferentes impactos na saúde humana.

Posto isto, o principal objetivo deste estudo foi estudar a qualidade bioquímica do ar e os seus possíveis riscos na saúde respiratória. Para isso, foi determinado o conteúdo em proteínas, lípidos e black carbon ao longo do ano, e foi averiguado qual seria a sua relação com a matéria particulada de origem biológica mais comum – pólen e fungos.

2.Revisão Bibliográfica

2.1 Constituição da atmosfera

A atmosfera, massa gasosa que envolve o planeta Terra, é composta por gases, alguns deles poluentes e matéria particulada emitida por várias fontes, de origem natural (poeiras, sais marinhos, vulcões, etc.) ou devido a atividades antropogénicas (tráfego automóvel, indústria, etc.). Além destes, a atmosfera é um meio de transporte para uma grande variedade de outras partículas como fungos, vírus, bactérias, pólen, partes de plantas, entre outras (European Environment Agency, 2013; Sénéchal et al., 2015). Segundo Sénéchal et al. (2015) o material celular de fungos e pólen pode contribuir para cerca de 4-11% da matéria particulada da fração PM_{2,5} (Sénéchal et al., 2015).

A atmosfera divide-se em várias camadas, sendo a troposfera a camada mais baixa que está em contacto com a superfície e, por isso, é a camada onde todos habitamos (European Environment Agency, 2013). Esta camada é composta por gases e matéria particulada, que serão discutidos mais pormenorizadamente nos próximos pontos.

Como toda a atmosfera, a troposfera é dinâmica uma vez que de acordo com a altitude, o ar vai ter uma densidade e uma composição, em gases e em matéria particulada, diferentes (European Environment Agency, 2013). Além desta dinâmica de acordo com a altitude, a composição do ar em termos de alguns gases e das partículas também varia de acordo com a época do ano, em resultado dos processos atmosféricos, da sazonalidade de alguns tipos de emissões onde se inclui o comportamento sazonal da PM (European Environment Agency, 2013). Por exemplo, no verão existe uma maior percentagem de ozono no ar devido às reações de foto-dissociação do NO₂ por ação da maior disponibilidade da radiação solar (European Environment Agency, 2013). Outro exemplo é que na primavera existem quantidades elevadas de pólen na atmosfera resultantes da polinização das plantas ao passo que no inverno se registam valores mínimos de pólen no ar (Pólen Alert, 2021).

2.1.1 Gases Atmosféricos

Existem 2 gases maioritários, azoto (78%) e oxigénio (21%) e existem outros gases em menor percentagem, denominados gases residuais, como, por exemplo, árgon, hélio, hidrogénio ou vapor de água, cuja percentagem na atmosfera se mantém fixa (European Environment Agency, 2013). Existem, ainda, outros gases na atmosfera que são considerados poluentes e que apresentam efeitos nefastos para a saúde humana como o ozono, os óxidos de azoto e os óxidos de enxofre e cujas concentrações podem variar devido a atividades antropogénicas, à variabilidade sazonal e às condições meteorológicas, por exemplo (European Environment Agency, 2013).

O ozono junto à superfície, por exemplo, é produzido ao nível do solo através de reações fotoquímicas que envolvem radiações ultravioletas e misturas de dióxido de azoto e hidrocarbonetos (D'Amato, 2011). Cerca de 40 a 60% do ozono inalado é absorvido nas vias respiratórias superiores, sendo que o restante atinge as vias respiratórias inferiores onde induz danos epiteliais e, conseqüentemente, induz respostas inflamatórias (D'Amato, 2011; D'Amato et al., 2013). Segundo alguns estudos epidemiológicos, o

ozono está, também, relacionado com o risco de exacerbações de asma em indivíduos asmáticos uma vez que em dias com níveis de ozono mais elevados existiu um aumento de admissões hospitalares (D'Amato, 2011). Outros estudos sugerem que este poluente aumenta a morbidade da asma porque aumenta a inflamação das vias respiratórias e a permeabilidade do epitélio pulmonar (D'Amato et al., 2013). De referir que o ozono existente na estratosfera tem, ao contrário do ozono troposférico, um papel importante e benéfico para o planeta e a saúde humana, filtrando a radiação ultravioleta mais nociva, impedindo-a de atingir a superfície da Terra.

Os gases existentes na atmosfera apresentam efeitos oxidativos na matéria particulada, nomeadamente nos grãos de pólen existentes no ar atmosférico. Segundo Galveias et. al (2021), as defesas oxidativas do pólen são ativadas pelos poluentes gasosos mais comuns, nomeadamente o dióxido de azoto e o ozono (Galveias et al., 2021).

2.1.2 Matéria Particulada

A matéria particulada (PM) é constituída por uma mistura de partículas orgânicas e inorgânicas, sólidas e líquidas de diferentes origens, tamanhos e composição (D'Amato et al., 2013). Segundo D'Amato (2011), a PM é o componente da poluição atmosférica em centros urbanos mais associada a efeitos nefastos para a saúde humana, uma vez que, em várias áreas, a PM está associada ao aumento da mortalidade por doenças respiratórias e cardiovasculares, ao aumento da asma alérgica e à infeção do trato respiratório (D'Amato, 2011).

Estas partículas podem ser classificadas de acordo com a sua formação, de acordo com a sua origem e de acordo com a sua dimensão (D'Amato et al., 2013; Tobias, 2013).

De acordo com a formação, existem partículas primárias e partículas secundárias (Tobias, 2013). As partículas primárias são emitidas diretamente na atmosfera, na fase sólida ou na fase líquida, a partir de várias fontes como a combustão de biomassa, de erupções vulcânicas, de materiais biológicos, entre outros (Tobias, 2013). As partículas secundárias ocorrem devido à formação de novas partículas por vários processos como a nucleação e a condensação de precursores gasosos (Tobias, 2013).

Estes aerossóis podem ter uma origem natural biótica (bioaerossóis), abiótica, proveniente de, por exemplo, poeiras, sais marinhos ou cinzas vulcânicas ou

antropogénica, resultantes de atividades humanas como a utilização de combustíveis fósseis ou as práticas agrícolas e industriais (European Environment Agency, 2013). Até à Segunda Guerra Mundial as principais fontes de PM eram as fontes naturais, contudo devido à forte industrialização e ao aumento dos níveis de poluição causados pelo Homem, as principais fontes passaram a ser as fontes antropogénicas (Tobias, 2013). Dentro das fontes antropogénicas, o tráfego automóvel, rodoviário, ferroviário e aeronáutico é a principal fonte de emissão de PM, de origem primária e secundária (Tobias, 2013).

A PM são partículas aéreas muito pequenas, entre 0,001 e 100 μm , incluindo microrganismos e derivados de plantas, animais e fungos (Kim et al., 2018). Devido ao facto de serem muito pequenos e leves, podem ser transportadas de um ambiente para outro e por isso são responsáveis por aproximadamente 5-34% da poluição de ar por partículas (Kim et al., 2018). Estes podem ser classificados de acordo com o seu tamanho em PM_{0,1 μm} (partículas ultrafinas) – partículas com diâmetro aerodinâmico inferior ou igual a 0,1 μm , PM_{1,0 μm} (partículas finas) - partículas com diâmetro aerodinâmico inferior ou igual a 1,0 μm , PM_{2,5 μm} – partículas com diâmetro aerodinâmico entre 0,1 μm e 2,5 μm e PM_{10 μm} – partículas com diâmetro aerodinâmico entre 2,5 μm e 10 μm (D'Amato et al., 2013).

Estas partículas podem ser compostos orgânicos, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, benzeno, entre outros, ou inorgânicos, como carbono, cloretos, sulfatos, metais, entre outros e produzem diferentes efeitos nefastos dependendo das suas propriedades químicas, físicas e biológicas (Manisalidis et al., 2020).

2.1.3 Black Carbon

Os processos de combustão emitem partículas carbonadas para a atmosfera que são capazes de absorver a radiação solar. O componente que absorve mais fortemente a luz é designado Black Carbon (BC) e o componente menos absorvente é designado carbono orgânico (Malico et al., 2017).

Segundo Wang et al. (2019) o BC é formado através da combustão incompleta dos combustíveis à base de carbono, ou seja, estes aerossóis são considerados partículas primárias (Malico et al., 2017; Wang et al., 2019). A maioria das partículas de BC

existentes na atmosfera apresentam dimensões submicrónicas sendo designadas de partículas ultrafinas (Malico et al., 2017).

Este poluente é considerado um dos poluentes mais severos e únicos (Ambade et al., 2021). Apresenta efeitos significantes na qualidade do ar e na saúde humana e no clima global, uma vez que, como referido anteriormente, o BC consegue absorver a radiação solar e, assim, aumentar a temperatura da atmosfera (Wang et al., 2019).

O BC é, geralmente, emitido por atividades antropogénicas como queima de biomassa, biocombustíveis e dos combustíveis fósseis. Também pode ser emitido por fontes naturais como erupções vulcânicas, fogos florestais, entre outros, contudo estas emissões são minoritárias quando comparadas com de origem antropogénica (Ambade et al., 2021).

Normalmente, o BC apresenta um ciclo diário de concentrações que apresenta picos matinais e noturnais que podem ser resultantes do tráfego existente nas horas de ponta e também do aquecimento doméstico, nas estações mais frias, com potencial impacto na saúde humana (Malico et al., 2017; Zioła et al., 2021).

2.1.4 Bioaerossóis

Os bioaerossóis são partículas aéreas, que são originadas de material biológico. Estes bioaerossóis podem ser, por exemplo, pólen, esporos de fungos, bactérias, entre outros (Kim et al., 2018).

O pólen constitui a estrutura biológica através da qual algumas plantas fazem a dispersão dos gametas masculinos, durante a polinização. Na polinização anemófila, os grãos de pólen são libertados para a atmosfera e transportados pelo vento de uma flor para a outra. Devido ao facto da polinização anemófila não ser muito dirigida são produzidos e libertados para a atmosfera muitos grãos de pólen. Estes grãos de pólen apresentam dimensões microscópicas, são esferoidais e apresentam a exina mais fina e com uma ornamentação mais suave que os grãos de pólen entomófilos – grãos de pólen polinizados por insetos. Devido a estas características estes grãos de pólen podem ser transportados pelo vento durante longas distâncias e como estão em grande concentração na atmosfera alguns destes grãos podem chegar ao sistema respiratório durante a respiração (Jorge, 2015, 2022).

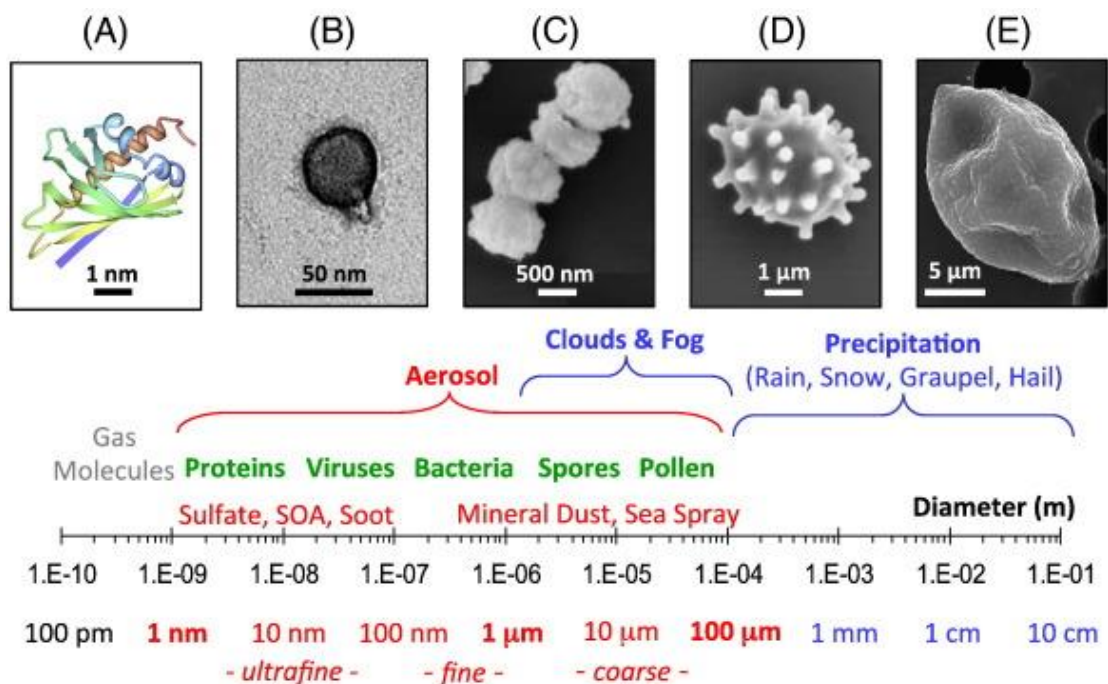


Figura 1: Diferentes dimensões dos bioaerossóis: (A) – proteínas; (B) – vírus; (C) – Bactérias; (D) – Esporos fúngicos e (E) – grãos de pólen.
Retirado de Fröhlich-Nowoisky et al., 2016

Os grãos de pólen apresentam na sua composição moléculas capazes de desencadear uma resposta imunológica em determinados indivíduos, nomeadamente no homem designados alérgenos. Os alérgenos são glicoproteínas ou lipoproteínas que reagem com componentes do sistema imunitário provocando uma reação alérgica em indivíduos sensibilizados. Normalmente, a gravidade destas reações alérgicas está relacionada com características intrínsecas destas moléculas, e com a concentração de grãos de pólen no ar por m^3 . Algumas das espécies mais relevantes alergologicamente na Península Ibérica são as da família Poaceae, com 13 grupos diferentes de alérgenos conhecidos; Olea europeae, com 15 alérgenos descritos; Platanus spp com 5 alérgenos principais descritos; Cupressaceae com 4 alérgenos descritos; Quercus spp com 4 alérgenos descritos (Jorge, 2022).

Cerca de 1 a 4% da constituição dos grãos de pólen são lípidos, começando na parede externa, a exina, que é constituída por uma substância lipídica contendo ácidos gordos. Nos grãos de pólen maduros, os lípidos mais proeminentes nas membranas são os glicerofosfolípidos. Cerca de 40% dos fosfolípidos da membrana ocorrem em conjuntos que aparecem como proeminências na superfície da membrana – as ornamentações. O *pollen coat* é a camada mais externa da parede do pólen e é constituído maioritariamente por lípidos, nomeadamente ésteres e ácidos gordos saturados e insaturados. Na

constituição interna do grão de pólen também existem lípidos, como as gotículas lipídicas compostas por triglicéridos, ou os glicerofosfolípidos existentes no retículo endoplasmático (Dahl, 2018).

Os esporos fúngicos são partículas biológicas que permitem a reprodução dos fungos. Estes esporos podem ser encontrados na atmosfera, em concentrações várias vezes superiores às concentrações de outras partículas, como os grãos de pólen (Oliveira et al., 2010). Contrariamente aos grãos de pólen, os esporos fúngicos estão presentes na atmosfera durante todo o ano e, por isso, têm sido associados ao desenvolvimento de certas manifestações alérgicas fora da época mais propícia à alergia polínica (Ferro et al., 2019).

Tal como os grãos de pólen, os esporos também apresentam dimensões microscópicas, entre 2 e 50 micrómetros, e, por isso, podem ser transportados pelo vento podendo chegar às vias respiratórias dos humanos. Devido a isso, alguns esporos fúngicos como os de *Alternaria*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, entre outros, estão associados a sensibilização alérgica e a certos sintomas respiratórios (Oliveira et al., 2010). Os esporos fúngicos apresentam na sua composição cerca de 1 a 35% de lípidos (WASSEF, 1977). A membrana celular contém fosfolípidos e esteróis, sendo que o ergosterol é o esteroide mais abundante (Rodrigues, 2018).

2.2 Efeitos da matéria particulada na saúde humana

Segundo a World Health Organization (2021), a PM é considerada um dos seis poluentes mais nocivos para a saúde humana e segundo D'Amato et al. (2013) esta é um dos principais componentes da poluição atmosférica urbana. Os aerossóis apresentam uma maior toxicidade quando comparados com os poluentes gasosos, já que os compostos gasosos são mais facilmente eliminados pelo sistema respiratório (Manisalidis et al., 2020). A profundidade de penetração destas partículas no organismo humano, nomeadamente nas vias respiratórias, está diretamente relacionada com o tamanho das partículas e com a eficiência dos mecanismos de defesa das vias respiratórias (D'Amato et al., 2013; World Health Organization (WHO), 2021).

A PM₁₀ consegue atingir o compartimento pulmonar, enquanto a PM_{2,5} consegue chegar mais longe no organismo humano, atingindo o compartimento alveolar. A PM_{0,1} pode inclusivamente atingir a circulação sanguínea (D'Amato et al., 2013). Quando

comparamos as diferentes classes de aerossóis, tendo em conta a sua penetração no organismo, as frações mais pequenas ($PM_{2,5}$, $PM_{1,0}$ e $PM_{0,1}$) têm associado um mais elevado fator de risco para o desenvolvimento de doenças respiratórias e cardiovasculares (D'Amato et al., 2013).

Segundo a WHO, aproximadamente 1,6 milhões de indivíduos/ ano perdem as suas vidas devido a fumos resultantes da queima de biomassa, como o resultante da confeção de alimentos, onde o BC está inserido (Ambade et al., 2021). As partículas de BC apresentam um tamanho muito reduzido e por isso conseguem, facilmente, infiltrar-se no sistema respiratório e, até, atingir a corrente sanguínea causando impactos graves na saúde humana. A interação destas partículas com os tecidos humanos pode levar a vários problemas de saúde como problemas respiratórios, cardiovasculares, entre outros (Zioła et al., 2021).

Segundo Manisalidis et al. (2020) a poluição do ar por atividades antropogénicas é um dos maiores problemas de saúde pública no mundo com cerca de 9 milhões de mortes por ano. Por isso, as populações mais suscetíveis como idosos, crianças, pessoas com certas patologias como diabetes, patologias respiratórias e pulmonares necessitam de estar conscientes de certas medidas de proteção (Manisalidis et al., 2020).

Este material particulado, em elevadas concentrações, apresenta efeitos na saúde humana a curto e a longo prazo, que devido a certas questões, como as diferentes metodologias aplicadas, ainda não foram completamente clarificados (Manisalidis et al., 2020). Os efeitos a curto prazo são efeitos temporários e incluem irritação nos olhos, nariz, pele, garganta, tosse, aperto no peito, dificuldade em respirar até efeitos mais graves como asma, pneumonia, bronquite e problemas pulmonares e respiratórios (Manisalidis et al., 2020). Outros efeitos que também podem ocorrer são dores de cabeça, náuseas e tonturas (Manisalidis et al., 2020).

Segundo Aghapour et al. (2022) , os poluentes atmosféricos são um dos principais fatores de risco para o desenvolvimento de asma e doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), uma vez que estes induzem a perturbação da barreira epitelial das vias respiratórias. Sendo que a $PM_{2,5}$ é um dos poluentes atmosféricos que afetam a integridade epitelial mais estudados (Aghapour et al., 2022).

Os efeitos a longo prazo podem ser agravados devido a uma exposição prolongada aos poluentes, que vai ser prejudicial aos sistemas neurológicos, reprodutivos e respiratórios,

pode causar cancro e, mais raramente, a morte (Manisalidis et al., 2020). A longo prazo estes efeitos são crónicos, com uma duração de anos ou mesmo a vida toda; são mais frequentes em indivíduos com alguma patologia predisponente, como asma. Estes efeitos podem ser asma crónica, insuficiência pulmonar, doenças cardiovasculares e, até, mortalidade cardiovascular (Manisalidis et al., 2020). Por exemplo, na China, a mortalidade relativa ao cancro do pulmão é associada às partículas finas, o que é um bom exemplo de que nos países desenvolvidos, este problema acaba por se tornar mais sério devido à sobrepopulação e à urbanização não controlada (Manisalidis et al., 2020).

No ano de 2015, existiam, mundialmente, mais de meio bilião de casos de asma e DPOC, sendo que a asma era responsável por mais de dois terços desses casos. Contudo a taxa de mortalidade da DPOC é cerca do dobro da taxa de mortalidade da asma (Aghapour et al., 2022).

Os efeitos causados por estes compostos estão interligados com o tipo de poluente, a sua origem e dose. Além disto, estes efeitos também dependem do país, da área, da estação do ano e do tempo de exposição (Manisalidis et al., 2020).

As crianças e os fetos são a faixa etária mais vulnerável a estes poluentes, especialmente durante o seu desenvolvimento. Deficiências no crescimento fetal, baixo peso ao nascimento e autismo são alguns dos efeitos relatados em bibliografia (Manisalidis et al., 2020).

Além dos efeitos nefastos no sistema respiratório, as PM apresentam, também, efeitos cardiovasculares, neurológicos, psicológicos, entre outros. A nível cardiovascular pensa-se que o principal efeito seja arteriosclerose coronária e a curto prazo estes efeitos estejam relacionados com hipertensão, derrames, enfartes do miocárdio e insuficiência cardíaca (Manisalidis et al., 2020).

Em alguns estudos foram observados efeitos neurológicos em adultos e em crianças depois de uma exposição a longo prazo aos poluentes aéreos. Acredita-se que certas complicações psicológicas, retinopatias e outros podem estar relacionadas com efeitos a longo prazo da poluição atmosférica. Um exemplo, são as doenças neurodegenerativas, como Parkinson e Alzheimer, em que apesar do agente etiológico ainda não ser conhecido, acredita-se que uma exposição prolongada à poluição atmosférica, nomeadamente exposição a pesticidas e a metais, pode ser um fator (Manisalidis et al., 2020).

Outro órgão que parece ser altamente afetado por estes poluentes é o olho, através de poluentes que existem em suspensão no ar atmosférico. Alguns dos efeitos são irritação, retinopatia ou síndrome dos olhos secos (Manisalidis et al., 2020).

Devido a todos estes efeitos nefastos na saúde humana, aos efeitos biogeoquímicos e aos efeitos na saúde ambiental e devido ao facto de os aerossóis serem responsáveis pela qualidade do ar que respiramos, estes devem ser monitorizados (Kim et al., 2018). Apesar de ser conhecido que os aerossóis são importantes e têm impacto na saúde humana, é difícil descrever qual é o seu papel nos sintomas de certas doenças (Kim et al., 2018). As doenças respiratórias são um dos principais efeitos dos aerossóis para a saúde, pois estas podem resultar da inflamação das vias respiratórias quando estas são expostas a alérgenos específicos, toxinas ou agentes pró-inflamatórios (Kim et al., 2018).

Devido aos efeitos nefastos que os aerossóis apresentam para a saúde humana existe uma necessidade de monitorizar os seus valores e, isso, levou ao estabelecimento de padrões de qualidade do ar para alguns dos seus constituintes em normas e diretivas para a qualidade do ar (Belo & Tofoli, 2011). Estes constituintes são determinados de acordo com os efeitos nocivos causados à saúde pública e, também, ao meio ambiente (Belo & Tofoli, 2011). Em Portugal, a legislação em vigor é a Directiva 2008/50/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 21 de maio de 2008 relativa à qualidade do ar ambiente e a um ar mais limpo na Europa (DIRECTIVA 2008/50/CE, 2008). Segundo esta diretiva, os valores limite anuais para PM₁₀ e para PM_{2,5} são, respetivamente, 40 e 25 µg/m³ (DIRECTIVA 2008/50/CE, 2008).

Contudo, mesmo a exposição a esses valores pode causar efeitos nefastos na saúde humana, e tendo em conta também que os efeitos nefastos variam de acordo com as características da população, acaba por se tornar muito difícil sugerir valores – padrão que garantam que não há qualquer efeito nefasto da exposição a esses poluentes (Belo & Tofoli, 2011).

Manisalidis et al. (2020) defende que deve ser formada uma política global com vista a combater a poluição atmosférica antropogénica uma vez que a cooperação internacional em diversas matérias como a investigação são essenciais num controlo eficaz da poluição. Esta funcionaria como um complemento ao tratamento dos efeitos adversos para a saúde associados à poluição atmosférica (Manisalidis et al., 2020).

2.3 Monitorização da matéria particulada

2.3.1 Monitorização de pólen e esporos fúngicos

Devido aos impactos na saúde existem por todo o mundo estações de monitorização baseada em diferentes metodologias. De facto, existem mais de 1000 estações de monitorização de bioaerossóis distribuídas por cerca de 53 países ao redor do mundo (Buters et al., 2018). A monitorização pode ser baseada em métodos gravimétricos (deposição passiva de partículas) ou volumétricos, que se baseiam na aspiração de um volume de ar conhecido.

Cada método recorre a amostradores distintos. Os métodos gravimétricos podem ser, por exemplo, placas de petri, método de Durham e método de Tauber (Jorge, 2022).

Os métodos de amostragem volumétricos são baseados em 2 princípios físicos: impacto e filtração. Os coletores por impacto podem ser subdivididos em categorias: impacto por sucção; impacto em cascata e inercial ou ciclónico.

O captador do tipo Hirst é o mais utilizado pelas redes de monitorização na colheita de pólen e esporos fúngicos da metodologia padrão para a monitorização polínica, recomendada pela IAA - International Association of Aerobiology e ESA - European Aeroallergen Society (Hirst, 1991).

Este captador é composto por 3 partes: uma unidade de impacto que contém um orifício de entrada de ar e um cilindro metálico conectado a um relógio com um mecanismo giratório que possibilita um movimento de 2mm/h, o que permite dados diários e horário; um cata-vento que se encontra no exterior com vista a manter o orifício da entrada de ar na direção dos ventos dominantes, para tornar a captação de partículas mais eficaz; e uma bomba de ar que permite a sucção de um volume de ar conhecido (10L/min) que pode ser ajustado por um sistema que se encontra na estrutura metálica (Figura 2) (Hirst, 1991).

O captador Hirst tem uma autonomia de 7 dias, sendo que a fita é retirada ao fim dos 7 dias e é tratada em laboratório, sendo preparadas lâminas definitas para posterior contagens e identificação polínica e de esporos fúngicos (Hirst, 1991).

O Captador ChemVol 2400 – High Volume Cascade Impactor, utilizado para as colheitas realizadas para este estudo, é um exemplo de coletor de impacto em cascata (Demokritou et al., 2002). Este modelo de amostragem consiste na recolha de PM no ar para um meio coletor através de um fluxo de ar de volume conhecido, 800L/min. (Tobias, 2013). O

captador ChemVol 2400 é um dispositivo composto por 4 partes: um tripé, um coletor estratificado, uma bomba de sucção de ar de alto volume e uma plataforma que protege contra as condições atmosféricas adversas (Figura 2). O ar é sugado pela parte superior e as partículas presentes na atmosfera são depositadas em dois ou mais filtros, de acordo com as suas dimensões. Este coletor é utilizado maioritariamente para a monitorização de alergénios (J. Buters et al., 2012, 2015; Demokritou et al., 2002).

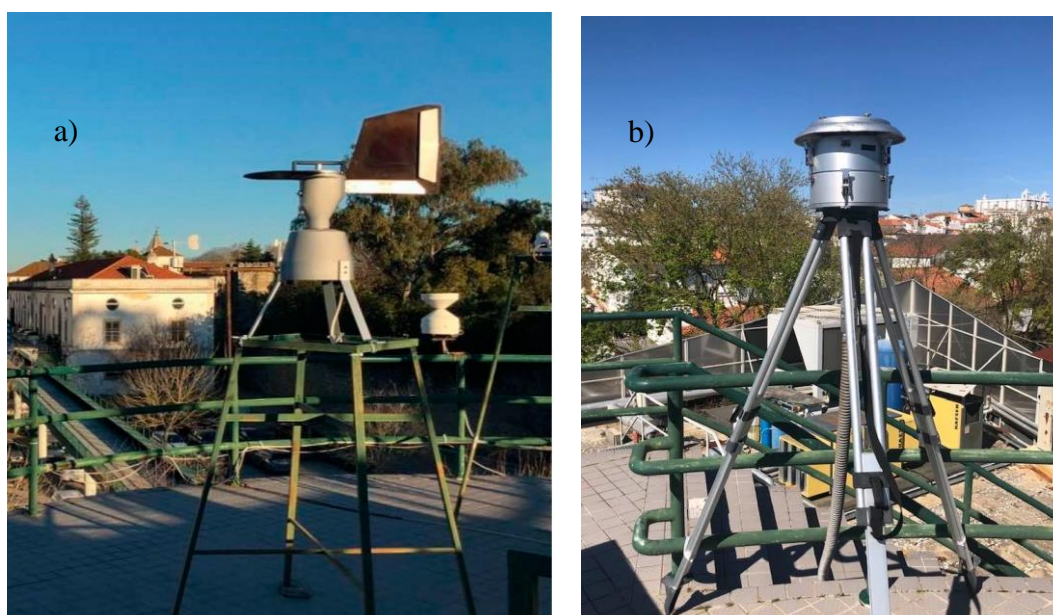


Figura 2: Métodos de amostragem volumétricos: a) - Captador do tipo Hirst (retirado de Jorge, 2022) e b) captador ChemVol 2400 - High Volume Cascade Impactor (fotografia retirada no Observatório localizado no Colégio António Luís Verney)

Além destes métodos de amostragem aerobiológica existem, ainda, os métodos automáticos. Estes são baseados em 2 princípios de identificação: o reconhecimento por imagem utilizando características morfológicas do bioaerossol; e métodos espectroscópicos (Jorge, 2022).

2.3.2 Monitorização de *black Carbon*

Para a monitorização de *black carbon* existem os monitores de BC, como o MAAP (Multi-angle Absorption Photometer) Modelo 5012, utilizado para recolher dados utilizados neste estudo (Thermo Scientific Inc., 2017). Este é utilizado para monitorizar a concentração de BC no ar, através da utilização de um método ótico, utilizando as propriedades de absorção dos aerossóis de carbono negro (BC) (Zioła et al., 2021). Este método utiliza um fotómetro de absorção com vários ângulos que mede a quantidade de

radiação transmitida e dispersa por um filtro de fibra de vidro carregado de partículas (Petzold & Schönlinner, 2004).

O MAAP é composto por uma bomba de vácuo que aspira o ar através de uma chaminé até um filtro de fibra de vidro onde as partículas se depositam (Figura 4) (Thermo Fisher Scientific Inc., 2017). Na câmara de detecção, existe uma fonte de luz com um comprimento de onda específico (637 nm) para interferir com as partículas de BC, ou seja, só as partículas de BC é que são medidas (Figura 3) (Thermo Fisher Scientific Inc., 2017). Esta luz transmitida para a parte da frente e refletida na parte de trás do filtro é medida pelos foto-detetores existentes (Thermo Fisher Scientific Inc., 2017). O filtro de fibra de vidro avança automaticamente tendo em conta um valor limite de partículas depositadas, estipulado no equipamento, ou seja, se existir uma maior massa de partículas de BC no ar o filtro avança mais rapidamente (Thermo Fisher Scientific Inc., 2017).

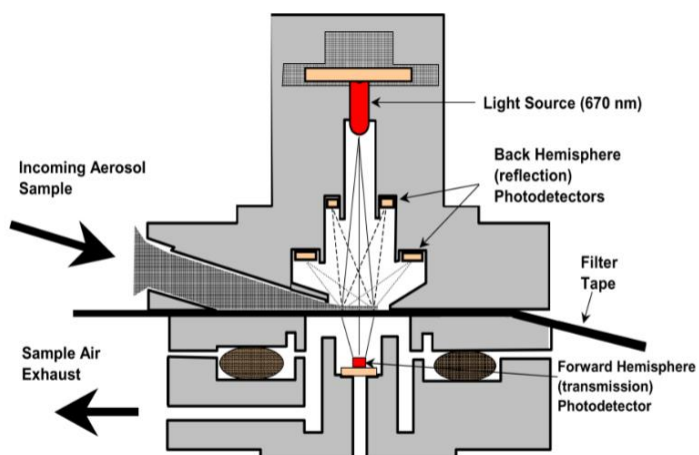


Figura 3: Câmara de detecção existente no MAAP Model 5012. Retirado de Thermo Fisher Scientific Inc., 2017.

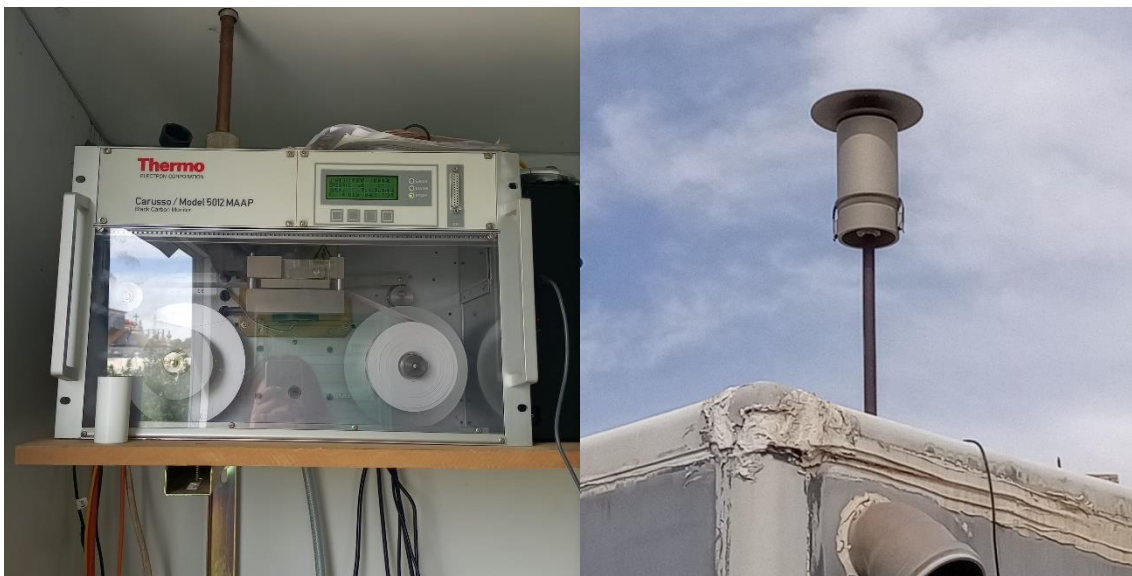


Figura 4:MAAP (Multi-angle Absorption Photometer) Model 5012.
Fotografia tirada no Observatório localizado no Colégio Luís António Verney.

Outros métodos para a monitorização da matéria particulada são os métodos bioquímicos, como ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ou a monitorização de moléculas indicadoras como a concentração de proteína no ar. A concentração de proteína no ar pode ser utilizada como marcador para bioaerossóis, nomeadamente o pólen, uma vez que segundo bibliografia existe uma correlação positiva entre o índice polínico total e a proteína total. Uma limitação deste método indireto de monitorização dos bioaerossóis é que esta correlação só existe na época polínica, quando existem valores elevados de pólen (Arriegas et al., 2017).

A monitorização e a investigação sobre os efeitos dos aerossóis na saúde humana é uma área interdisciplinar uma vez que é necessário perceber a emissão, formação, transporte, deposição e abundância dos compostos tóxicos e alergénicos que compõem os mesmos; é necessário desenvolver métodos analíticos para a quantificação e identificação desses compostos; é necessário quantificar a toxicidade e a alergenicidade; é necessário realizar estudos epidemiológicos com vista a investigar as características e os padrões de saúde em determinadas populações e é necessário também investigar os mecanismos e os processos moleculares dos efeitos destes compostos na saúde humana (Shiraiwa et al., 2012).

2.4 Epitélio respiratório

O epitélio respiratório está constantemente exposto a PM que são inalados do ambiente que nos rodeia, durante a respiração (Tam et al., 2011). Por esta razão este epitélio desempenha um papel fundamental na manutenção do normal funcionamento das vias respiratórias, desde a traqueia até aos alvéolos. Os poluentes ambientais podem provocar uma desregulação da função epitelial das vias respiratórias. Essa desregulação pode contribuir para a patogénese das principais doenças pulmonares, como a asma (Tam et al., 2011). Este epitélio é composto por vários tipos de células diferentes, sendo que o tipo mais predominante de células nas vias respiratórias são as células ciliadas que possuem cerca de 300 cílios por célula e o seu papel principal é transportar o muco do pulmão para a garganta (Figura 5) (Knight & Holgate, 2003).

Outro tipo de células são as células mucosas ou células de Goblet, estas são caracterizadas pela sua forma e pelos seus grânulos contendo mucina, segregados com a finalidade de prender os objetos estranhos ao lúmen das vias respiratórias (Knight & Holgate, 2003). As células serosas são muito semelhantes às células mucosas, contudo a composição dos grânulos que segregam é diferente (Knight & Holgate, 2003).

As células basais são ubíquas neste epitélio, contudo o seu número diminui em função do tamanho das vias respiratórias. Estas células são as únicas que estão firmemente ligadas à membrana basal devido à expressão de hemidesmosomas. Devido a esta característica, estas células fazem parte da ligação das outras células à membrana basal. Segundo bibliografia, estas células segregam moléculas bioativas, como citocinas (Knight & Holgate, 2003).

As células de Clara existem nos brônquios e apresentam um papel secretor, contudo pensa-se que estas também têm a capacidade de metabolizar certos compostos xenobióticos e antiproteases específicas (Knight & Holgate, 2003).

Além dos tipos de células previamente descritos, existe ainda o sistema de células pulmonares neuroendócrinas (PNEC), que são comunicadores chave entre o sistema imunitário e o sistema nervoso (Davis & Wypych, 2021; Knight & Holgate, 2003; Tam et al., 2011). Este sistema de células representa um nicho para a regeneração epitelial das vias respiratórias uma vez que os danos epiteliais podem desencadear estas células para atuar como células estaminais, facilitando a reparação dos tecidos. O PNEC atua na imunidade

através da secreção de vários produtos que vão interagir com células estruturais e imunitárias (Davis & Wypych, 2021; Tam et al., 2011).

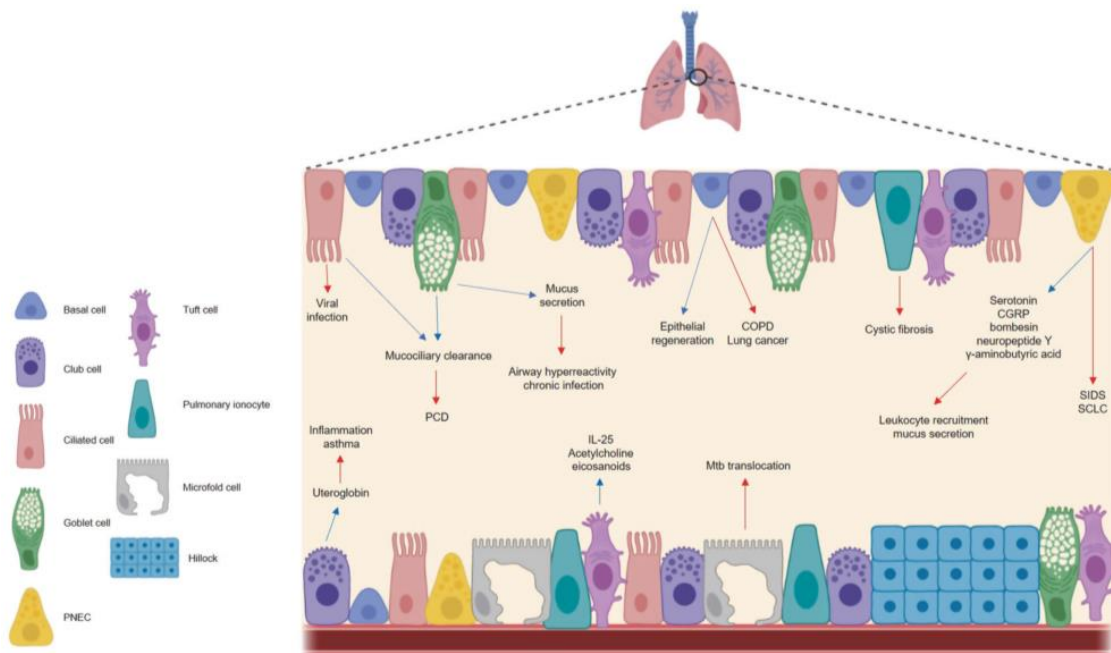


Figura 5: Diferentes tipos de células existentes no epitélio pulmonar. Retirado de Davis & Wypych, 2021

2.5 Mecanismos de resposta à matéria particulada

A imunidade pulmonar é um processo complexo, que tenta preservar a capacidade dos pulmões responderem adequadamente aos agentes patogênicos invasores. Os mecanismos de defesa inata são compostos pela barreira epitelial, o elevador mucociliar, fatores humorais, como peptídeos antimicrobianos, proteínas complementares e proteínas surfactantes, e células inatas como macrófagos, células dendríticas, monócitos, neutrófilos, células natural killer, basófilos, mastócitos, entre outras. A resposta imune adquirida é composta por linfócitos T e B, formação de granulomas e respostas mediadas por anticorpos (Beamer & Shepherd, 2013).

A inflamação aguda é muito importante para a defesa inata do organismo, contudo quando esta não é justificada pode resultar na destruição dos tecidos e, conseqüentemente, em doenças respiratórias. O mesmo acontece com as cascatas anti-inflamatórias que apesar de suprimirem a intensidade da resposta inata, quando não são contidas podem contribuir para a reparação anormal do problema existente e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de doenças fibróticas. Posto isto, o equilíbrio entre as células pró e anti-inflamatórias e os seus mediadores associados influencia diretamente o resultado da doença, uma vez que muitas doenças são caracterizadas pela acumulação anormal de

células imunitárias inatas/ adquiridas no alvéolo e no parenquima (Beamer & Shepherd, 2013).

O epitélio pulmonar funciona como uma barreira física e imunológica contra vários poluentes e, por isso, está em constante contacto com agentes estranhos ao nosso organismo (Tam et al., 2011). Este contacto pode exacerbar a suscetibilidade deste epitélio a infeções como resposta a agentes patogénicos (Aghapour et al., 2022).

A inalação prolongada, direta ou indireta, de muitos dos poluentes atmosféricos é um dos principais fatores de risco para a disfunção da barreira epitelial. Esta disfunção pode facilitar a invasão por agentes patogénicos e, assim, contribuir para o desenvolvimento de doenças pulmonares como a asma e a DPOC (Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica) (Aghapour et al., 2022). Alguns estudos in vitro demonstraram que as exposições curtas e repetidas a concentrações de PM_{2,5} subtóxicas, induzem a rutura da barreira epitelial das vias respiratórias, através da desregulação das *tight junctions* e da E-caderina e do aumento da permeabilidade paracelular (Aghapour et al., 2022).

As AECs, células epiteliais das vias respiratórias têm a função de proteger a camada submucosal de partículas estranhas, alergénios e agentes patogénicos respiratórios, através da formação de barreiras físicas que incluem a formação de *tight junctions* (TJs) e junções aderentes (AJs) entre células adjacentes. No lado apical, as TJs incluem diversas proteínas entre as quais se contam as claudinas, ocludinas, tricelulinas, entre outras. No lado basolateral, as AJs incluem a proteína transmembranar E-caderina. As TJs funcionam como poros que regulam a passagem de iões e pequenos péptidos entre as células, enquanto as AJs ligam as células adjacentes dificultando a migração celular e facilitando a formação de outros complexos juncionais. Em conjunto, ambas as junções mantêm o epitélio protegido contra a penetração de partículas estranhas e agentes patogénicos. Apesar de todas as células expressarem estas junções, são as células epiteliais, em contacto direto com o ambiente externo, as mais suscetíveis à disfunção da barreira (Aghapour et al., 2022).

Segundo a bibliografia, a perda da junção entre células devido à diminuição da expressão de TJs e AJs, em resultado por exemplo do contacto com poluentes atmosféricos, tem sido observada em diversas doenças pulmonares, como asma e DPOC. Os danos epiteliais e a perda de função de barreira levam ao aumento da absorção de antigénios, ao aumento de células imunitárias apresentadoras de antigénios, designadamente as células

dendríticas, e ao aumento da atividade pró-inflamatória do epitélio (REF), originando lesão do mesmo e consequente desenvolvimento de patologia. A figura 6 mostra alguns dos mecanismos subjacentes ao processo inflamatório desencadeado pelos poluentes atmosféricos.

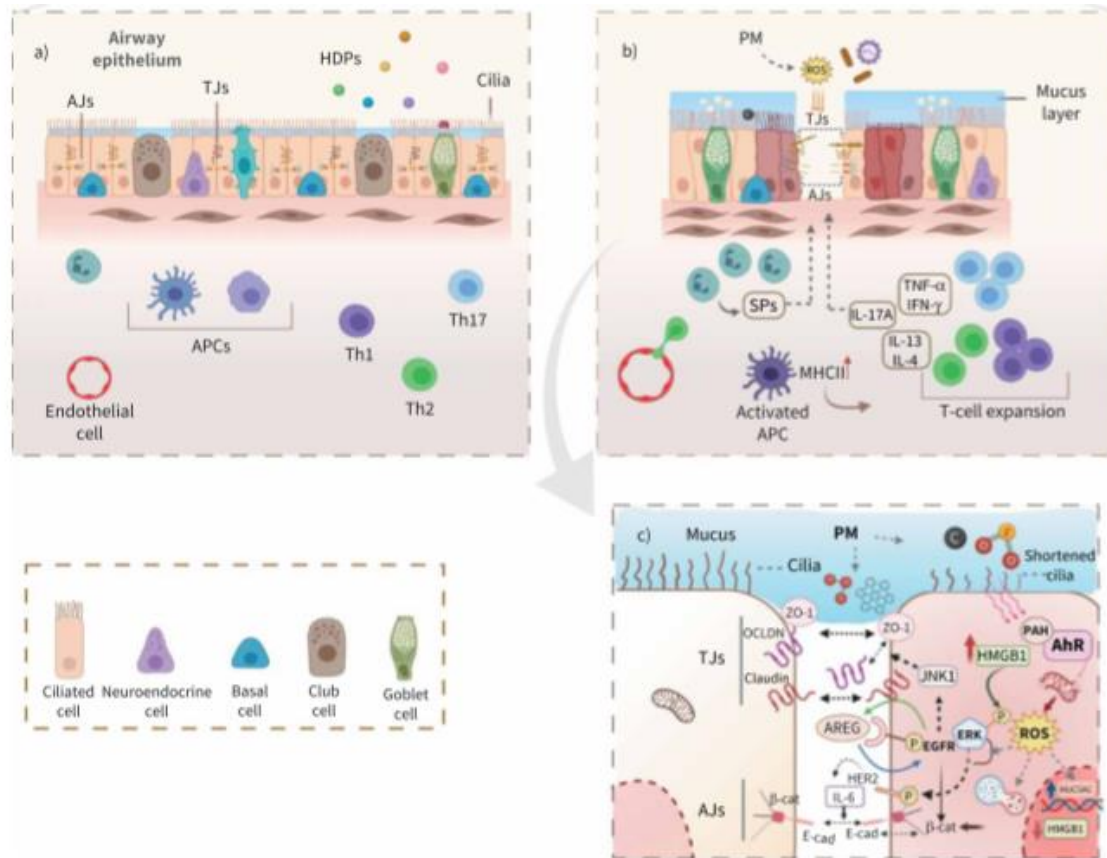


Figura 6: Efeito dos poluentes atmosféricos no epitélio das vias respiratórias. a) representação do epitélio das vias respiratórias saudáveis; b) efeito dos poluentes nas AJs e nas TJs; c) efeito dos poluentes mediados pelo AhR. Adaptado de Aghapour et al, 2020.

São diversos e complexos os mecanismos subjacentes à ação de compostos tóxicos ou sensibilizantes, que contactam com o epitélio respiratório. As células epiteliais possuem diversos tipos de receptores envolvidos no reconhecimento de sinais de patógenos e perigo, designadamente, as famílias de receptores Toll-like (TLR, Toll-like receptors), NOD-like (NODr, Nod-like receptors) e os receptores de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (AhR, *Aromatic hydrocarbon receptors*), desencadeando uma cascata de eventos que conduzem à resposta inflamatória. A família TLR e NODr estão envolvidos no reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a perigo (DAMPs) (Aghapour et al., 2022).

Alguns exemplos são os recetores “toll like” (TLRs), os recetores ativados por proteases (PARs), recetores purinérgicos e proteínas citosólicas. Estes recetores induzem a mudança do comportamento celular de várias formas de modo a eliminar os possíveis patogénios. Por exemplo, a ativação de certos canais iónicos através destes recetores pode induzir a secreção de fluido com a libertação de mucina e o aumento do batimento ciliar de modo a transportar o corpo estranho (Randell et al., 2009).

A ativação destes recetores pode, também, induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que atraem neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos que ajudam a eliminar os agentes patogénicos (Randell et al., 2009).

Os DAMPs são moléculas libertadas após o stress celular ou a lesão dos tecidos, estes são considerados sinais de perigo endógeno, pois desencadeiam respostas inflamatórias não-infecciosas, resultantes da ativação do sistema imunológico inato (Aghapour et al., 2022).

Os efeitos da PM dependem da sua natureza química e bioquímica, variável de acordo com a fração em causa ((Fröhlich-Nowoisky et al., 2016)).

Existem 2 mecanismos de interação entre o BC existente no ar e as células do epitélio respiratório. O primeiro é mediado pelo contacto direto com as células do epitélio, levando à geração de ROS, à hiperplasia das células, à morte celular ou à apoptose do epitélio das vias respiratórias e outras células adjacentes. O outro mecanismo envolve a resposta imunitária sistémica, nomeadamente a inflamação, resultando na remodelação dos tecidos e na formação de fibrose que pode causar problemas respiratórios e disfunções pulmonares. Estes mecanismos contribuem principalmente para o aparecimento de asma e DPOC, como comprovado em inúmeros estudos (Niranjan & Thakur, 2017). Acredita-se que o stress oxidativo causado pelo BC está ligado à resposta inflamatória existente nos pulmões, resultando no desenvolvimento das doenças respiratórias devido ao facto desta resposta causar danos graves nas funções pulmonares. Apesar de os mecanismos pelos quais estes danos são causados ainda não estarem devidamente estudados, acredita-se que um dos principais sintomas de uma resposta inflamatória disfuncional é a remodelação e o desenvolvimento de fibrose tecidual devido à acumulação de fibras de colagénio (Niranjan & Thakur, 2017).

Em zonas urbanas, componentes orgânicos da PM fina e ultrafina derivados de carbono, como hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH) são responsáveis pelos danos oxidativos. Estes induzem espécies reativas de oxigénio nas AECs através do recetor aril

hidrocarboneto (AhR) e, conseqüentemente da ativação do citocromo p450, como observado em AECs cultivados em cultura celular em *air-liquid interface* (Aghapour et al., 2022). O recetor aril hidrocarboneto (AhR) é um recetor expresso em muitas células imunitárias e tecidos humanos, como os pulmões. Este recetor é um recetor de transcrição dependente do ligando que participa no metabolismo xenobiótico e, também, na homeostase normal, organogénese e ativação do sistema imunitário. Este recetor é expresso em células envolvidas em respostas imunitárias inatas e em células que são cruciais para a imunidade adquirida (Beamer & Shepherd, 2013).

Como o AhR foi identificado como sendo o principal regulador da função de barreira da mucosa respiratória e como as respostas mediadas por este recetor são muito importantes, o sistema respiratório vai ser sensível a qualquer alteração na expressão ou na função do AhR. Segundo estudos utilizando modelos animais descobriu-se que os pulmões são sensíveis aos ligandos do AhR e que este modula a resposta imunitária em certas doenças respiratórias, como a asma e a DPOC (Beamer & Shepherd, 2013).

Os componentes inorgânicos existentes na PM fina, como metais de transição e nanopartículas têm uma atividade radical livre e, por isso, podem aumentar a carga oxidativa das células pulmonares. A PM₁₀ é constituída por metais de transição que, segundo bibliografia conseguem induzir stress oxidativo nas células pulmonares, quer através da atividade radical direta livre ou através do aumento da peroxidação lipídica nos pulmões (Aghapour et al., 2022).

A perda da função de barreira devido aos poluentes existentes no ar podem levar a uma alteração das respostas imunitárias, o que pode levar a uma maior suscetibilidade à infeção e à patogénese de doenças respiratórias. Alguns dos mediadores imunitários como citocinas, quimiocinas e proteases produzidas por células imunitárias inatas podem contribuir para a perda da barreira epitelial. Com isto concluímos que os poluentes atmosféricos podem levar à perturbação da barreira epitelial das vias respiratórias de 2 formas distintas: através da perturbação dos contactos celulares e da destruição de TJs e AJs e através do estímulo da libertação de mediadores imunitários, especialmente em exposições a longo prazo pois estas exposições podem induzir respostas pró-inflamatórias exageradas (Aghapour et al., 2022).

O PM_{2,5} induz o aumento das interleucinas-1 através da ativação exagerada de ROS mitocondrial no tecido pulmonar. Estas interleucinas regulam direta ou indiretamente a

função de barreira das vias respiratórias, sendo produzidas em resposta aos poluentes atmosféricos nos AECs. Esta ativação exagerada das interleucinas-1 foi observada em estudos doentes com doenças respiratórias, como asma e DPOC. Estas interleucinas induzem também uma produção aumentada de muco, que em conjunto com a disfunção ciliar induzida pelos poluentes atmosféricos pode levar à obstrução das vias respiratórias (Aghapour et al., 2022).

Após a exposição aos poluentes atmosféricos parece existir um aumento da produção de ROS (espécies reativas de oxigénio) e este aumento pode ser um mecanismo chave na disfunção da barreira epitelial das vias respiratórias. Este aumento pode ser devido à atividade radical direta dos componentes existentes na $PM_{2,5}$, à ativação de sistemas celulares que geram ROS como o NADPH ou à alteração da função mitocondrial. Segundo estudos realizados em modelos animais acredita-se que elevadas concentrações de $PM_{2,5}$ conseguem reduzir os mecanismos antioxidantes como a superóxido dismutase (SOD) que, em condições normais, seriam ativados em resposta ao stress oxidativo (Aghapour et al., 2022).

Existem algumas citocinas que são capazes de induzir efeitos protetores na barreira epitelial. Por exemplo, a IL-33 é uma das citocinas que, em estudos com modelos de lesões pulmonares induzidas pelo ozono *in vivo*, foi libertada após a exposição ao ozono e à PM_{10} e $PM_{2,5}$ com efeitos protetores para a barreira epitelial das vias respiratórias, restaurando a expressão de certas proteínas como a E-caderina e a claudina-4. Segundo a bibliografia pensa-se que esta expressão seja restaurada através da regulação do recrutamento de neutrófilos (Aghapour et al., 2022).

Além da função de barreira, este epitélio também consegue responder a vários estímulos com a libertação de fatores solúveis importantes para a resposta imune. Um exemplo, bem estudado, é o fumo do tabaco. Este desencadeia a produção de interleucinas 1b e 8 através de células epiteliais bronquiais e a produção de TNF- α e interleucina 6 através de macrófagos alveolares (Tam et al., 2011).

Existem outras alterações na função epitelial que são observadas nas doenças pulmonares como disfunção devido à perda de cílios, batimento ciliar deficiente e hipersecreção de muco que vai contribuir para a obstrução das vias respiratórias (Aghapour et al., 2022).

Relativamente ao contacto das mucosas respiratórias com os alérgenos existentes no pólen anemófilo, quando esse contacto ocorre pela primeira vez dá-se a fase de

sensibilização. Nesta primeira fase, quando o alérgeno entra em contacto com a mucosa respiratória, o antígeno é fagocitado pelas células dendríticas. Estas células dendríticas migram até ao órgão linfóide secundário para proceder à apresentação antigénica passando da fase imatura para a fase madura devido ao facto de apresentarem o antígeno no centro germinativo dos linfócitos T e B, estimulando a diferenciação das células T em células “T-helper”. Estas células vão se diferenciar em células Th₂, que segregam citocinas IL-4 e IL-13. Estas por sua vez estimulam os linfócitos B específicos a diferenciarem-se em células B secretoras de IgE. As IgE vão ser segregadas pelos linfócitos B específicos e vão ligar-se a um recetor de alta afinidade existente nos mastócitos, ficando assim estes revestidos de IgE específicas. Devido a este revestimento, os mastócitos vão ser considerados sensibilizados a este alérgeno (Jorge, 2015).

Quando um indivíduo é exposto sucessivamente ao antígeno ocorre a fase efetora. Em indivíduos sensibilizados para os alérgenos do pólen, a reação alérgica que ocorre quando os grãos de pólen atingem as vias respiratórias é mediada por IgE, tendo como sintomas mais frequentes espirros intensos, congestionamento nasal, prurido faríngeo, lacrimejo e tosse. Quando os grãos de pólen atingem as vias respiratórias humanas de indivíduos sensibilizados, estes vão ligar-se a IgE específicas associadas a recetores de alta afinidade existentes nos mastócitos. Este complexo vai desencadear a fosforilação de resíduos de tirosina que leva à desgranulação dos mastócitos e à libertação de mediadores. Estes mediadores podem ser aminas vasoativas e mediadores lipídicos que vão desencadear uma reação de hipersensibilidade imediata ou podem ser citocinas, como a IL-13, que são libertadas tardiamente tendo como função principal estimular as células epiteliais das vias respiratórias para a criação de muco (Jorge, 2015, 2022).

Tal como a alergia a pólen, a alergia aos esporos fúngicos também é mediada por IgE, sendo que podem estar associados a reações envolvendo as vias respiratórias inferiores (Żukiewicz-Sobczak, 2013)

Este epitélio tem também um papel ativo nas funções imunitárias inatas do organismo humano, através de mecanismos que reconhecem agentes patogénicos responsáveis por, por exemplo, infeções bacterianas. Estes mecanismos são chamados padrões moleculares associados a patogénios (PAMPs), normalmente estes padrões moleculares são moléculas associadas à sobrevivência dos microrganismos (Randell et al., 2009; Tam et al., 2011).

3. Objetivos

Face ao exposto, o objetivo principal deste estudo foi estudar a qualidade bioquímica do ar atmosférico ao longo do ano e avaliar os seus potenciais impactos na saúde respiratória humana.

Para atingir este objetivo, procurou-se:

- i) Esclarecer o perfil sazonal de diversos aerossóis na PM – pólen, esporos fúngicos e BC;
- ii) Determinar os conteúdos proteico e lipídico da PM ao longo do ano;
- iii) Estudar a relação do conteúdo proteico e lipídico com os bioaerossóis comuns, pólen e fungos, e com o BC;
- iv) Discutir os impactos na saúde respiratória, tendo em conta a exposição a PM com diferente composição química e bioquímica.

4. Metodologia

A componente experimental deste estudo foi dividida em 3 partes que consistem em: a) análise do conteúdo em bioaerossóis; b) análise da composição de PM existentes nas amostras de ar atmosférico, no que concerne ao conteúdo em proteína, lípidos e BC e da sua relação com os bioaerossóis e c) na avaliação do efeito das PM com composição diferente na função do epitélio pulmonar.

4.1 Caracterização da área de estudo

As amostras utilizadas para este estudo foram recolhidas no Observatório das Ciências Atmosféricas da Universidade de Évora, do Instituto de Ciências da Terra, instalado no Colégio Luís António Verney da Universidade de Évora, em Évora. Estas foram recolhidas durante os períodos de janeiro a junho de 2018 e julho a dezembro de 2020.

A região de Évora está localizada no interior do sul de Portugal e em 2021, a sua população residente era de 53 591 habitantes (PORDATA, 2021). Esta cidade apresenta um clima temperado com verões quentes e secos, com uma temperatura média anual do ar de 16,2°C. Normalmente, a temperatura do ar mais elevada é registada no mês de agosto e a mais baixa é registada no mês de janeiro.

O Observatório das Ciências Atmosféricas da Universidade de Évora está localizado no centro urbano da cidade, na zona histórica (marcado no mapa com um círculo amarelo). Na envolvente do Observatório existe um jardim, o Jardim Público de Évora; existem habitações residenciais e espaços comerciais e a cerca de 300m encontra-se uma das principais entradas e uma das principais avenidas da cidade (Figura 7) (Google, 2022).



Figura 7: Mapa mostrando a envolvente do Observatório. Adaptado de Google Maps, 2022.

4.2 Material, equipamento e reagentes utilizados

O material, equipamento e reagentes utilizados neste estudo estão descritos no anexo I. ~

4.3 Procedimento experimental

4.3.1 Colheita das amostras de PM

As amostras de PM foram recolhidas utilizando um captador ChemVol 2400, instalado no topo do Observatório das Ciências Atmosféricas (EVASO), a cerca de 10m do chão, localizado no Colégio Luís António Verney, na Universidade de Évora.

Este captador aspira o ar a uma velocidade de 800L/min. e as partículas são depositadas em 2 filtros de diferentes dimensões, M e XL, colocados em cascata, sendo que o filtro M capta partículas entre 2,5 μm e 10 μm e o filtro XL capta partículas maiores que 10 μm . Os filtros são recolhidos, divididos em 3 partes e são armazenados num congelador até posterior análise.

Como teríamos de realizar várias extrações, o terço do filtro utilizado para este estudo foi cortado em 3 partes iguais e cada parte foi pesada. Duas dessas partes foram utilizadas

para a quantificação proteica e lipídica, respetivamente. A última parte foi guardada para outra possível análise.

4.3.2 Colheita de dados de BC

Os dados de BC foram medidos utilizando um MAAP Model 5012, instalado no mesmo observatório localizado na Universidade de Évora.

Este instrumento aspira o ar através de uma chaminé e as partículas são depositadas num filtro de fibra de vidro existente na câmara de deteção. Na mesma câmara existe uma fonte de luz com um comprimento de onda de 637nm, específico para detetar e medir partículas de BC. Os valores de concentração mássica são expressos em microgramas de BC por metro cúbico de ar ($\mu\text{g}/\text{m}^3$).

4.3.3 Colheita de bioaerossóis.

As amostras de pólen e esporos fúngicos foram recolhidas utilizando um coletor do tipo Hirst, instalado no topo do Observatório das Ciências Atmosféricas (EVASO), localizado no Colégio Luís António Verney, na Universidade de Évora. Este captador aspira o ar a uma velocidade de 10L/min. e as partículas são depositadas numa fita adesiva contendo Melinex. Ao fim de 7 dias a fita foi retirada e tratada em laboratório de acordo com métodos padronizados pela Rede Espanhola de Aerobiologia (Hirst, 1991; *Rede Espanhola de Aerobiologia*, 2022).

4.3.4 Seleção das amostras a analisar

Para atingir os objetivos propostos, começamos por selecionar as amostras de ar atmosférico que iríamos analisar. Para isso procurou-se combinar os dados de BC diários com as amostras de ar atmosférico existentes no laboratório de Aerobiologia.

Depois de verificarmos ambos os dados, optámos por analisar o primeiro semestre de 2018 (janeiro a junho) e o segundo semestre de 2020 (julho, agosto, novembro e dezembro). Escolhemos esta janela temporal de modo que fosse possível analisar dados das 4 estações existentes uma vez que os bioaerossóis existentes no ar diferem de acordo com a estação do ano. Na Tabela 1 estão enumeradas as amostras analisadas, o período de colheita, o número de dias de colheita e o material colhido em cada amostra. No ano

de 2018 foi escolhido um filtro por semana durante o intervalo de janeiro a junho e no ano de 2020 foi escolhido, também, um filtro por semana durante o intervalo de julho a agosto e de novembro a dezembro de 2020.

Tabela 1: Amostras analisadas, o período de colheita, o número de dias de colheita e o material colhido em cada amostra.

Amostra	Período de colheita	Nº de dias de colheita	Material Analisado
362 M,XL/2018	27/12-02/01/2018	6	Proteína; lípidos
8 M,XL/2018	08/01-10/01/2018	3	Proteína
14 M,XL/2018	14/01-14/01/2018	3	Proteína
23 M,XL/2018	23/01-25/01/2018	3	Proteína
29 M,XL/2018	29/01-31/01/2018	3	Proteína
40 M,XL/2018	09/02-13/02/2018	5	Proteína; lípidos
45 M,XL/2018	14/02-15/02/2018	2	Proteína
55 M,XL/2018	22/02-26/02/2018	5	Proteína
64 M,XL/2018	05/03-07/03/2018	3	Proteína
75 M,XL/2018	16/03-19/03/2018	4	Proteína; lípidos
79 M,XL/2018	20/03-23/03/2018	4	Proteína; lípidos
90 M,XL/2018	31/03-02/04/2018	3	Proteína
95 M,XL/2018	05/04-06/04/2018	2	Proteína
109 M,XL/2018	19/04-19/04/2018	1	Proteína
114 M,XL/2018	24/04-24/04/2018	1	Proteína
122 M,XL/2018	02/05-02/05/2018	1	Proteína
127 M,XL/2018	07/05-07/05/2018	1	Proteína; lípidos
137 M,XL/2018	17/05-17/05/2018	1	Proteína; lípidos
143 M,XL/2018	23/05-24/05/2018	2	Proteína
150 M,XL/2018	30/05-31/05/2018	2	Proteína; lípidos
162 M,XL/2018	11/06-11/06/2018	1	Proteína
176 M,XL/2018	25/06-25/06/2018	1	Proteína
183 M,XL/2020	01/07-07/07/2020	7	Proteína
190 M,XL/2020	08/07-14/07/2020	7	Proteína
197 M,XL/2020	15/07-21/07/2020	7	Proteína
204 M,XL/2020	22/07-28/07/2020	7	Proteína; lípidos
211 M,XL/2020	29/07-04/08/2020	7	Proteína
218 M,XL/2020	05/08-11/08/2020	7	Proteína
225 M,XL/2020	12/08-18/08/2020	7	Proteína
304 M,XL/2020	30/10-05/11/2020	7	Proteína
311 M,XL/2020	06/11-12/11/2020	7	Proteína
318 M,XL/2020	13/11-23/11/2020	11	Proteína
329 M,XL/2020	24/11-27/11/2020	4	Proteína
333 M,XL/2020	28/11-03/12/2020	6	Proteína
339 M,XL/2020	04/12-10-12/2020	7	Proteína; Lípidos
346 M,XL/2020	11/12-17-12/2020	7	Proteína
353 M,XL/2020	18/12-22/12/2020	5	Proteína
358 XL/2020	23/12-29/12/2020	7	Proteína
365 M,XL/2020	30/12-31/12/2020	8	Proteína; Lípidos

4.3.5 Determinação do conteúdo em bioaerossóis

Para a determinação do conteúdo em bioaerossóis realizou-se contagens de grãos de pólen e de esporos fúngicos por microscopia ótica (ampliação 400x) seguindo metodologia padronizada e utilizada pela Rede Espanhola de Aerobiologia (Pólen Alert, 2021; *Rede Espanhola de Aerobiologia*, 2022). As concentrações de grãos de pólen e esporos fúngicos foram expressas em pólen por metro cúbico de ar (pólen/m³) e esporos fúngicos por metro cúbico de ar (esporos fúngicos/m³), respetivamente.

4.3.6 Determinação da proteína solúvel na PM

4.3.6.1 Extração da proteína solúvel

Para a determinação da proteína solúvel, realizou-se uma extração, utilizando bicarbonato de amónio, 100 mM, pH=8,11-8,15, como tampão de extração. Os filtros M e XL foram extraídos utilizando, respetivamente, 6 e 15mL de tampão. A extração ocorreu durante 4 horas, com agitação por inversão, no escuro. No fim das 4 horas, as amostras foram sujeitas a 2 centrifugações a 2000 e 6000 rpm durante, respetivamente, 5 e 10 minutos. Os sobrenadantes foram recolhidos para alíquotas de liofilização, ou seja, foram preparadas alíquotas de 2 e 2,5ml em microtubos de 5ml previamente pesados e os sedimentos foram descartados. Estas alíquotas foram, posteriormente, liofilizadas, durante 72 horas. Depois da liofilização, os microtubos voltaram a ser pesados, de forma a obter a massa de liofilizado.

4.3.6.2 Quantificação da proteína solúvel

A amostra liofilizada foi pesada e ressuspensa em 500 µL de tampão fosfato de sódio alcalino, 10 mM, pH=7,4. Seguidamente, foi realizada a determinação do conteúdo proteico através do método de micro-BCA, utilizando uma curva de calibração com padrões de BSA entre as concentrações de 0,5 e 40 µg/mL, sendo o branco dos ensaios tampão fosfato de sódio alcalino. As amostras foram diluídas em tampão fosfato de sódio alcalino (2x, 5x e se necessário, 10x).

Numa microplaca de 96 poços foram aplicados 150 µL dos padrões, das amostras e do branco, em triplicado. De seguida, adicionou-se 150 µL de reagente de BCA, preparado misturando 25 partes do reagente A, 24 partes do reagente B e 1 parte do reagente C e protegeu-se a placa da luz com papel de alumínio. A placa foi colocada numa placa de

aquecimento durante cerca de 1 hora, a 37°C. Ao fim deste tempo foi realizada a leitura da absorvância num aparelho de leitura de microplacas, a 562 nm, à temperatura ambiente.

4.3.7 Determinação dos lípidos solúveis na PM

4.3.7.1 *Extração e determinação da massa de lípidos solúveis*

Para esta extração, foi utilizado o método de Folch et.al (1957) adaptado (Brum, 2005; FOLCH et al., 1957). Para promover a extração, os filtros foram cortados em pedaços pequenos e, de seguida, foram adicionados 5mL de metanol e foi levado a agitar com magneto. Ao fim de 5 minutos de agitação, foram adicionados 10mL de clorofórmio e agitou-se durante 10 minutos com magneto. De seguida, as amostras foram sujeitas a uma centrifugação de 2000g, durante 5 minutos e foi recolhido o sobrenadante. Os pedaços de filtro foram filtrados utilizando seringas com filtros de seringa (0,2µm de poro) e, ao filtrado, foi adicionado KCl (0,1M), cerca de ¼ do volume da amostra. Sucedeu-se outra centrifugação, a 2000g, durante 5 minutos. A fase clorofórmica foi recolhida para balões de fundo redondo previamente tarados e o solvente foi evaporado em rotavapor, em ambiente de azoto e banho termostaticado a cerca de 37°C. Por fim, o resíduo seco resultante foi lavado com água ultra-pura e evaporado novamente. Os balões com o resíduo seco foram pesados de forma a determinar a massa de lípidos extraídos.

4.3.7.2 *Determinação da composição do extrato lipídico por Cromatografia de camada fina*

Com vista a tentar entender que famílias de lípidos estavam presentes nas amostras de ar atmosférico extraídas, foi realizada uma cromatografia de camada fina (TLC).

A TLC é um método analítico, onde uma fase móvel passa sobre uma fase estacionária, com vista a separar uma mistura de substâncias nos seus componentes (Paula, V. 2012).

Os extratos foram ressuspensos em 250 µL de clorofórmio e, de seguida, foram aplicadas algumas gotas de cada extrato e dos padrões numa placa de TLC previamente marcada (0,5cm). Os padrões utilizados foram ácido oleico, colesterol, oleato de colesterol, trioleína e fosfolípido – dipalmitoil-fosfatidil-colina (DPPC). A placa de TLC foi colocada na câmara de cromatografia, onde previamente foi colocado eluente, e deixou-se desenvolver o cromatograma. Quando o eluente atingiu a linha de topo da placa,

retirou-se a placa da câmara de cromatografia e deixou-se secar ao ar. Por fim, colocou-se o cromatograma na placa de iodo com vista a revelar as bandas e marcou-se a posição das mesmas. As bandas existentes nos extratos foram comparadas com as bandas dos padrões a fim de entender que famílias de lípidos estavam presentes nas amostras.

5. Resultados e Discussão de resultados

5.1 Caracterização sazonal do conteúdo polínico

Na figura 8, está representado o conteúdo polínico dos filtros analisados. Como podemos observar o conteúdo polínico varia ao longo do ano, apresentando valores mais elevados nos meses da primavera. Os valores mais baixos são registados nos meses de julho, agosto, novembro e dezembro.

Para o conteúdo polínico em estudo contribuíram cerca de 15 tipos polínicos diferentes, que apresentam diferentes épocas polínicas. Desses 15 tipos polínicos, existem 5 tipos, que além de serem os mais prevalentes, são os mais importantes do ponto de vista alergológico: *Cupressaceae spp*; *Poaceae spp*; *Platanus spp*; *Quercus spp* e *Olea europaea* (Jorge, 2022).

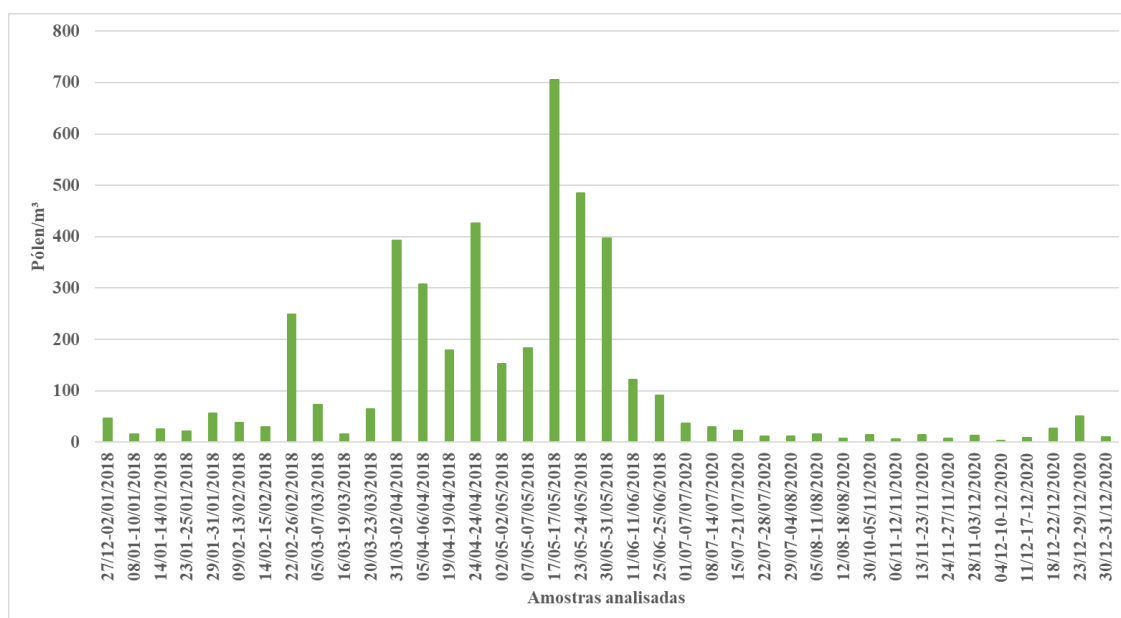


Figura 8: Conteúdo polínico dos filtros analisados.

O conteúdo polínico foi expresso em grãos de pólen por m³.

Posto isto, a distribuição observada deve-se ao facto de os tipos polínicos mais prevalentes apresentarem a sua época polínica nos meses da Primavera, nomeadamente nos meses de março, abril, maio e junho (Polen Alert, 2021).

Segundo estes resultados, o período da primavera é um período propenso para a ocorrência de sintomas de doença respiratória alérgica em indivíduos sensibilizados, devido ao contacto das vias respiratórias com os alergénios existentes nos grãos de pólen inalados durante o processo da respiração. Este contacto do epitélio das vias respiratórias com os alergénios pode contribuir para o aparecimento ou para o agravamento de doenças respiratórias como a asma ou a rinite (Jorge, 2022).

Os grãos de pólen anemófilos apresentam ornamentações na exina específicas de cada tipo polínico. Devido a estas ornamentações, as outras partículas existentes no ar atmosférico podem ser adsorvidas na superfície dos grãos de pólen, sendo assim carregadas por estes até às vias respiratórias, o que pode exacerbar a reação alérgica e o aparecimento/ agravamento de doenças respiratórias (Jorge, 2022)

5.2 Caracterização sazonal do conteúdo em esporos fúngicos

O conteúdo em esporos fúngicos variou ao longo do ano, apresentado valores mais elevados nos meses de verão e outono, tendo um pico no fim do mês de julho. Os valores mais baixos foram registados nos meses de inverno e no início da primavera. Para os filtros de 5 a 6 de abril e do dia 24 de abril de 2018 não existem dados de contagens de esporos fúngicos (figura 9).

Foram identificados 8 esporos fúngicos ao longo do período de estudo, contudo os esporos mais prevalentes e com maior contribuição para os dados em estudo são os esporos de *Cladoporium spp* (Figura 10). Outros esporos fúngicos como os de *Alternaria spp* também são muito prevalentes no ar atmosférico da região de estudo.

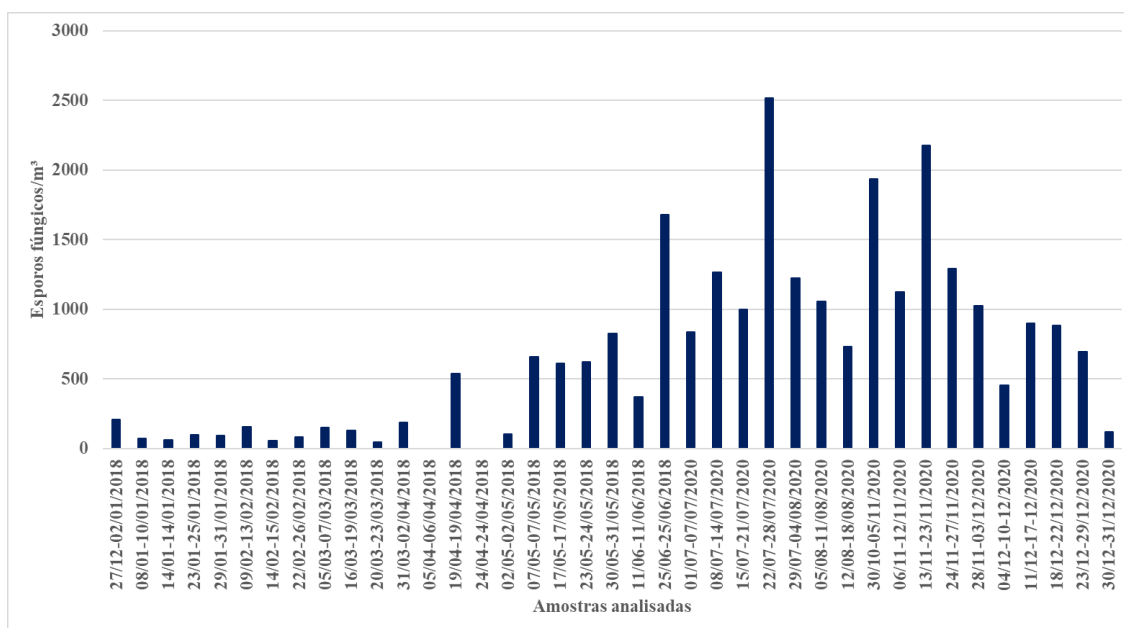


Figura 9: Conteúdo em esporos fúngicos dos filtros analisados. O conteúdo fúngico foi expresso em esporos fúngicos por m³.

Estes resultados estão de acordo com estudos realizados noutras regiões de Portugal, como Lisboa e Porto (Ferro et al., 2019; Oliveira et al., 2007). Segundo estes estudos, o conteúdo em esporos fúngicos no ar atmosférico varia de acordo com a época do ano, sendo os valores mais elevados encontrados durante o verão e o início do outono e os valores mais baixos durante o inverno e o início da primavera. Isto deve-se ao facto deste conteúdo se correlacionar positivamente com a temperatura média do ar, ou seja, se esta aumenta o n^o de esporos fúngicos por m³ de ar também irá aumentar (Ferro et al., 2019; Oliveira et al., 2007; Patel et al., 2018). Outra razão para a diminuição do conteúdo em esporos fúngicos nos meses de inverno é que a chuva intensa tende a limpar os esporos fúngicos existentes na atmosfera. Por isso, valores mais baixos podem ser justificados devido à existência de chuva nestes meses (Oliveira et al., 2010). Isto pode ser comprovado pela comparação da precipitação média e da temperatura média nos 2 períodos. No período em que existe um maior n^o de esporos fúngicos por m³, confirma-se uma temperatura média mais elevada (25,8°C) quando comparada com o período em que existem menos esporos fúngicos por m³ (16,4°C). Por outro lado, quando comparamos a média da precipitação nestes 2 períodos, percebemos que no período em que existem menos esporos fúngicos por m³ a precipitação foi maior (112,1 mm) do que a existente no período em que existem mais esporos fúngicos por m³ (38,4 mm).

Os esporos fúngicos identificados estão de acordo com resultados obtidos em outros estudos realizados em outras cidades de Portugal, nomeadamente em Lisboa e no Porto (Ferro et al., 2019). Segundo Ferro et.al. (2019) os esporos fúngicos de *Cladosporium spp* estão associados a áreas urbanas pois não precisam de vastas extensões de substrato para se desenvolverem. Posto isto, elevadas concentrações deste tipo de esporo fúngico na região de estudo são normais, uma vez que se trata de uma área urbana (Ferro et al., 2019).

Segundo Oliveira et al (2007) os esporos fúngicos de *Cladosporium spp* são os que mais comumente causam doenças alérgicas respiratórias, sendo a principal fonte de alérgenos fúngicos inalados. Apesar da sensibilização a este esporo fúngico ser baixa na Europa, esta sensibilização está significativamente associada ao agravamento da asma e ao desenvolvimento de asma na idade adulta (Oliveira et al., 2007).

Segundo os mesmos autores, também a os esporos de *Alternaria spp* são considerados um dos principais alérgenos presentes no ar atmosférico. A sensibilização a estes esporos está a crescer e é reconhecida como um fator de risco para o desenvolvimento, persistência e gravidade da asma (Ferro et al., 2019; Oliveira et al., 2007).

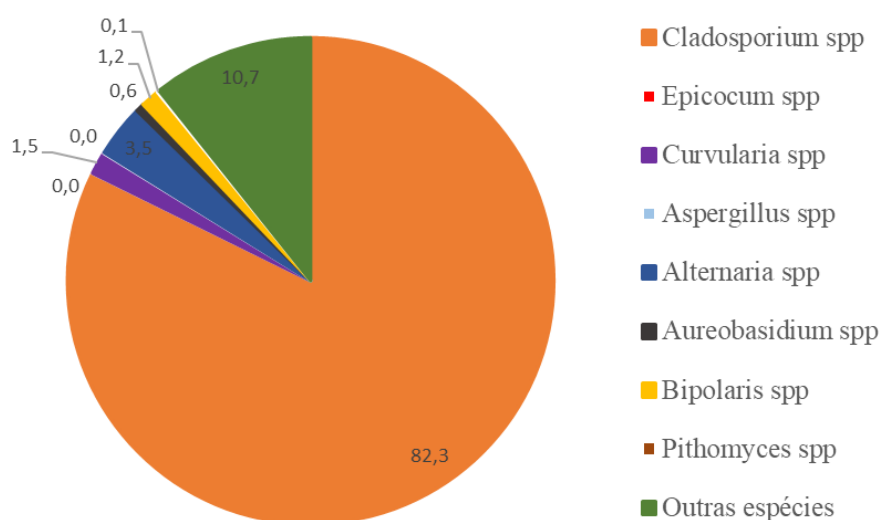


Figura 10: Percentagens de prevalência dos esporos fúngicos identificados nas amostras de ar atmosférico.

Posto isto, os meses de verão e início do outono são uma época propensa a reações alérgicas em indivíduos sensibilizados para estes alérgenos. (Żukiewicz-Sobczak, 2013).

5.3 Caracterização sazonal do conteúdo em *Black Carbon*

Na figura 11 está representada a concentração de BC encontrada no ar no período de estudo. A partir do dia 6 de novembro de 2020 não existem valores de concentração de BC.

A concentração de BC variou ao longo do ano, os valores mais elevados foram registados nos meses de inverno, sendo que o valor mais elevado foi registado no dia 14 de janeiro de 2018, e os valores mais baixos foram registados nos meses de verão. Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores realizados em Portugal e em Espanha (Lyamani et al., 2011; Malico et al., 2017).

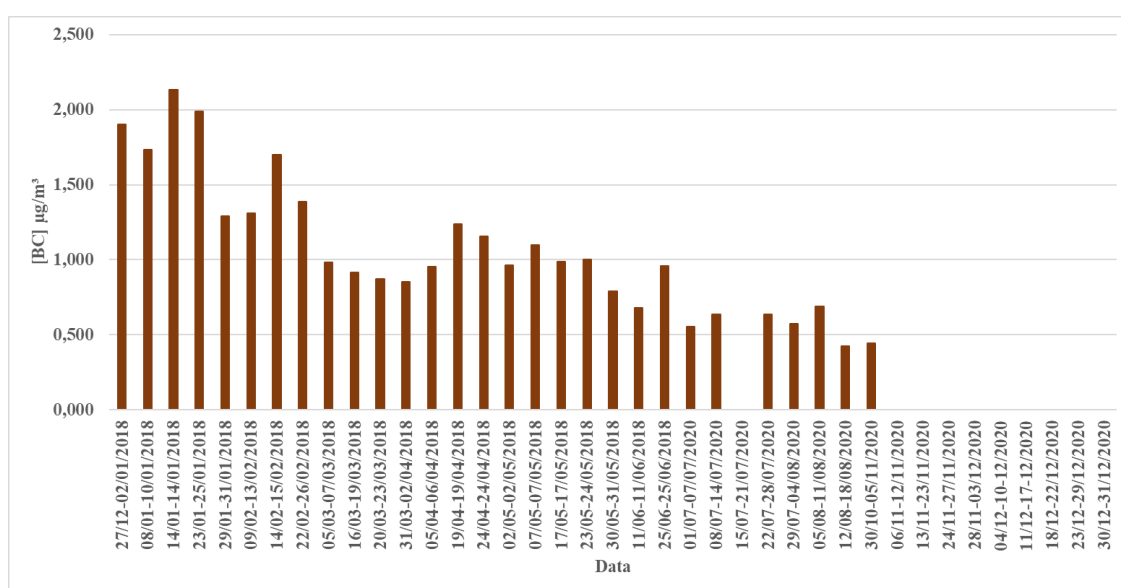


Figura 11: Conteúdo em Black Carbon dos filtros analisados. O conteúdo em Black Carbon foi expresso em microgramas por m3.

Segundo Malico et. al (2017), este aumento durante os meses de inverno é devido não só à queima dos combustíveis fósseis, mas também devido ao aumento de atividades antropogénicas, como a queima de biomassa para aquecimento doméstico, durante os meses mais frios do ano. Durante estes meses esta queima de biomassa é uma importante fonte adicional de BC (Malico et al., 2017).

Segundo Lyamani et. al. (2011), outra causa para o aumento da concentração de BC nos meses de inverno são as condições meteorológicas desfavoráveis como a baixa velocidade do vento e a camada limite atmosférica rasa (Lyamani et al., 2011).

5.4 Determinação da composição bioquímica da PM

5.4.1 Conteúdo proteico

Como representado na figura 12, a concentração total de proteína variou ao longo do período de estudo. Os valores mais elevados de proteína foram detetados nos meses de janeiro e fevereiro e os valores mais baixos foram detetados nos meses de agosto e dezembro. Em mais de metade dos filtros analisados (23 dos 39 filtros) existe uma maior concentração de proteína na fração XL quando comparada com a fração M.

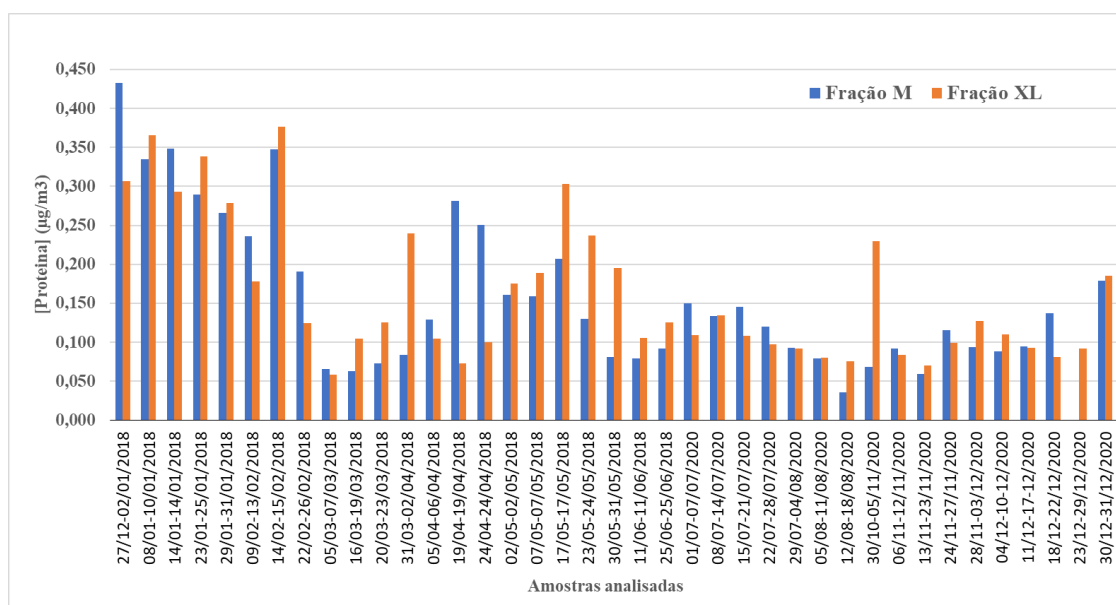


Figura 12: Concentração de proteína nas frações M e XL dos filtros analisados. A concentração de proteína foi expressa em microgramas por m³.

Existe uma correlação positiva significativa entre a fração XL e a fração M ($p < 0,001$), ou seja, quando a concentração de proteína na fração XL aumenta a concentração de proteína na fração M também aumenta (figura 13). Relativamente à concentração total de proteína encontrada durante o período de estudo, cerca de 51% dessa proteína foi encontrada na fração XL e cerca de 49% dessa proteína foi encontrada na fração M. Ou seja, foi encontrada mais na fração que capta matéria particulada de dimensões entre 2,5 e 10 micrómetros.

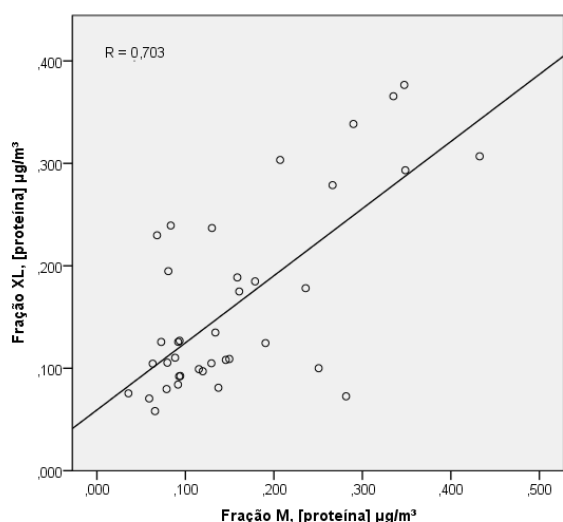


Figura 13: Correlação positiva estatisticamente significativa entre a [proteína] na fração M e na fração XL. A correlação é significativa no intervalo de 99% ($p < 0,0001$).

5.4.2 Conteúdo lipídico

Para a determinação dos lípidos solúveis no ar foram escolhidos casos de estudo, tendo em conta o conteúdo polínico e fúngico, a concentração em BC e o conteúdo proteico. Na Tabela 2 estão representadas as amostras selecionadas de acordo com a sua composição como caso de estudo para determinação de lípidos.

Tabela 2: Amostras selecionadas de acordo com a sua composição como caso de estudo para determinação de lípidos.

Amostra	Pólen/m ³	Esporos fúngicos/m ³	[BC total] µg/m ³	[proteína] µg/m ³	Conteúdo lipídico (g)
362 M/2018	47	209	1,902	0,433	0,007
362 XL/2018	47	209	1,902	0,307	0,045
40 M/2018	39	156	1,311	0,236	0,004
40 XL/2018	39	156	1,311	0,178	0,021
75 M/2018	16	128	0,916	0,063	0,002
75 XL/2018	16	12	0,916	0,105	0,011
79 M/2018	65	35	0,870	0,073	0,106
79 XL/2018	65	35	0,870	0,126	0,052
127 M/2018	183	656	1,099	0,159	0,044
127 XL/2018	183	656	1,099	0,189	0,076
137 M/2018	706	611	0,987	0,207	0,047
137 XL/2018	706	611	0,987	0,303	0,019
150 M/2018	398	825	0,790	0,081	0,014
150 XL/2018	398	825	0,790	0,195	0,008
204 M/2020	12	2515	0,638	0,120	0,008
204 XL/2020	12	2515	0,638	0,097	0,008
339 M/2020	4	452	-	0,088	0,001
339 XL/2020	4	452	-	0,110	0,008
365 M/2020	10	121	-	0,179	0,005
365 XL/2020	10	121	-	0,185	0,005

O conteúdo lipídico dos casos de estudo está representado no Figura 14. De entre os casos de estudo analisados, os filtros da primavera/ verão são os que apresentam uma massa lipídica mais elevada na fração M e os filtros de inverno são os que apresentam uma massa lipídica mais elevada na fração XL.

Pensa-se que este valor elevado de massa lipídica nos meses de primavera/ verão se deva ao elevado conteúdo polínico existente no ar nesse período, uma vez que os grãos de pólen existentes no ar apresentam lípidos na sua composição interna e externa.

Além do pólen, os esporos fúngicos existentes no ar atmosférico também apresentam lípidos na sua composição e, por isso podem ser também uma contribuição para a massa lipídica encontrada.

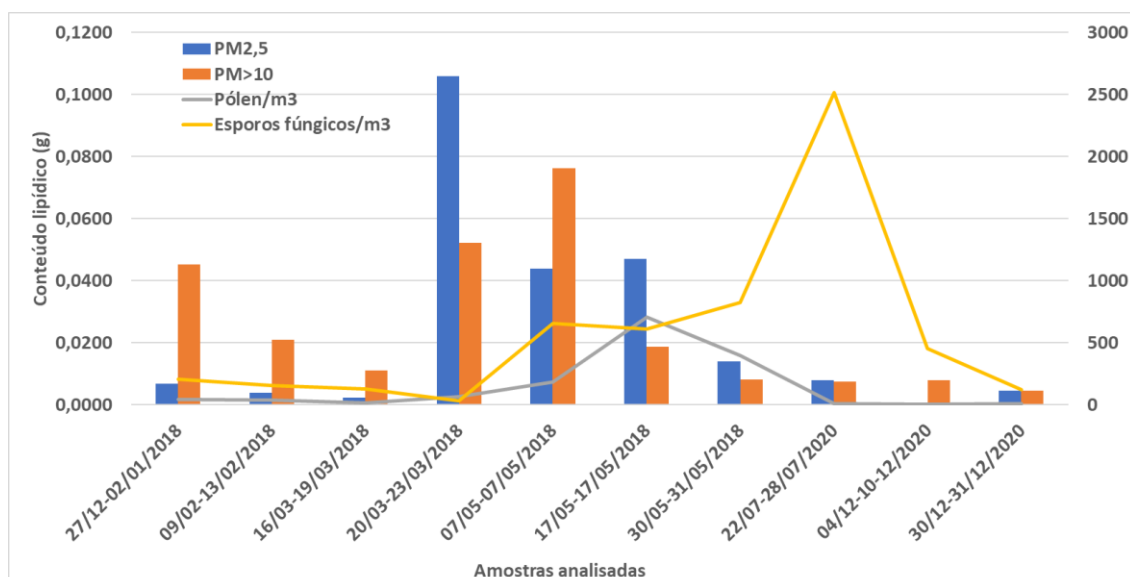


Figura 14: Conteúdo lipídico, polínico e esporos fúngicos encontrado nas frações M e XL dos casos de estudo.

Através das cromatografias de camada fina (TLCs) realizadas observamos que os diferentes extratos analisados apresentavam diferentes tipos de lípidos. Foram identificados ácidos gordos, triglicéridos, esteróides e fosfolípidos, o que está de acordo com os lípidos existentes tanto nos grãos de pólen como nos esporos fúngicos (figura 15).

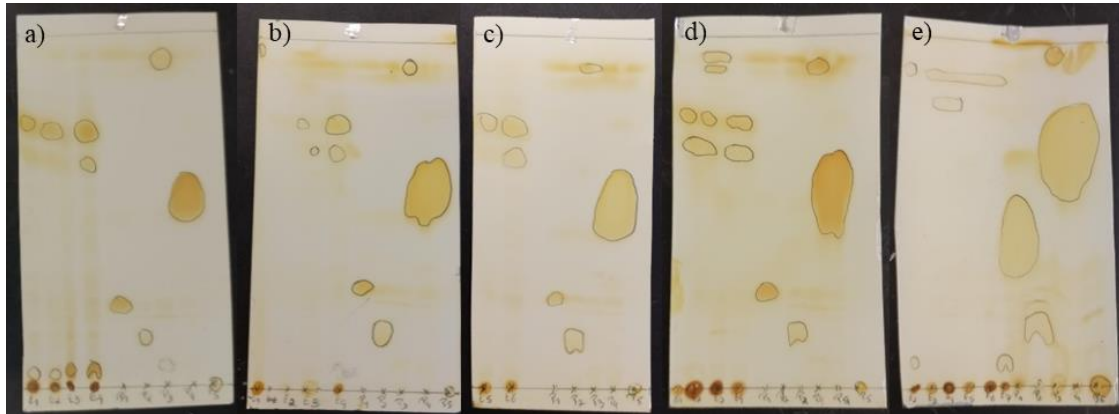


Figura 15: Cromatografias de camada fina realizadas.

Os padrões aplicados foram ácido oleico (P1), colesterol (P2), oleato de colesterol (P3), trioleína (P4) e dipalmitoilfosfatidilcolina (P5). Nas figuras 16-a) foram aplicados os extratos dos filtros 75XL, 75M, 40M e 40 XL; b) foram aplicados os extratos dos filtros 79M, 79XL, 127M e 127XL; c) foram aplicados os extratos dos filtros 137M e 137XL; d) foram aplicados os extratos dos filtros 150M e 150XL, 362M e 362XL; e) foram aplicados os extratos dos filtros 204XL, 339M, 339XL, 365M, 365XL e 204M.

5.5 Análise da correlação entre a composição bioquímica da PM e o tipo de aerossol

Ao longo de todo o período de estudo observou-se uma fraca correlação entre a concentração de proteína total e o conteúdo polínico, contudo se estudarmos só a primavera observamos uma correlação positiva significativa entre estas variáveis, ao nível de significância de 1% ($p < 0,0001$) (figura 16). Isto pode acontecer devido ao facto de, como vimos no subcapítulo 5.1, ser nos meses da primavera que se encontra valores mais elevados de pólen/ m^3 de ar. Ou seja, a concentração de proteína pode ser um marcador importante para a monitorização deste bioaerossol durante a primavera.

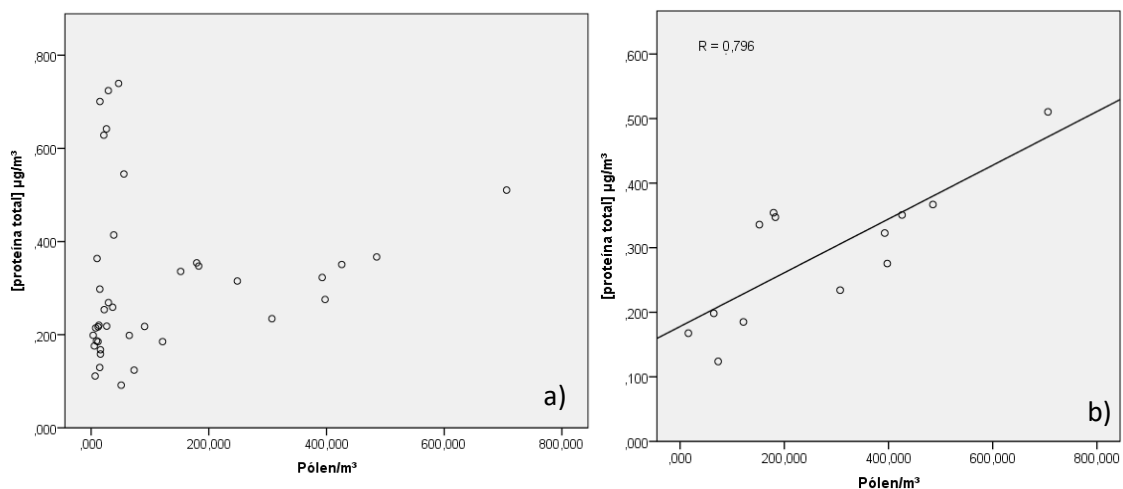


Figura 16: Variação da concentração de proteína no ar em função da concentração de pólen (a) e análise de correlação entre os dois fatores na primavera (b).

A correlação é significativa no intervalo de 99% ($p < 0,0001$).

Quando tentamos estabelecer uma relação entre o conteúdo polínico e a concentração de proteína encontrada na fração XL obtivemos um resultado semelhante ($R=0,746$; $p<0,0001$) contudo quando utilizamos a fração M para estabelecer a mesma correlação não obtemos uma correlação significativa estatisticamente (figura 17). Logo o conteúdo polínico parece ficar mais retido na fração XL do que na fração M. Isto vai de acordo com as dimensões do pólen, que normalmente são entre 10 e 100 micrómetros (Jorge, 2022).

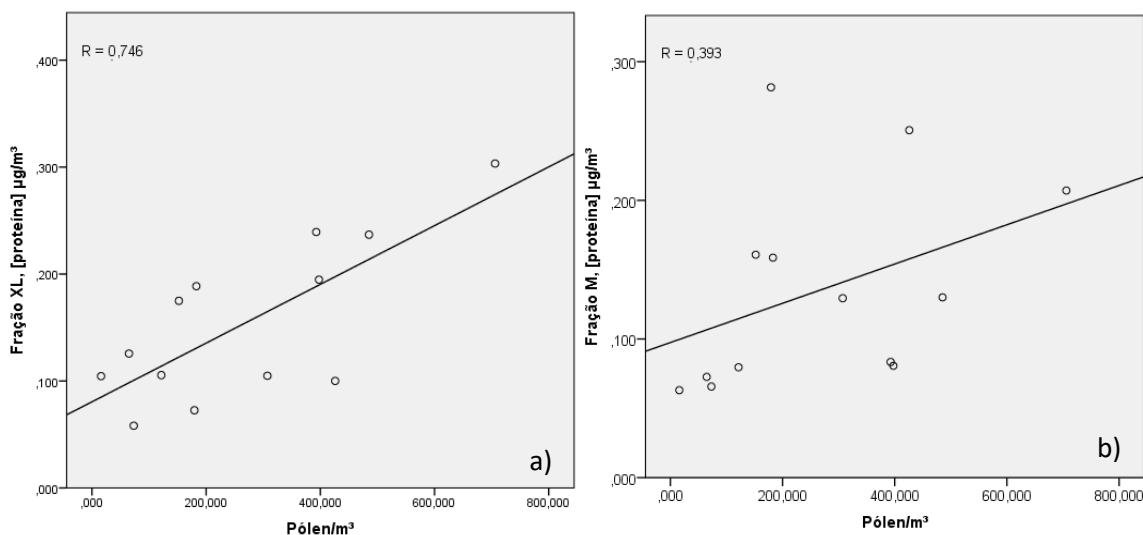


Figura 17: Correlação positiva estatisticamente significativa entre a concentração de proteína e a concentração de pólen na fração XL (a) e M (b). As correlações são significativas no intervalo de 99% ($p<0,0001$).

Relativamente ao conteúdo fúngico, depois da remoção de *outliers*, observou-se uma relação estatisticamente significativa com a concentração de proteína total ($p<0,0001$) (figura 18). Ou seja, a elevada concentração de esporos fúngicos existentes no ar no período do verão/outono parece contribuir para a concentração de proteína encontrada no mesmo período.

Em relação à correlação com as diferentes frações, existe uma correlação estatisticamente significativa com a fração XL ($p<0,0001$) e não existe qualquer tipo de correlação com a fração M (figura 18 b) e c)). Relativamente ao conteúdo fúngico encontrado nesta última fração, vimos que parecem existir 2 grupos diferentes de dados – um composto por fungos de baixa densidade proteica e outro composto por fungos de alta densidade proteica.

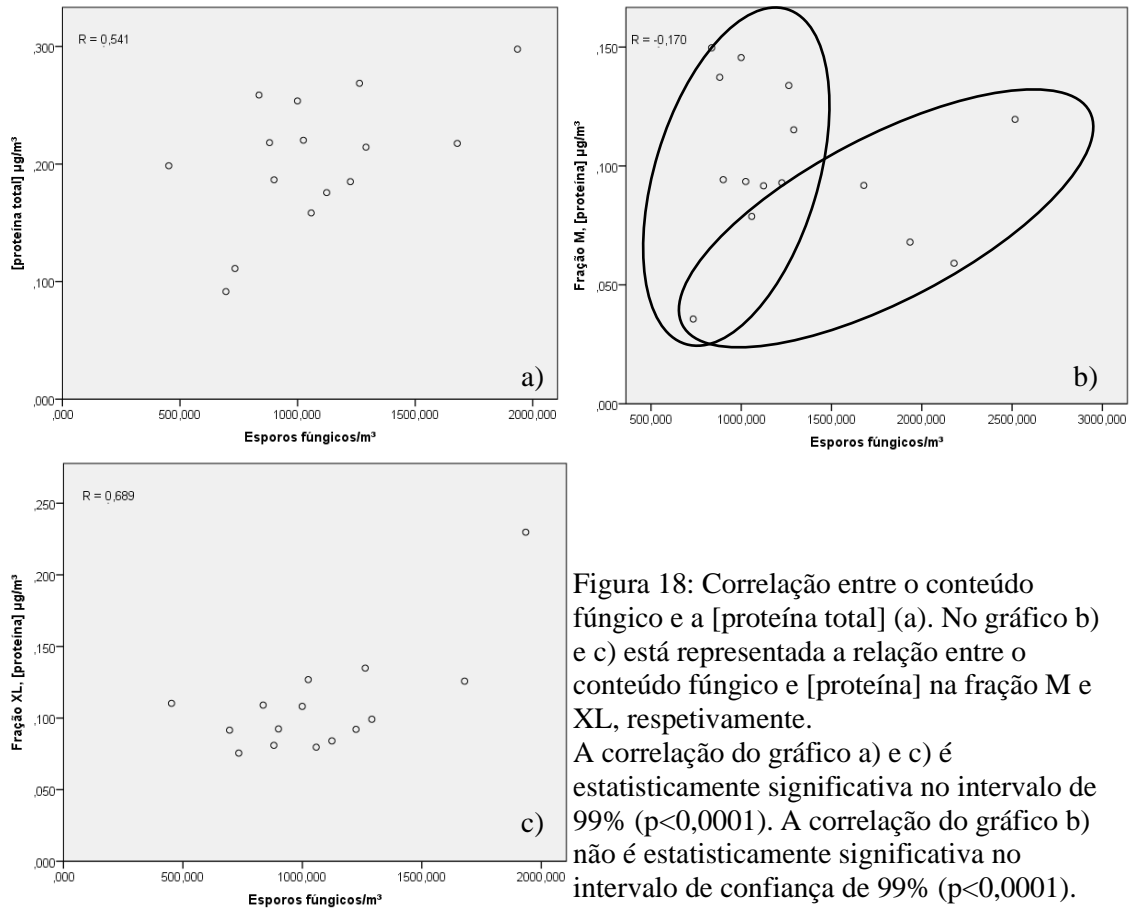


Figura 18: Correlação entre o conteúdo fúngico e a [proteína total] (a). No gráfico b) e c) está representada a relação entre o conteúdo fúngico e [proteína] na fração M e XL, respectivamente. A correlação do gráfico a) e c) é estatisticamente significativa no intervalo de 99% ($p < 0,0001$). A correlação do gráfico b) não é estatisticamente significativa no intervalo de confiança de 99% ($p < 0,0001$).

Relativamente à relação entre a concentração de proteína total e a concentração de *Black Carbon* no ar, existe uma correlação positiva significativa ao nível de significância de 1% ($p < 0,0001$). Quando esta correlação é estudada entre a proteína encontrada nas diferentes frações M e XL, a relação com a proteína existente na fração M é semelhante, como se pode observar na figura 19 - a) e 19 - b)). Contudo a relação entre a concentração de BC e a concentração de proteína existente na fração XL apesar de continuar a ser estatisticamente significativa é mais fraca ($p < 0,0001$) (figura 19-c)).

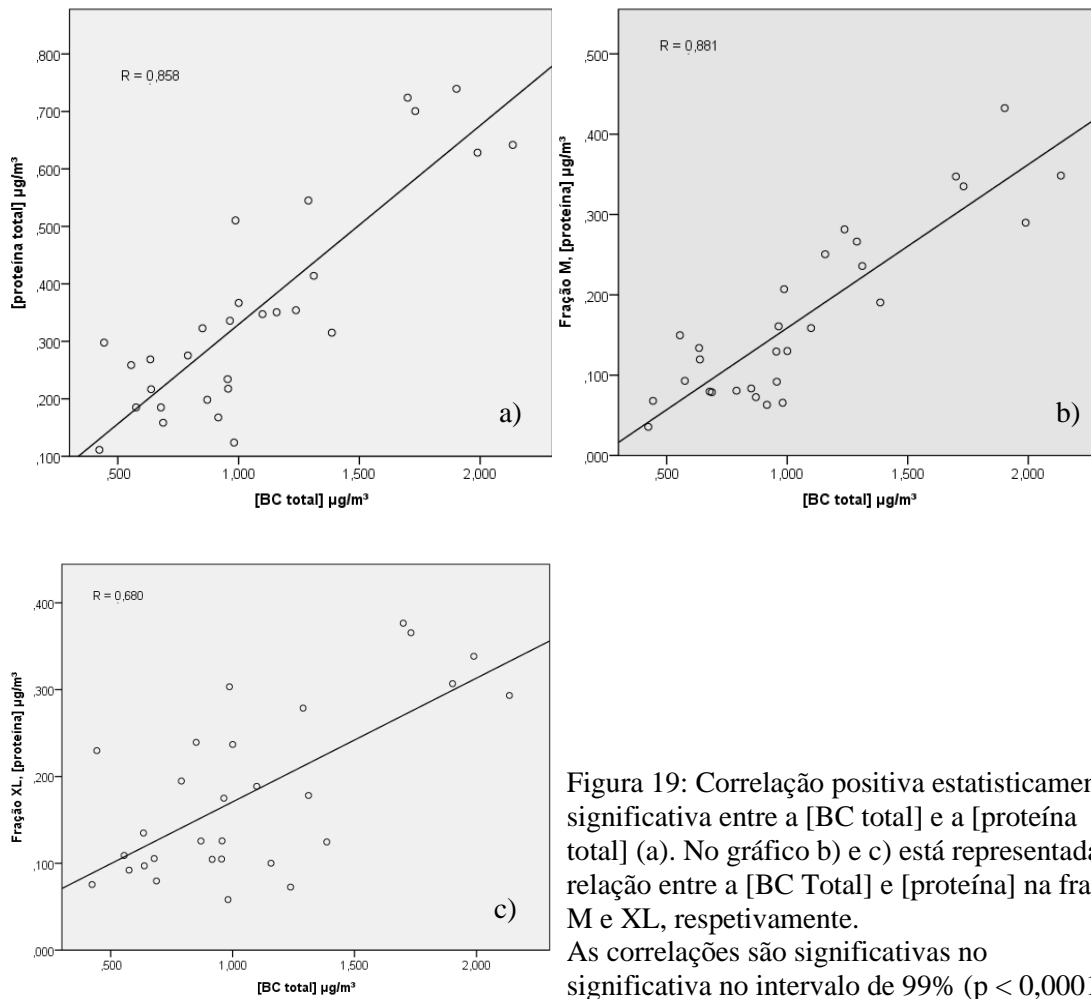


Figura 19: Correlação positiva estatisticamente significativa entre a [BC total] e a [proteína total] (a). No gráfico b) e c) está representada a relação entre a [BC Total] e [proteína] na fração M e XL, respetivamente. As correlações são significativas no intervalo de 99% ($p < 0,0001$).

Acredita-se que esta relação mais fraca com a concentração de proteína existente na fração XL se deva ao facto de a maioria das partículas de BC serem de dimensões submicrónicas, ficando por isso retidas na fração M e contribuindo para a concentração de proteína encontrada nessa fração (Malico et al., 2017).

6. Conclusão

Neste estudo procurou-se avaliar a qualidade bioquímica do ar atmosférico, utilizando como marcadores e inferir quais os seus principais impactos na saúde respiratória, através da determinação do conteúdo proteico, lipídico e em BC da PM. Neste âmbito procurou-se investigar o seu perfil ao longo do ano e a sua relação com os bioaerossóis mais comuns no ar atmosférico, o pólen e os esporos fúngicos. Efetivamente, observou-se sazonalidade na composição da PM.

Relativamente ao conteúdo polínico, foi identificado o período da primavera (março a junho), como sendo o mais propício a ter impactos na saúde respiratória, nomeadamente para indivíduos sensibilizados para alérgicos, em resultados da elevada concentração de pólen, acompanhada também por uma elevada concentração de proteínas e lípidos.

Em relação ao conteúdo fúngico, o período mais propenso a impactos na saúde respiratória de indivíduos sensibilizados a esporos fúngicos será o período do verão (maio-agosto), uma vez que neste período existe uma maior concentração de esporos fúngicos/m³.

O *black carbon* apresentou uma maior concentração nos meses mais frios (dezembro-fevereiro), ou seja, nestes meses existe um maior risco para que existam respostas inflamatórias não alérgicas exacerbadas no tecido do epitélio pulmonar devido à exposição a BC.

É também de realçar que, a maior parte da proteína associada ao pólen se registou na fração XL sugerindo para que estes têm uma maior capacidade para ficar retidos no início na árvore respiratória. A concentração em BC, apresentou correlação com ambas as frações, embora mais forte com a fração M, sugerindo que este se distribui em partículas de dimensões variadas.

Conclui-se também que a concentração de proteína pode ser um bom marcador para a monitorização do conteúdo polínico existente no ar, durante a primavera.

Em suma, existe sazonalidade no tipo e composição de partículas inaláveis ao longo do ano, com efeitos diversos na saúde humana, designadamente, promovendo doenças respiratórias de cariz distinto. Assim, a monitorização da qualidade bioquímica do ar que inalamos poderão contribuir para o desenvolvimento de estratégias de prevenção.

Por fim, e como perspectivas futuras, acredito que seria importante realizar estudos em cultura celular, nomeadamente utilizando células pulmonares, para perceber as respostas deste epitélio a PM com composição em concentrações diferentes, bem como ao esclarecimento dos mecanismos subjacentes.

7. Referências Bibliográficas

- Aghapour, M., Ubags, N. D., Bruder, D., Hiemstra, P. S., Sidhaye, V., Rezaee, F., & Heijink, I. H. (2022). Role of air pollutants in airway epithelial barrier dysfunction in asthma and COPD. *European Respiratory Review*, *31*(163), 210112. <https://doi.org/10.1183/16000617.0112-2021>
- Ambade, B., Sankar, T. K., Panicker, A. S., Gautam, A. S., & Gautam, S. (2021). Characterization, seasonal variation, source apportionment and health risk assessment of black carbon over an urban region of East India. *Urban Climate*, *38*, 100896. <https://doi.org/10.1016/j.uclim.2021.100896>
- Arriegas, R., Alves, P., Otilio, M., Galveias, A., Costa, A. R., & Antunes, C. M. (2017). *MONITORIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNA NO AR: POTENCIAL INDICADOR DA QUALIDADE DO AR?*
- Beamer, C. A., & Shepherd, D. M. (2013). Role of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in lung inflammation. *Seminars in Immunopathology*, *35*(6), 693–704. <https://doi.org/10.1007/s00281-013-0391-7>
- Belo, P. I. D., & Tofoli, R. (2011). *QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE PARTÍCULAS FINAS (MP2,5) NO MUNICÍPIO DE VITÓRIA* [Graduação em Engenharia Ambiental]. Universidade Federal do Espírito Santo.
- Brum, A. A. S. (2005). *Métodos de extração e qualidade da fração lipídica*. [Universidade de São Paulo]. <https://doi.org/10.11606/D.11.2005.tde-26042005-141101>
- Buters, J., Prank, M., Sofiev, M., Pusch, G., Albertini, R., Antunes, C., Behrendt, H., Berger, U., Brandao, R., Celenk, S., Galán, C., Grewling, Ł., Jackowiak, B., Kennedy, R., Rantio-Lehtimäki, A., Reese, G., Šaulienė, I., Smith, M., & Cecchi, L. (2015). Variation of the group 5 grass pollen allergen content of airborne pollen in relation to geographic location and time in season. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, *136*. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.01.049>
- Buters, J. T. M., Antunes, C., Galveias, A., Bergmann, K. C., Thibaudon, M., Galán, C., Schmidt-Weber, C., & Oteros, J. (2018). Pollen and spore monitoring in the world. *Clin Transl Allergy*, *8*, 9. <https://doi.org/10.1186/s13601-018-0197-8>
- Buters, J., Thibaudon, M., Smith, M., Kennedy, R., Rantio-Lehtimäki, A., Albertini, R., Reese, G., Weber, B., Galán, C., Brandao, R., Antunes, C., Jaeger, S., Berger, U., Celenk, S., Grewling, Q., Jackowiak, B., Šaulienė, I., Weichenmeier, I., Pusch, G., & Germany, R. (2012). Release of Bet v 1 from birch pollen from 5 European countries. Results from the HIALINE study. *Atmospheric Environment (1967)*, *55*, 496–505. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.01.054>
- Dahl, Å. (2018). Pollen Lipids Can Play a Role in Allergic Airway Inflammation. *Frontiers in Immunology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02816>
- D'Amato, G. (2011). Effects of climatic changes and urban air pollution on the rising trends of respiratory allergy and asthma. *MULTIDISCIPLINARY RESPIRATORY MEDICINE*, *6*(1), 28–37. <https://doi.org/10.1186/2049-6958-6-1-28>
- D'Amato, G., Baena-Cagnani, C. E., Cecchi, L., Annesi-Maesano, I., Nunes, C., Ansotegui, I., D'Amato, M., Liccardi, G., Sofia, M., & Canonica, W. G. (2013). Climate change, air

- pollution and extreme events leading to increasing prevalence of allergic respiratory diseases. *Multidisciplinary Respiratory Medicine*, 8(1), 12.
<https://doi.org/10.1186/2049-6958-8-12>
- Davis, J. D., & Wypych, T. P. (2021). Cellular and functional heterogeneity of the airway epithelium. *Mucosal Immunology*, 14(5), 978–990. <https://doi.org/10.1038/s41385-020-00370-7>
- Demokritou, P., Kavouras, I., Ferguson, S., & Koutrakis, P. (2002). Development of a High Volume Cascade Impactor for Toxicological and Chemical Characterization Studies. *Aerosol Science and Technology*, 36. <https://doi.org/10.1080/02786820290092113>
- European Environment Agency. (2013, May 17). *Cada vez que respiramos*.
- Ferro, R., Nunes, C., Camacho, I., Miguel Paiva, M., & Morais Almeida, M. (2019). Monitorização de esporos de fungos em Lisboa, 2014 -2016. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*, 27(1). <https://doi.org/10.32932/rpia.2019.03.004>
- FOLCH, J., LEES, M., & SLOANE STANLEY, G. H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497–509.
- Fröhlich-Nowoisky, J., Kampf, C. J., Weber, B., Huffman, J. A., Pöhlker, C., Andreae, M. O., Lang-Yona, N., Burrows, S. M., Gunthe, S. S., Elbert, W., Su, H., Hoor, P., Thines, E., Hoffmann, T., Després, V. R., & Pöschl, U. (2016). Bioaerosols in the Earth system: Climate, health, and ecosystem interactions. *Atmospheric Research*, 182, 346–376. <https://doi.org/10.1016/j.atmosres.2016.07.018>
- Fundação Francisco Manuel dos Santos. (2021). *PORDATA - Estatísticas sobre Portugal e Europa*.
- Galveias, A., Arriegas, R., Mendes, S., Ribeiro, H., Abreu, I., Costa, A. R., & Antunes, C. M. (2021). Air pollutants NO₂- and O₃-induced *Dactylis glomerata* L. pollen oxidative defences and enhanced its allergenic potential. *Aerobiologia*, 37(1), 127–137. <https://doi.org/10.1007/s10453-020-09676-2>
- Google. (2022). *Google Maps*. <https://www.google.com/maps/@38.564079,-7.9048208,15z>.
- Hirst, J. M. (1991). Aerobiology in plant pathology. *Grana*, 30(1), 25–29. <https://doi.org/10.1080/00173139109427765>
- Jorge, A. C. G. (2015). *Estudo do perfil em alergénios do pólen de *Platanus hybrida* e da sua repercussão na doença alérgica respiratória sazonal na população de Évora* [Dissertação de Mestrado em Bioquímica]. Universidade de Évora.
- Jorge, A. C. G. (2022). *Efeito de poluentes atmosféricos e caracterização da matéria particulada adsorvida a grãos de pólen aerossolizados* [Tese de doutoramento em Bioquímica]. Universidade de Évora.
- Kim, K. H., Kabir, E., & Jahan, S. A. (2018). Airborne bioaerosols and their impact on human health. *Journal of Environmental Sciences*, 67, 23–35. <https://doi.org/10.1016/J.JES.2017.08.027>

- Knight, D. A., & Holgate, S. T. (2003). The airway epithelium: Structural and functional properties in health and disease. *Respirology*, *8*(4), 432–446.
<https://doi.org/10.1046/j.1440-1843.2003.00493.x>
- Lyamani, H., Olmo, F. J., Foyo, I., & Alados-Arboledas, L. (2011). Black carbon aerosols over an urban area in south-eastern Spain: Changes detected after the 2008 economic crisis. *Atmospheric Environment*, *45*(35), 6423–6432.
<https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2011.07.063>
- Malico, I., Pereira, S. N., & Costa, M. J. (2017). Black carbon trends in southwestern Iberia in the context of the financial and economic crisis. The role of bioenergy. *Environmental Science and Pollution Research*, *24*(1), 476–488.
<https://doi.org/10.1007/S11356-016-7805-8>
- Manisalidis, I., Stavropoulou, E., Stavropoulos, A., & Bezirtzoglou, E. (2020). Environmental and Health Impacts of Air Pollution: A Review. *Frontiers in Public Health*, *8*. <https://doi.org/10.3389/FPUBH.2020.00014/FULL>
- Niranjan, R., & Thakur, A. K. (2017). The Toxicological Mechanisms of Environmental Soot (Black Carbon) and Carbon Black: Focus on Oxidative Stress and Inflammatory Pathways. *Frontiers in Immunology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00763>
- Oliveira, M., Abreu, I., Ribeiro, H., & Delgado, L. (2007). Esporos fúngicos na atmosfera da cidade do Porto e suas implicações alergológicas. *REVISTA PORTUGUESA DE IMUNOALERGOLOGIA*, 61–85.
- Oliveira, M., Ribeiro, H., Delgado, L., Fonseca, J., Castel-Branco, M. G., & Abreu, I. (2010). Outdoor allergenic fungal spores: comparison between an urban and a rural area in northern Portugal. *Journal of Investigational Allergology & Clinical Immunology*, *20*(2), 117–128.
- DIRECTIVA 2008/50/CE, (2008).
- Patel, T. Y., Buttner, M., Rivas, D., Cross, C., Bazylnski, D. A., & Seggev, J. (2018). Variation in airborne fungal spore concentrations among five monitoring locations in a desert urban environment. *Environmental Monitoring and Assessment*, *190*(11), 634.
<https://doi.org/10.1007/s10661-018-7008-5>
- Paula, V. M. B. (2012). *Caraterização química e biológica do própolis da “serra de Bornes” por TLC*. [Dissertação de Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar]. Escola Superior Agrária.
- Petzold, A., & Schönlinner, M. (2004). Multi-angle absorption photometry—a new method for the measurement of aerosol light absorption and atmospheric black carbon. *Journal of Aerosol Science*, *35*(4), 421–441.
<https://doi.org/10.1016/j.jaerosci.2003.09.005>
- Pólen Alert. (2021). *Pólen Alert*. <https://lince.di.uevora.pt/polen/>
- Randell, S. H., Burns, K., & Boucher, R. C. (2009). Epithelial Cells. In *Asthma and COPD* (pp. 201–210). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374001-4.00016-X>
- Rede Espanhola de Aerobiologia. (2022). <https://www.uco.es/investiga/grupos/rea/>

- Rodrigues, M. L. (2018). The Multifunctional Fungal Ergosterol. *MBio*, 9(5).
<https://doi.org/10.1128/mBio.01755-18>
- Sénéchal, H., Visez, N., Charpin, D., Shahali, Y., Peltre, G., Biolley, J.-P., Lhuissier, F., Couderc, R., Yamada, O., Malrat-Domenge, A., Pham-Thi, N., Poncet, P., & Sutra, J.-P. (2015). A Review of the Effects of Major Atmospheric Pollutants on Pollen Grains, Pollen Content, and Allergenicity. *The Scientific World Journal*, 2015, 1–29.
<https://doi.org/10.1155/2015/940243>
- Shiraiwa, M., Selzle, K., & Pöschl, U. (2012). Hazardous components and health effects of atmospheric aerosol particles: reactive oxygen species, soot, polycyclic aromatic compounds and allergenic proteins. *Free Radical Research*, 46(8), 927–939.
<https://doi.org/10.3109/10715762.2012.663084>
- Tam, A., Wadsworth, S., Dorscheid, D., Man, S. F. P., & Sin, D. D. (2011). The airway epithelium: more than just a structural barrier. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, 5(4), 255–273. <https://doi.org/10.1177/1753465810396539>
- Thermo Fisher Scientific Inc. (2017). *Model 5012 Instruction Manual Multi Angle Absorption Photometer (MAAP)*. Thermo Fisher Scientific.
- Tobias, L. (2013). *Caracterização de aerossóis de Évora*.
- Wang, J., Liu, D., Ge, X., Wu, Y., Shen, F., Chen, M., Zhao, J., Xie, C., Wang, Q., Xu, W., Zhang, J., Hu, J., Allan, J., Joshi, R., Fu, P., Coe, H., & Sun, Y. (2019). Characterization of black carbon-containing fine particles in Beijing during wintertime. *Atmospheric Chemistry and Physics*, 19(1), 447–458. <https://doi.org/10.5194/acp-19-447-2019>
- WASSEF, M. K. (1977). *Fungal Lipids* (pp. 159–232). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-024915-2.50009-8>
- World Health Organization (WHO). (2021). *WHO global air quality guidelines: particulate matter (PM2.5 and PM10), ozone, nitrogen dioxide, sulfur dioxide and carbon monoxide*.
- Zioła, N., Błaszczak, B., & Klejnowski, K. (2021). Long-term ebc measurements with the use of maap in the polluted urban atmosphere (Poland). *Atmosphere*, 12(7).
<https://doi.org/10.3390/ATMOS12070808>
- Żukiewicz-Sobczak, W. A. (2013). The role of fungi in allergic diseases. *Advances in Dermatology and Allergology*, 1, 42–45. <https://doi.org/10.5114/pdia.2013.33377>

Anexo 1

- Material

Luvas descartáveis

Pinça

Tesoura

Tubos de Falcon de 15 e 50ml

Para-filme

Balões de Erlenmeyer de diferentes tamanhos

Copos de diferentes tamanhos

Micropipetas P10, P20, P200, P1000, P5000 e respectivas pontas

Tubos de centrífuga de 50ml

Microtubos de 5ml estéreis

Microplacas de 96 poços

Balões de fundo redondo

Seringas e filtros de seringa

Placas de cromatografia de camada fina

Pipetas de Pasteur

Câmaras de cromatografia

Câmaras de iodo

Frascos de cultura de 75cm³

- Equipamento

Balança

Centrífuga

Agitador por inversão

Medidor de pH

Leitor de microplacas

Liofilizador

Agitador magnético

Microscópio

Placa térmica

Vortex

Leitor de microplacas

Rotavapor

- Reagentes

Albumina de Soro Bovino (BSA), 2mg/ml

Micro-BCA Protein Assay Kit

Metanol

Clorofórmio

- Soluções

Tampão bicarbonato de amônio, pH= 8,11-8,15 (8g de NH_4HCO_3 ; 700 μL de NH_4 para 1 L H_2O)

Tampão fosfato de sódio alcalino 10mM, pH=7,4

Eluente de cromatografia de camada fina (8,4 mL de n-hexano; 1,5 mL de éter etílico; 0,1 mL de ácido acético)