



IARA BURIOLA TREVISAN

**SINTOMAS NASAIS, PARÂMETROS HEMODINÂMICOS E PERFIL
INFLAMATÓRIO NASAL E SISTÊMICO DE CORTADORES DE
CANA-DE-AÇÚCAR EXPOSTOS À QUEIMA DE BIOMASSA**

FISIOTERAPIA

**PRESIDENTE PRUDENTE
2016**



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Presidente Prudente

IARA BURIOLA TREVISAN

**SINTOMAS NASAIS, PARÂMETROS HEMODINÂMICOS E PERFIL
INFLAMATÓRIO NASAL E SISTÊMICO DE CORTADORES DE CANA-DE-
AÇÚCAR EXPOSTOS À QUEIMA DE BIOMASSA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências e Tecnologia – FCT/UNESP, Campus de Presidente Prudente, para obtenção do título de Mestre no programa de Pós-graduação em Fisioterapia.

Orientadora: Profa. Dra. Dionei Ramos

**PRESIDENTE PRUDENTE
2016**



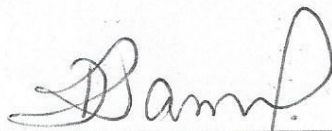
FICHA CATALOGRÁFICA

T739s Trevisan, Iara Buriola.
Sintomas nasais, parâmetros hemodinâmicos e perfil inflamatório nasal e sistêmico de cortadores de cana-de-açúcar exposto à queima de biomassa / Iara Buriola Trevisan. - Presidente Prudente : [s.n.], 2016
121 f.

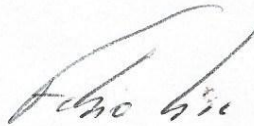
Orientador: Dionei Ramos
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências e Tecnologia
Inclui bibliografia

1. Cana-de-açúcar. 2. Sinais e sintomas respiratórios. 3. Mediadores da inflamação. I. Ramos, Dionei. II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências e Tecnologia. III. Título.

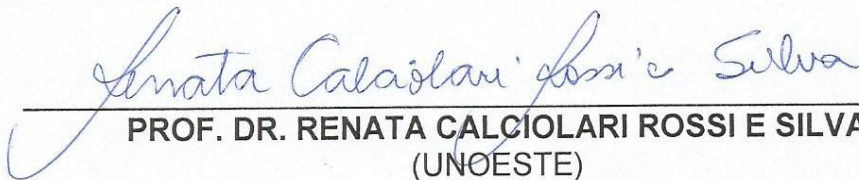
BANCA EXAMINADORA



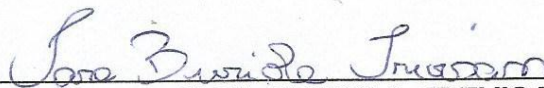
PROFA. DRA. DIONEI RAMOS
(ORIENTADORA)



PROF. DR. FÁBIO SANTOS DE LIRA
(FCT/UNESP)



PROF. DR. RENATA CALCIOLARI ROSSI E SILVA
(UNOESTE)



IARA BURIOLA TREVISAN

PRESIDENTE PRUDENTE, 26 DE JANEIRO DE 2016.

RESULTADO: _____

Aprovada

Dedicatória

*Aos meus pais Maria Cristina e Antônio Carlos que sempre me apoiaram em
minhas escolhas, me proporcionado suporte, amor e confiança para seguir em
frente não me deixando esquecer dos verdadeiros valores da vida.*

Agradecimientos

Primeiramente agradeço a Deus por abrir portas e colocar pessoas especiais e essenciais que fizeram parte desta minha trajetória de maneira tão cuidadosa e especial.

À minha orientadora, Prof^a Dra Dionei Ramos, expresso minha total gratidão por ter me dado a oportunidade de participar do grupo de pesquisa ao qual faço parte. Aqui deixo minha admiração pela pessoa maravilhosa, amável, compreensiva, incentivadora e atenciosa. Obrigada pela sua preocupação em solucionar problemas que por muitas vezes pareciam até inalcançáveis, mas que de maneira compreensível e dedicada tornava tudo possível. Obrigada por depositar em mim confiança de tocar grandes projetos, sinto-me privilegiada por toda sua confiança e agradeço por me ajudar a enriquecer meu aprendizado e amadurecimento.

À Prof^a Dra Ercy Mara Cipulo Ramos, gostaria de agradecer por me receber de braços abertos ao grupo LEAMS quando era apenas uma recém chegada. Obrigada por depositar sua confiança e acreditar que eu era capaz de enfrentar os novos desafios que a pesquisa e a área acadêmica me proporcionariam. Obrigada pelos ensinamentos, dedicação e por se tornar constante e presente em todos os momentos durante esses anos de convivência.

À Prof^a Dra Renata Calcionari Rossi e Silva, obrigada pelo aceite do convite para compor a essa banca examinadora e obrigada principalmente pela sua prontidão em nos auxiliar, sua generosidade, conhecimento e entusiasmo foram essenciais para o desenvolvimento e elaboração dos primeiros passos dessa pesquisa. Obrigada pela sua constante preocupação e dedicação.

Ao Prof° Dr Fábio Santos de Lira, por nos receber de forma tão hospitaleira ao seu laboratório. Obrigada por disponibilizar do seu tempo, conhecimento e pelas valiosas contribuições científicas.

Ao Prof° Dr Diego Giulliano Destro Christofaro, pela prontidão em nos auxiliar a solucionar problemas estatísticos que pareciam não ter explicação, sua paciência, prontidão e conhecimento foram importantíssimos para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos co-autores, Marcell Rocha Leite, Aline Duarte Ferreira, Ana Paula Coelho Figueira Freire, Bruna Spolador de Alencar Silva, Renata Marques David, Gabriel Faustino Santa Brígida, muito obrigada pela colaboração e constante discussão para buscar as melhores e mais possíveis explicações para elaboração deste trabalho.

À todo o pessoal do LEAMS, muito obrigada pelo companheirismo, pelos dias de convivência e por se tornarem indispensáveis no meu dia-a-dia. A presença e colaboração de todos vocês tornavam as dificuldades mais leves e possíveis de serem solucionadas. Aline Duarte Ferreira, Marcell Leite, Ana Paula Freire, Renata David, Juliana Uzeloto, Gabriel Faustino, Bruna Spolador, Guilherme Tacao, Giovanna Arévalo, Fabiano Lima, Mariana Belon, Fernando, Caroline Pereira, Tamara Gouveia, Natália Pontes, Juliana Nicolino, Rafaela Cuissi, Paula Pestana e Danielli Baeta, muito obrigada por cada dia de convívio, pelos momentos de descontração, e por enfrentar os dias de coletas na usina intermináveis, vocês foram extremamente importantes para o desenvolvimento desse trabalho, sem vocês nada disso teria se concretizado. A Marcell, um agradecimento especial pelo seu companheirismo, disponibilidade e dedicação em todos os momentos que precisei.

Aos alunos de iniciação científica por toda a colaboração na coleta de dados e por contribuírem para o desenvolvimento deste trabalho.

As enfermeiras obrigada por compartilharem de sua prontidão para nos atender em nossas coletas contribuindo para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos voluntários da pesquisa, pela paciência, compreensão e disposição que foram fundamentais.

À agência de fomento FAPESP pelo apoio financeiro que foi primordial para o desenvolvimento de todas as etapas deste trabalho.

Agradeço em especial a minha família, pelo apoio e compreensão imensurável e por acreditarem em meu potencial durante este período. Aos meus pais, Maria Cristina e Antônio Carlos que mesmo distantes me apoiaram e acreditaram em mim, não me deixando cair nos momentos de angústias e dúvidas. Aos meus irmãos Vitor e André pela amizade, amor e momentos de alegria, obrigada por me proporcionarem a chance de amar seres tão incríveis que são meus sobrinhos Luiza, Miguel e Lívia. Ao meu namorado Márcio Henrique pela paciência, amor e carinho, que me ampararam em todos os momentos.

À família que escolhi e me acolheu aqui em Prudente, muito obrigada Marceli, Juliana Nicolino, Tatiana Koike e Tiemi Haro por me darem a chance de conviver dia-a-dia, compartilhando momentos de alegrias e tristezas, vocês foram e são essenciais. As minhas amigas que mesmo longe não deixaram de estarem presentes em minha vida, muito obrigada Mariana Junqueira, Francini Menezes, Lionara e Tainá Salles, pelo companheirismo e carinho.

Epigrafe

“Quando a alma está feliz, a prosperidade cresce, a saúde melhora, as amizades aumentam, enfim, o mundo fica de bem com você.

O mundo exterior reflete o universo interior.”

(Mahatma Gandhi)

Sumário

SUMÁRIO

Apresentação	15
Resumo	18
Abstract	20
Introdução	22
Artigo I: Sintomas nasais e parâmetros hemodinâmicos de cortadores de cana-de-açúcar expostos à queima de biomassa.....	29
Artigo II: Perfil inflamatório nasal e sistêmico por inalação de material particulado fino advindo da queima de biomassa em cortadores de cana-de-açúcar tabagistas e não tabagistas.....	51
Conclusões	78
Referências bibliográficas	80
Anexos	

Apresentação

Este modelo alternativo de dissertação contempla o material originado a partir da pesquisa intitulada “SINTOMAS NASAIS, PARÂMETROS HEMODINÂMICOS E PERFIL INFLAMATÓRIO NASAL E SISTÊMICO DE CORTADORES DE CANA-DE-AÇÚCAR EXPOSTOS À QUEIMA DE BIOMASSA”, realizada no Laboratório de Estudos do Aparelho Muco Secretor (LEAMS), da Faculdade de Ciências e Tecnologia– FCT/UNESP, campus de Presidente Prudente e financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Em consonância com as regras do programa de pós-graduação em Fisioterapia desta unidade, o presente material está dividido nas seguintes sessões:

- *Resumo;*

- *Abstract;*

- *Introdução:* contextualização do tema pesquisado;

- *Artigo I:* Iara Buriola Trevisan, Ercy Mara Cipulo Ramos, Ana Paula Coelho Figueira Freire, Bruna Spolador de Alencar Silva, Diego Giulliano Destro Christofaro, Marcell Rocha Leite, Renata Marques David, Gabriel Faustino Santa Brigida, Dionei Ramos. SINTOMAS NASAIS E PARÂMETROS HEMODINÂMICOS DE CORTADORES DE CANA-DE-AÇÚCAR EXPOSTOS À QUEIMA DE BIOMASSA. A ser submetido ao periódico *International Journal of Environmental Research and Public Health* (ISSN: 1660-4601).

- *Artigo II:* Iara Buriola Trevisan, Fábio Santos de Lira, Ana Paula Coelho Figueira Freire, Bruna Spolador de Alencar Silva, Diego Giuliano Destro Christofaro, Marcell Rocha Leite, Aline Duarte Ferreira, Ercy Mara Cipulo Ramos, Dionei Ramos. PERFIL INFLAMATÓRIO NASAL E SISTÊMICO POR INALAÇÃO DE MATERIAL PARTICULADO FINO EM CORTADORES DE CANA-DE-AÇÚCAR TABAGISTAS E

NÃO TABAGISTAS. A ser submetido ao periódico *Respiratory Medicine* (ISSN: 0954-6111)

- *Conclusões*: obtidas a partir da pesquisa realizada;

- *Referências*: referentes ao texto da introdução.

- *Anexos*: O anexo 1 são as normas do Periódico International Journal of Environmental Research and Public Health, de acordo com o qual o artigo I foi redigido. O anexo 2 são as normas do Periódico Respiratory Medicine, de acordo com o qual o artigo II foi redigido.

Resumo

Sintomas nasais, parâmetros hemodinâmicos e perfil inflamatório nasal e sistêmico de cortadores de cana-de-açúcar expostos à queima de biomassa

Introdução: A colheita da cana-de-açúcar precedida pela queima noturna expõe trabalhadores a altas concentrações de poluentes que somados aos efeitos da jornada de trabalho acarreta o aumento do trabalho cardiorrespiratório, ocasionando alterações multissistêmicas. Apesar das grandes evidências dos efeitos deletérios da exposição ao material particulado (MP), ainda tem sido dada pouca atenção aos efeitos das exposições ocupacionais a longo prazo. **Objetivos:** Esta dissertação teve como objetivos: avaliar os sintomas nasais, parâmetros hemodinâmicos e perfil inflamatório nasal e sistêmico de cortadores de cana-de-açúcar expostos à queima de biomassa ao longo de uma safra canavieira. **Métodos:** Foram avaliados no artigo I 41 indivíduos e no artigo II 45 indivíduos, cortadores de cana-de-açúcar do gênero masculino de uma usina de açúcar e álcool, divididos em grupos de acordo com o hábito tabagístico. Para avaliação da frequência e intensidade dos sintomas nasais foi aplicado questionário de sintomas respiratórios e para avaliação dos parâmetros hemodinâmicos foi registrado valores de pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC) e respiratória (f). Para análise do perfil inflamatório nasal (IL-6, IL-10 e IL-4) foi coletado amostras de lavado nasal e para análise de perfil inflamatório sistêmico (TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10) e contagem total de monócitos e neutrófilos foram realizados coletas de sangue venoso. As avaliações ocorreram durante a pré-safra (março), meio da safra (julho) e final da safra (outubro) de 2014. **Resultados:** Durante o meio da safra houve aumento significativo da frequência e intensidade dos sintomas espirros, congestão nasal além do aumento de relatos na dificuldade para respirar. Em relação a PA, FC e f todos os participantes apresentaram alterações significativas durante a safra. Na análise do perfil inflamatório houve alterações significativas a nível sistêmico para IL-8 e contagem de neutrófilos que obteve aumento no meio da safra seguido de um decréscimo ao final safra. **Conclusões:** Conclui-se que cortadores de cana-de-açúcar apresentam aumento na frequência e intensidade de sintomas nasais assim como alterações nos parâmetros hemodinâmicos principalmente no meio da safra. Além disso, todos os cortadores apresentaram diminuição de IL-8 e número de neutrófilos a nível sistêmico devido a exposição repetida ao MP.

Palavras-chave: Sinais e Sintomas Respiratórios, Pressão sanguínea, Exposição ocupacional, Saúde do trabalhador, Cana-de-açúcar, Material particulado fino, Mediadores da inflamação.

Abstract

Nasal symptoms, hemodynamic parameters and nasal and systemic inflammatory profile of sugarcane cutters exposed to biomass burning

Introduction: The harvest of sugarcane preceded by night burning exposes workers to high concentrations of pollutants added to the effects of the workday causes increased cardiorespiratory work, causing alterations multisystem. Despite the great evidences of the deleterious effects of exposure to particulate matter (PM), still has been given little attention to the effects of long-term occupational exposures. **Objective:** This Master's thesis aimed to evaluate nasal symptoms, hemodynamic parameters and nasal and systemic inflammatory profile of sugarcane cutters exposed to biomass burning along a sugarcane harvest. **Methods:** Were evaluated in article I 41 individuals and in article II 45 individuals, sugarcane cutters, male cutters from a sugar and alcohol plant divided into groups according to smoking habit. To evaluate the frequency and intensity nasal symptoms was questionnaire applied of respiratory symptoms and to evaluate the hemodynamic parameters was registered blood pressure (BP), heart rate (HR) and respiratory (f). For analysis of the nasal inflammatory profile (IL-6, IL-10 and IL-4) was collected nasal lavage and for analysis of the systemic inflammatory profile (TNF- α , IL-6, IL-8 and IL-10) and total count monocytes and neutrophils from venous blood were performed. The evaluations occurred during the pre-harvest (March), middle of harvest (July) and end of harvest (October) in 2014. **Results:** During the middle of harvest there was a significant increase in the frequency and intensity of symptoms sneezing, nasal congestion beyond the increase in reports of difficulty in breathing. In relation the BP, HR and RR all participants showed significant alterations during the harvest. For analysis of inflammatory profile there were significant changes in systemic levels for IL-8 and neutrophil counts that had an increase in middle of harvest followed by a decrease at the end of harvest. **Conclusions:** Conclude that sugarcane cutters have increased in frequency and intensity of nasal symptoms, as well as changes in hemodynamic parameters, mainly in the middle of harvest. In addition, all cutters showed a decrease in IL-8 and neutrophil counts at systemic level at the end of harvest due to repeated exposure to PM.

Keywords: Signs and Symptoms, Respiratory, Blood pressure, Occupational exposure, Occupational health, Saccharum, Fine particulate matter, Inflammation mediators.

O interesse mundial em substituir combustíveis fósseis por biocombustíveis tem gerado aumento significativo na produção canavieira, e o Brasil por sua vez, se destaca nesse cenário¹, onde a produção de cana-de-açúcar se concentra principalmente nas regiões Centro-Sul e Nordeste do país, sendo que 371 milhões de toneladas de cana-de-açúcar provém do estado de São Paulo, correspondendo a 51% da produção de etanol do Brasil e por mais de 16% da produção de etanol no mundo².

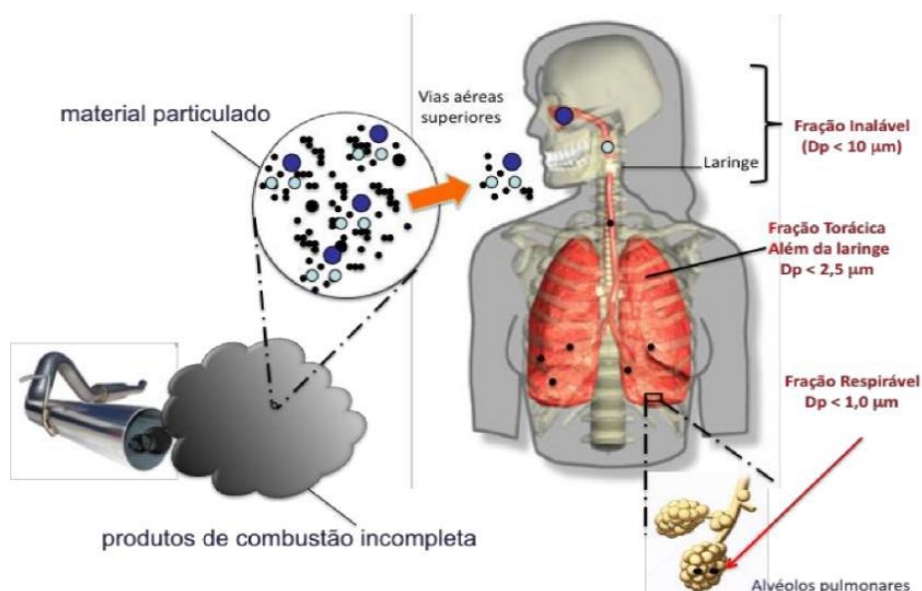
Apesar dos constantes avanços tecnológicos neste setor, especialmente dos procedimentos de colheita mecanizada, a prática rudimentar de se queimar a cana-de-açúcar ainda é realizada em territórios nacionais. Um dos motivos apontados para tal ocorrência se deve ao fato do alto custo das colheitadeiras e a dificuldade de sua utilização em solos irregulares. Além disso, a colheita mecanizada apresenta restrições como: aumento de perdas invisíveis (matéria-prima da cana-de-açúcar, devido aos impactos mecânicos dos sistemas de corte, picagem, transporte e limpeza); maiores danos às soqueiras (raízes que sobram na terra após a colheita); maior ataque de cigarrinhas nas raízes; riscos de incêndio após colheita; compactação do solo por tráfego; e atraso na brotação de raízes³.

Diante disso, a queima realizada geralmente no período da noite antes da colheita torna-se mais viável para a indústria, pois além de eliminar folhas, resíduos do solo e animais peçonhentos, ocasiona o aumento no teor da matéria-prima através do cozimento da cana-de-açúcar durante a sua queima, facilitando assim o processo de corte e aumentando a produtividade do setor⁴. No entanto, este método específico de queima de biomassa agrícola é responsável pela emissão de grandes quantidades de gases e liberações de partículas, principalmente de material particulado (MP), que têm sido alvo de estudos por ocasionar impactos multissistêmicos agudos e crônicos na saúde da população exposta⁵⁻⁷.

O MP, é o principal poluente emitido na prática de queima da palha da cana-de-açúcar, sendo de origem natural ou antropogênica⁸. Com base no seu diâmetro aerodinâmico

as partículas de MP são classificadas em três classes: ultrafinas, partículas com diâmetro menor que $0,1 \mu\text{m}$ ($\text{MP}_{1,0}$); fina, partículas com diâmetro entre $0,1$ e $2,5 \mu\text{m}$ ($\text{MP}_{2,5}$); e grandes ou grossas, partículas com diâmetro maior que $2,5 \mu\text{m}$ (MP_{10})⁹.

Partículas de maior diâmetro como o MP_{10} pode rapidamente penetrar e se depositar na traqueia e nos brônquios. Já as partículas finas de fração entre $0,1$ e $2,5 \mu\text{m}$ podem alcançar vias aéreas estreitas e alvéolos e as partículas ultrafinas, menores que $0,1 \mu\text{m}$, representam a maior parte do MP e têm alta deposição nos alvéolos podendo alcançar a circulação sistêmica (Figura 1)¹⁰⁻¹².



Fonte: <http://qnint.s bq.org.br/qni/visualizarTema.php?idTema=76>

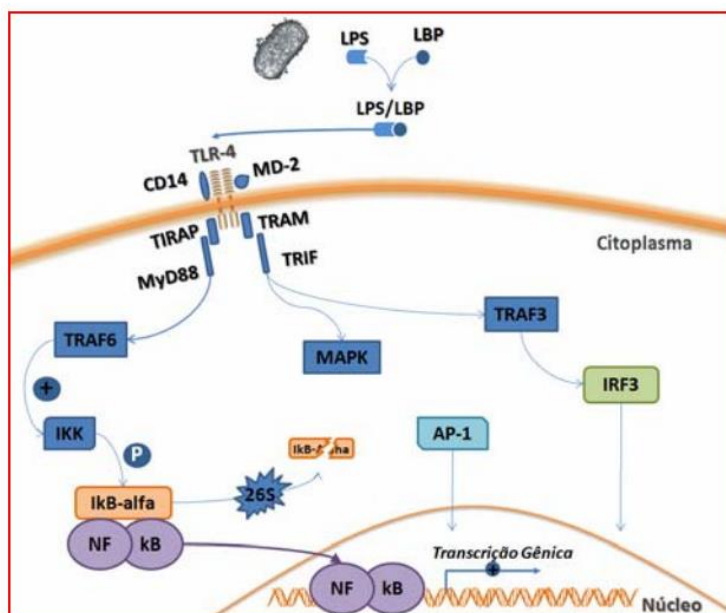
Figura 1. Diferentes diâmetros de partículas do material particulado e sua deposição no trato respiratório.

Durante toda a jornada de trabalho que dura em média quarenta e oito horas semanais, o trabalhador repete exaustivamente os mesmos movimentos: abraça o feixe de cana, se curva, golpeia com o podão a base dos colmos, levanta o feixe, gira e empilha a cana cortada em montes logo atrás de si^{13,14}. Tais movimentos, conjugados com a exposição às variações meteorológicas e poluentes atmosféricos levam o trabalhador a uma exaustão bio-psicológica^{13,15,16}.

Dentre os principais fatores de risco envolvidos na exaustão bio-psicológica do corte manual de cana-de-açúcar, está a sobrecarga na atividade cardiorrespiratória do trabalhador¹⁷. A inalação de partículas advindos desta queima como grande quantidade de MP_{2,5} pode induzir respostas locais nos pulmões com o aparecimento de disfunções no aparelho respiratório, como também inflamação de caráter sistêmico podendo ocasionar disfunções cardiovasculares¹⁸⁻²².

A interação entre o MP com os macrófagos alveolares se dá pela ligação do MP com os receptores Toll-like (TLRs), principalmente o TLR2 e TLR4 que são considerados dois principais receptores que reconhecem os materiais microbianos tais como lipopolissacarídeos (LPS – endotoxina) presentes no MP^{23,24}.

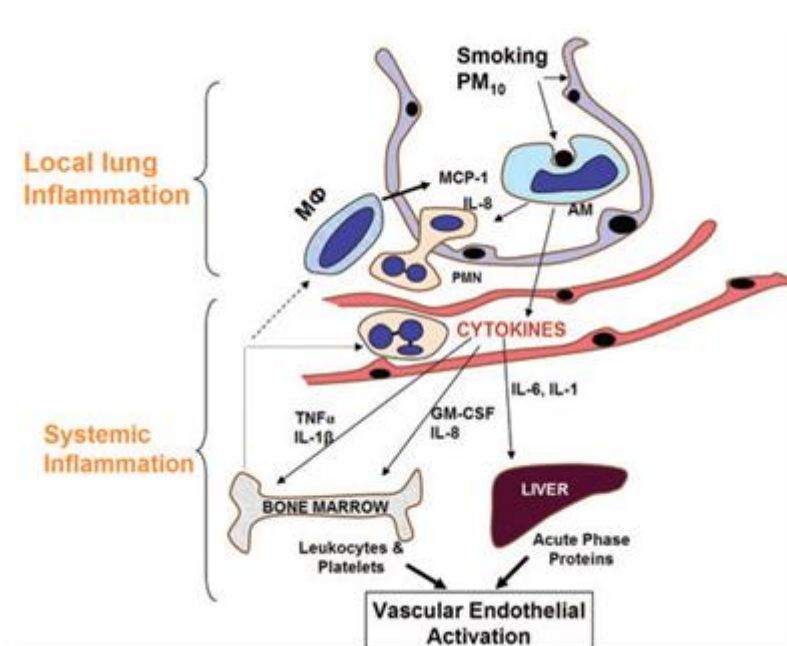
Esta interação por sua vez, começa a partir da sinalização da LPS mediada por uma proteína ligadora de LPS (LBS) derivada do fígado até a molécula CD14 (proteína glicosifosfatidilinositol – GPI) e o transfere ao complexo constituído pela proteína de diferenciação mielóide 2 (MD-2) e pelo receptor TLR4 que juntos recrutam a proteína MyD88, que por sua vez, promove a ativação de vias de sinalização intracelular resultando na ativação de fator nuclear Kappa B (NF-kB) para posterior transcrição de citocinas pró-inflamatórias (Figura 2)²¹⁻²⁵.



Fonte: Cruz-Machado²⁵, baseado Gosh e col., 1998; Raetz & Whitfield, 2002; Kawai e Akira, 2006; Carmody e Chen, 2007; Lu e col., 2008; Gosh & Hayden, 2008

Figura 2. Via clássica da ativação dos receptores por LPS e a ativação da translocação nuclear do NFκB e de outros fatores de transcrição

Tem se apoiado a hipótese que a transcrição de citocinas a partir da interação do MP com os macrófagos alveolares e células epiteliais pode induzir respostas inflamatórias sistêmicas a partir da translocação desses mediadores inflamatórios para a circulação sistêmica²⁶⁻²⁸. O extravasamento destes mediadores inflamatórios estimulam a medula óssea para aumentar a liberação de leucócitos e plaquetas, e o fígado para aumentar a produção de uma variedade de proteínas de fase aguda como proteína C reativa (PCR) e fibrinogênio²⁹⁻³¹. Esta resposta sistêmica está associada com a ativação vascular e a progressão do processo aterosclerótico contribuindo para o aparecimento de doenças cardiovasculares^{32,33} (Figura 3).



Fonte: Hogg JC, van Eeden S¹⁸

Figura 3. Resposta local e sistêmica a partir da inalação de material particulado

No entanto a exposição crônica ao MP pode induzir ao invés de uma resposta com aumento da produção de marcadores causadores de inflamação, um fenômeno chamado de “tolerância a endotoxina”. Tolerância a endotoxina se caracteriza pela tentativa de resolução da inflamação quando o organismo passa por recidivas exposições a endotoxinas. Essa adaptação se dá pela redução da produção de citocinas pró-inflamatórias com o aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias, que é ocasionado por defeitos em vários níveis nas vias de sinalização a partir do receptor TLR4³⁴.

Deste modo, a desativação de macrófagos indutores de inflamação (M1) e ativação incomum de macrófagos responsáveis pela remodelação tecidual (M2), deixam o organismo mais susceptível a infecções bacterianas devido a supressão de genes inflamatórios, gerando incapacidade do organismo de eliminar agentes patogênicos^{35,36}.

Diante do exposto e sabendo-se ainda que há poucos estudos explorando a saúde de cortadores de cana-de-açúcar, hipotetiza-se que mesmo com a lei estadual nº 11.241, que objetiva a proibição gradativa da queima das culturas de cana-de-açúcar até 2031³⁷ além da

rápida mecanização de usinas sucroalcooleira, ainda há a atividade não mecanizada para a prática do corte da cana principalmente em usinas do oeste do estado de São Paulo, afinal nos últimos anos tem surgido um número crescente de relatos de mortes mal esclarecidas entre cortadores de cana, atribuídas ao estresse físico, sobrecarga térmica e exposição a poluentes advindos da queima de canaviais.

Sendo assim há a necessidade de estudar as condições da jornada de trabalho somados aos efeitos acumulativos da exposição aos poluentes atmosféricos que por consequência pode acarretar deste o aparecimento de sintomas respiratórios e alterações em parâmetros hemodinâmicos como também inflamação nasal e sistêmica a partir da inalação constantes ao MP. Deste modo, o objetivo do presente estudo foi investigar os efeitos da exposição à queima de biomassa advinda da cana-de-açúcar sobre os sintomas nasais, parâmetros hemodinâmicos e perfil inflamatório nasal e sistêmico de cortadores de cana-de-açúcar ao longo de uma safra canavieira.

Artigo I

Sintomas nasais e parâmetros hemodinâmicos de cortadores de cana-de-açúcar expostos à queima de biomassa

Iara Buriola Trevisan¹, Ercy Mara Cipulo Ramos¹, Ana Paula Coelho Figueira Freire¹, Bruna Spolador de Alencar Silva¹, Diego Giulliano Destro Christofaro³, Marcell Rocha Leite²,
Renata Marques David¹, Gabriel Faustino Santa Brigida¹ e Dionei Ramos¹

1- Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho (UNESP), Presidente Prudente, Brasil, Departamento de Fisioterapia.

2- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brasil, Departamento de Medicina em Pneumologia

3- Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita Filho (UNESP), Presidente Prudente, Brasil, Departamento de Educação Física.

Autor correspondente

Iara Buriola Trevisan

Universidade Estadual Paulista, Departamento de Fisioterapia

Rua Roberto Simonsen, número 305, Presidente Prudente, SP 19060-900 (Brasil)

E-mail: iara_buriola@hotmail.com

Tel: (18) 3229-5821

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2014/08029-0.

Conflito de interesses

Os autores declararam não haver conflitos de interesse.

RESUMO

Introdução: O corte manual da cana-de-açúcar impõe ao trabalhador rural uma elevada carga de trabalho. Este processo aumenta a taxa respiratória e a ventilação pulmonar, ocasionando maior inalação de poluentes advindo da queima noturna de biomassa. Tendo em vista os prejuízos causados por essa atividade o objetivo do presente estudo foi avaliar a frequência e intensidade de sintomas nasais assim como parâmetros hemodinâmicos de cortadores de cana-de-açúcar expostos à queima de biomassa. **Métodos:** Foram avaliados 41 cortadores de cana-de-açúcar, (homens, com idade de 40.6 ± 10.7 anos e IMC de 25.3 ± 4 Kg/m²). Todos participantes foram submetidos a avaliação da carga de trabalho, parâmetros hemodinâmicos e sintomas nasais, em: pré-safra; meio da safra e final da safra. Durante os períodos coletaram-se concentrações de material particulado (MP_{2.5}). **Resultados:** No meio da safra houve aumento significativo da frequência e intensidade do sintomas espirros e congestão nasal ($p < 0.05$). No meio e final da safra houve relato do aumento na dificuldade para respirar ($p < 0.05$). Além disso, todos trabalhadores apresentaram alterações significativas de pressão arterial sistólica e diastólica, frequência cardíaca ($p < 0.0001$) e respiratória ($p = 0.001$) na safra. **Conclusão:** Conclui-se que cortadores de cana-de-açúcar apresentaram aumento da frequência e intensidade de sintomas nasais além de alterações nos parâmetros hemodinâmicos principalmente durante o meio da safra.

Palavras-chave: Sinais e Sintomas Respiratórios; Pressão sanguínea; Exposição ocupacional; Saúde do trabalhador; Cana-de-açúcar; Material particulado fino.

ABSTRACT

Background: The manual cutting requires a high workload from sugarcane cutters. This process increases the respiratory rate and pulmonary ventilation, which provokes a higher inhalation of pollutants from the biomass burnt at night. Taking this into account, the aim of this study was to evaluate the frequency and intensity of nasal symptoms as well as the hemodynamic parameters of sugarcane cutters exposed to biomass burning. **Methods:** 41 sugarcane cutters were evaluated (male, age 40.6 ± 10.7 years, BMI 25.3 ± 4 kg/m²). All the participants were assessed in relation to workload, hemodynamic parameters and respiratory symptoms at: pre-harvest, middle and end of the harvest. During these periods, particulate matter concentrations (PM_{2.5}) were collected. **Results:** In the middle of the harvest we observed a significant increase in frequency and intensity of sneezing and nasal congestion ($p < 0.05$). In the middle and end of the harvest there was an increase of intensity and difficulty in breathing ($p < 0.05$). Moreover, all workers presented significant alterations of systolic and diastolic blood pressure, heart rate ($p < 0.0001$) and respiratory frequency ($p = 0.001$) during the harvest. **Conclusion:** Sugarcane cutters have had an increase of frequency and intensity of nasal symptoms and alterations in hemodynamic parameters during the middle of the harvest.

Keywords: Signs and Symptoms, Respiratory; Blood pressure; Occupational exposure; Occupational health; Saccharum; Fine particulate matter.

INTRODUÇÃO

O interesse mundial em substituir combustíveis fósseis por biocombustíveis tem gerado aumento significativo na produção canavieira, e o Brasil por sua vez, se destaca neste cenário, pois se tornou o maior produtor mundial de etanol advindo da cana-de-açúcar [1]. Cerca de seis milhões de hectares são plantados para este cultivo em território nacional [2], sendo que 51% dessa demanda é produzida no Estado de São Paulo [3,4].

Apesar dos avanços tecnológicos e maior mecanização no processo produtivo no setor sucroalcooleiro [5], a colheita da cana-de-açúcar ainda é realizada manualmente [6,7]. Nesse sentido, há a necessidade de se queimar a palha da cana-de-açúcar com o objetivo de eliminar folhas, resíduos do solo e animais peçonhentos, facilitando assim o processo de corte e aumentando a produtividade do setor [8].

A queima da palha da cana-de-açúcar geralmente realizada no período noturno é responsável por uma considerável parcela de emissão de gases e liberações de partículas, como de material particulado fino ($MP_{2.5}$), o que contribui significativamente para efeitos adversos à saúde humana, tais como tosse, coriza e doenças de característica respiratórias principalmente na saúde de trabalhadores rurais, que permanecem expostos e inalam MP em torno de quarenta e oito horas semanais durante o período da safra [9,10].

O processo do corte manual da cana-de-açúcar é uma atividade que impõe ao cortador uma elevada carga física, pois requer a execução de movimentos vigorosos, rápidos e repetitivos [11], onde são cortadas em média de 10 a 12 toneladas de cana com instrumentos de trabalho e vestimentas pesadas [12] sob exposição prolongada às altas temperaturas climáticas, baixa umidade do ar além de inalação constante à fuligem e poeiras [5,13]. Ademais, as condições de moradia e as baixas oportunidades de acesso aos serviços públicos, podem interferir na relação saúde/doença desses trabalhadores [14].

Estudos relatam que o principal fator de risco no corte da cana, é a sobrecarga na atividade cardiorrespiratória do trabalhador, uma vez que o trabalho físico vigoroso como dito anteriormente, exige uma alta taxa de ventilação respiratória, o que ocasiona uma maior inalação de poluentes atmosféricos com conseqüente aumento na probabilidade de inflamação de vias aéreas superiores, conhecidas como a primeira linha de defesa contra microrganismos inalados [11,15-17].

Sendo assim, a partir da inalação de altas concentrações de substâncias oxidantes e pré-oxidantes contidos nos poluentes atmosféricos advindos da queima de cana-de-açúcar, ocorre a formação de radicais livres que por deficiência imunológica não são neutralizados pelas defesas do organismo, induzindo assim uma resposta inflamatória com a liberação de células e mediadores inflamatórios desde vias áreas superiores até vias aéreas mais inferiores [18,19].

Diante do exposto, tendo em vista os prejuízos causados por essa atividade na saúde dos trabalhadores rurais envolvidos no corte manual de cana-de-açúcar, algumas medidas têm sido tomadas prevendo a substituição gradativa dessa prática pela mecanização da colheita, como por exemplo, a lei do estado de São Paulo 11.241 de setembro de 2002, que dispõe sobre a eliminação da queima da cana-de-açúcar noturna precedida pelo corte manual. No entanto, essa lei ainda não é totalmente cumprida e essa pratica ainda acontece em outros estados, devido a dificuldade da utilização de colheitadeiras em solos irregulares.

Sendo assim, torna-se de grande importância o conhecimento sobre os efeitos da exposição aos poluentes atmosféricos sobre sintomas nasais e parâmetros hemodinâmicos desta população diretamente envolvida na prática do corte da cana-de-açúcar. Deste modo, o objetivo do estudo foi avaliar a frequência e intensidade de sintomas nasais assim como os parâmetros hemodinâmicos de cortadores de cana-de-açúcar expostos à queima de biomassa durante a safra.

Métodos

Delineamento do estudo

Para o presente estudo foram avaliados 41 cortadores de cana-de-açúcar do gênero masculino, provenientes de uma usina sucroalcooleira no oeste do Estado de São Paulo, Brasil. As avaliações ocorreram em três períodos: (a) pré-safra – período de três a quatro meses de não exposição à queima de cana-de-açúcar (março e abril); (b) meio da safra - após três meses de safra (julho) e (c) final da safra - após sete meses de safra (outubro) - período de exposição à queima de cana-de-açúcar.

Foram avaliados: idade, peso, estatura, pressão arterial sistólica (PAS) e diastólica (PAD) frequência cardíaca (FC), frequência respiratória (f) e aplicação de questionário em relação ao número de safras trabalhadas anteriormente, média de cana colhida por dia, hábito tabagístico e sintomas nasais. Todas as avaliações foram realizadas no local de trabalho dos cortadores de cana no período matutino entre sete e nove horas.

Os voluntários foram previamente comunicados sobre os objetivos e procedimentos da pesquisa e, após concordância e assinatura com o termo de consentimento livre e esclarecido de acordo com a Declaração de Helsinki da Associação Médica Mundial, participaram de modo voluntário e efetivo do estudo. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa (parecer nº 644.598).

Dados Antropométricos e Parâmetros Hemodinâmicos

Após 10 minutos de repouso, os voluntários permaneceram na posição sentada, pernas descruzadas, pés apoiados no chão, dorso recostado na cadeira e relaxado [20] para a avaliação dos parâmetros hemodinâmicos, como: pressão arterial (PA), aferida por meio do esfigmomanômetro manual (Premium, Brasil), FC e saturação periférica de oxigênio (SpO₂)

aferidos por oxímetro de pulso (Mindray PM 50, Brasil) e f por meio de contagens de incursões respiratórias durante um minuto.

Para as medidas antropométricas de peso (Kg) e estatura (metros), todos os trabalhadores foram instruídos a ficarem descalços e retirarem todo o equipamento de trabalho como perneiras, luvas e toucas tipo árabe. Para tais medidas foram utilizados uma balança digital (Welmy R/I 200, Brasil) e um estadiômetro (Sanny, Brasil) respectivamente. A partir da mensuração do peso e estatura, foi obtido o índice de massa corporal (IMC) por meio da seguinte fórmula: $(\text{quilogramas})/\text{estatura}^2(\text{metros})$ [21].

Questionário de Sintomas Nasais

Para avaliação dos sintomas nasais foi utilizado um questionário adaptado do *Wisconsin Upper Respiratory Symptom Survey-21* (WURSS-21) traduzido para a língua portuguesa [22]. O WURSS-21 foi desenvolvido para verificar infecções ou inflamações do trato respiratório superior (ITRS). Deste modo, foi selecionado cinco questões referentes aos sintomas nasais. As questões são referentes à presença e intensidade de sintomas, sendo elas:

1. Apresenta coceira no nariz com frequência?
2. Apresenta crises de espirro frequentes?
3. Sente o nariz entupido com frequência?
4. Sente o nariz escorrer com frequência?
5. Respira com mais dificuldade em lugares que tenham muita poeira, ou quando o clima muda?

Em caso de respostas afirmativas às questões acima, os indivíduos eram orientados a atribuir uma nota de 1 a 10 de acordo com a severidade do sintoma, sendo 1 intensidade muito leve do sintoma relatado, e 10 intensidade muito alta do sintoma relatado. Os trabalhadores

responderam ao questionário de sintomas nasais antes do início da jornada de trabalho na pré-safra, meio da safra e final da safra.

Avaliação Ambiental

A mensuração da concentração atmosférica de $MP_{2.5}$ foi realizada por meio de um espectrofotômetro de massa portátil PM DUSTTRAK Aerosol Monitor, Modelo 8520 (TSI Inc., Mn, EUA), calibrado com uma taxa de fluxo de 1,7L/min gerando um valor de MP expressos em $\mu\text{g}/\text{m}^2$ [23]. O monitor de $MP_{2.5}$ foi instalado próximo ao local de trabalho dos cortadores de cana, onde a atividade de corte manual da cana-de-açúcar foi realizada. Os dados adquiridos em pré-safra, meio e final de safra foram transferidos através de um programa próprio do fabricante e exportados para uma planilha de dados.

Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do software SPSS 15.0. Para dados categóricos os resultados foram apresentados em frequência e percentual, e os dados contínuos foram descritos utilizando-se média e desvio-padrão para variáveis simétricas e medianas e os intervalos interquartis (entre os percentis 25 e 75) para os dados assimétricos. As comparações da presença e/ou ausência dos sintomas nasais na pré-safra, meio e final da safra foram realizadas pelo teste McNemar. Para comparação intergrupos de acordo com o hábito tabagístico foi utilizado o teste de ANOVA One Way seguido do pós-teste de Bonferroni para dados paramétricos e teste de Kruskal-Wallis para dados não paramétricos. Já para as análises intragrupos foi realizado o teste ANOVA para medidas repetidas com pós-teste de Bonferroni para dados paramétricos e teste de Friedman para dados não paramétricos. Para avaliar a relação dos sintomas nasais e parâmetros hemodinâmicos com os níveis de $MP_{2.5}$ foi utilizado o teste de correlação de Pearson, para dados paramétricos, e Spearman,

para dados não paramétricos. Os parâmetros de magnitude de correlação foram considerados segundo Portney e Watkins [24], sendo que: de 0.00 a 0.25 correlação pequena ou nenhuma; > 0.25 a 0.50 correlação razoável; > 0.50 a 0.75 correlação moderada para boa; > 0.75 correlação boa para excelente; e 1.00 correlação perfeita. O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5% ($p < 0,05$).

Resultados

As características gerais dos 41 trabalhadores avaliados estão presentes na Tabela 1.

INSERIR TABELA 1

A Tabela 2 apresenta as medidas registradas da concentração atmosférica de $MP_{2.5}$, que durante o meio e final da safra apresentaram concentrações significativamente maiores comparado com a pré-safra ($p < 0.0001$).

INSERIR TABELA 2

A Figura 1 demonstra a frequência dos sintomas nasais de cortadores de cana-de-açúcar. Observamos que o sintoma espirros aumentou significativamente no meio da safra em comparação com a pré-safra ($p = 0.012$) e final da safra ($p = 0.008$), assim como congestão nasal que obteve aumento significativo no meio da safra comparado com o final da safra ($p = 0.039$).

INSERIR FIGURA 1

Com relação a intensidade pode notar que todos os trabalhadores durante os períodos, apresentaram aumento significativo dos sintomas espirros ($p=0.010$), congestão nasal ($p=0.035$) no meio da safra. Em adição, houve aumento de relatos na dificuldade para respirar ($p=0.003$) no meio e final da safra (Figura 2). Na análise intergrupos de acordo com o hábito tabagístico não foi observado diferença significativa em relação a frequência e intensidade dos sintomas avaliados.

INSERIR FIGURA 2

O aumento nas concentrações de $MP_{2.5}$ no meio da safra se correlacionaram positivamente com a intensidade do sintoma espirros ($r=0.347$; $p=0.03$). Também foi observado correlação inversa ($r= -0.391$; $p=0.01$) entre os cortadores que trabalhavam por menos safras com o aumento da intensidade de congestão nasal no meio da safra.

A Figura 3 demonstra os parâmetros hemodinâmicos de todos os trabalhadores, onde observa-se alterações significativas para as variáveis PAS ($p<0.0001$) e PAD ($p<0.0001$) da pré-safra para meio e final da safra; FC ($p<0.0001$) do final da safra para a pré-safra e meio da safra; e f ($p=0.001$) do meio da safra para o final da safra, independente do hábito tabagístico.

INSERIR FIGURA 3

Discussão

Os principais achados do presente estudo indicam que em períodos de queima de cana-de-açúcar indivíduos que exercem a função de corte de cana-de-açúcar, apresentam agravos na frequência e intensidade de sintomas nasais, além de alterações nos parâmetros hemodinâmicos, independente do hábito tabagístico. Sendo assim, observou-se no período de

meio de safra um aumento significativo da frequência e intensidade dos sintomas espirros e congestão nasal, e da intensidade em dificuldade para respirar, além de aumento na pressão arterial, frequência respiratória e diminuição da frequência cardíaca. Estas alterações por sua vez, obtiveram relação com as concentrações de MP_{2,5}.

As alterações no sistema respiratório destes indivíduos vêm sendo descrito na literatura [25,26] e podem ser atribuídos principalmente à inalação de MP provenientes da queima de cana-de-açúcar e da re-suspensão do material erodido do solo pela própria movimentação dos trabalhadores. Além disso, o ambiente do corte de cana pode ser rico em monóxido de carbono (CO), dióxido de enxofre (SO₂) e ozônio (O₃), que junto com a inalação de MP pode ter efeitos deletérios nos mecanismos de defesa do sistema respiratório [10].

Uma das hipóteses é de que exista uma resposta inflamatória no aparelho respiratório induzida pela ação de substâncias oxidantes [27,28], que pode acarretar alterações nas propriedades reológicas e quantidade de muco, desta forma estas condições tem impacto direto na eficácia de resposta do sistema respiratório [10]. Dentre os mecanismos de defesa o transporte mucociliar pode estar com sua ação reduzida [25], podendo assim ocorrer alta prevalência de manifestação de sintomas respiratórios, os quais podem ser relatados por 70 a 88% dos cortadores de cana, como descrito previamente na literatura [26,29].

Além do prejuízo no sistema mucociliar, a prevalência dos sintomas avaliados no presente estudo podem estar relacionados com a irritação aguda e/ou crônica da mucosa nasal. Estudos já evidenciaram um possível indício de desenvolvimento de rinite ocupacional, a qual é secundária a uma reação hipersensitiva mediada pelo sistema imune e pode ser desencadeada por mais de 200 tipos de agentes, com conseqüente aumento do fluxo de eosinófilos e manifestação de sintomas respiratórios como congestão nasal, prurido, espirros e coriza, podendo atingir até 7.5% dos trabalhadores [30,31]. Assim, a monitorização destes

indivíduos e investigação mais intensa de seus sintomas mostram-se essenciais em futuros estudos.

Adicionados as condições ambientais, o estresse físico e psicológico provocado pela prática durante o corte de cana-de-açúcar reflete resultados sobre o impacto da trajetória de trabalho desses indivíduos. Em se tratando de estresse, o presente estudo evidenciou uma carga diária de oito horas com apenas dois intervalos de quinze minutos, durante seis dias semanais, e uma média de 8.8 toneladas de cana cortada sob fiscalização, dessa forma é possível o entendimento sobre a vulnerabilidade às manifestações de desgaste físico após um safra canavieira. Em um estudo de Priuli et al. [32] trabalhadores rurais com sintomas de estresse apresentou indícios de desgaste físico generalizado, que por sua vez, condicionou a vulnerabilidade às infecções por microorganismo.

Em contrapartida é de importância ressaltar que as condições de trabalho, que por muitas vezes ultrapassa os limites físicos desta população [11,12,33], acaba por provocar sinais e sintomas cardiorrespiratórios que por depressão do sistema imunológico ocasiona a liberação de neutrófilos respiratórios e proliferação de linfócitos e monócitos [26].

Estas alterações como dito anteriormente proporciona estresse oxidativo e inflamação pulmonar podendo torna-se sistêmica induzindo alterações na pressão arterial tanto sistólica como diastólica, pois estudos evidenciam uma associação entre poluentes e aumento da pressão arterial por disfunção vascular, endotelial, vasoconstrição e remodelação cardíaca além do desequilíbrio no sistema nervoso autônomo [34-37], que corrobora com os achados do presente estudo onde observou aumento tanto na pressão sistólica quanto diastólica no período de meio e final de safra.

Deste modo, entende-se que cortadores de cana-de-açúcar durante a safra apresentam aumento na frequência e intensidade de sintomas nasais e parâmetros hemodinâmicos e isso por sua vez, parece estar associado as condições tanto ambientais quanto da própria jornada

de trabalho, onde indivíduos que trabalhavam por menos safras apresentaram relação inversa com aumento da intensidade do sintoma congestão nasal no período de meio de safra.

Entre as limitações do estudo é possível de ser citado o número de momentos avaliados por meio do auto-relato através de questionários aplicados nos sujeitos da amostra. Nesse tipo de avaliação podem ocorrer subestimação de respostas associadas a possíveis vies de memórias. Outro fator a ser considerado é a ausência de mulheres no presente estudo, o que não permite a extrapolação considerando o sexo. Porém como principal aspecto do estudo considera o seu caráter longitudinal sendo que três cortes de avaliações foram considerados na metodologia o que permite analisar relações de causalidade entre trabalhar na safra e associações com sintomas nasais e hemodinâmicos. Com isso, o estudo procura contribuir e orientar políticas preventivas e intervencionistas de saúde desta população.

Conclui-se que trabalhadores rurais que exercem a função de corte de cana-de-açúcar, apresentam aumento da frequência e intensidades de sintomas nasais, assim como em parâmetros hemodinâmicos, o que pode estar associado a somatória das condições ambientais e do trabalho principalmente em período do meio da safra.

Referências

1. FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available online: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> (accessed 7 March 2015).
2. Alves, F.J.C; Novaes, J.R.P. Migrants - work and workers in complex agroindustrial sugarcane (the agribusiness heroes Brazilian). São Carlos: Ed. UFSCAR **2007**, 1-5. (in Portuguese).
3. UNICA. União da Indústria da cana de açúcar. Sao Paulo; 2014. Available online: <http://www.unica.com.br/noticia/6551584920310621254/sao-paulo-fecha-safra-2013-porcento2F2014-com-colheita-mecanizada-em-83-porcento-dos-canaviais/> (accessed 15 March 2015). (in Portuguese).
4. Uriarte, M.; Yackulic, C.B.; Cooper, T.; Flynn, D.; Cortes, M.; Crk, T.; et al. Expansion of sugarcane production in São Paulo, Brazil: Implications for fire occurrence and respiratory health. *Agric. Ecosyst. Environ.*, **2009**, 132, 48-56.
5. Bitencourt, D.P.; Ruas, A.C.; Maia, P.A. Analysis of the contribution of meteorological variables to thermal stress associated with death among sugarcane cutters. *Cad. Saude Publica*, **2012**, 28(1), 65-74.
6. Verçoza, L.V.; Silva, M.A.M. The resistance of workers in the sugarcane fields alagoanos. *Agrária. São Paulo*, **2012**, 13, 137-168. (in Portuguese).
7. Ribeiro, H.; Ficarelli, T.R.A. Sugarcane burning and perspectives for harvesters in Macatuba, São Paulo. *Saude soc.* **2010**, 19(1), 48-63. (in Portuguese).
8. Ribeiro, H. Sugar cane burning in Brazil: respiratory health effects. *Rev. Saude Publica* **2008**, 42, 370-6.
9. França, D.A.; Longo, K.M.; Soares-Neto, T.G.; Santos, J.C.; Freitas, S.R.; Rudorff, B.F.T.; et al. Pre-harvest sugarcane burning: determination of emission factors through laboratory measurements. *Atmosphere*, **2012**, 3, 164-80.
10. Cançado, J.E.D.; Braga, A.; Pereira, L.A.A.; Arbex, M.A.; Saldiva, P.H.N.; Santos, U.P. Clinical repercussions of exposure to atmospheric pollution. *J. bras. pneumol.* **2006**, 32(Supl 1), S5-S11.
11. Laat, E.F.; Vilela, R.A.G.; Silva, A.J.N.; Luz, V.G. Impact over the worn conditions: physical wear of sugarcane cutters. In: Impactos da Indústria Canavieira no Brasil. Rio de Janeiro: Plataforma BNDES, **2008**, 36-46. Available online: <http://www.fesecuador.org/media/pdf/Impactos%20de%20la%20ca%C3%B1a%20de%20az%C3%BAcar.pdf> (accessed 20 March 2015). (in Portuguese).
12. Rocha, F.L.R.; Marziale, M.H.P.; Hong, O.S. Work and health conditions of sugar cane workers in Brazil. *Rev. Esc. Enferm. USP* **2010**, 44(4), 978-983.
13. Alves, F. Why are the sugar cane harvesters dying?. *Saude soc.* **2006**, 15(3), 90-98. (in Portuguese).

14. Alessi, N.P.; Navarro, V.L. Health and work in rural areas: sugar cane plantation workers in Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. *Cad. Saude Publica*, **1997**, 13(2), 111-121. (in Portuguese).
15. Prado, G.F.; Zanetta, D.M.T.; Arbex, M.A.; Braga, A.L.; Pereira, L.A.A.; Marchi, M.R.R.; et al. Burnt sugarcane harvesting: Particulate matter exposure and the effects on lung function, oxidative stress, and urinary 1-hydroxypyrene. *Sci. Total Environ.* **2012**, 437, 200–208.
16. Arbex, M.A.; Cançado, J.E.D.; Pereira, L.A.A.; Braga, A.L.F.; Saldiva, P.H.N. Biomass burning and health effects. *J. bras. pneumol.* **2004**, 30(2), 158-175. (in Portuguese).
17. Torres-Duque, C.; Maldonado, D.; Perez-Padilla, R.; Ezzati, M.; Viegi, G. Forum of International Respiratory Studies (FIRS) Task Force on Health Effects of Biomass Exposure. Biomass fuels and respiratory diseases: a review of the evidence. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2008**, 15, 577–90.
18. Arbex, M.A.; Santos, U.P.; Martins, L.C.; Saldiva, P.H.; Pereira, L.A.; Braga, A.L. Air pollution and the respiratory system. *J. bras. pneumol.* **2012**, 38, 643-55.
19. Shusterman, D. The effects of air pollutants and irritants on the upper airway. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2011**, 8, 101-05.
20. Brazilian Society of Cardiology / Brazilian Society of Hypertension / Brazilian Society of Nephrology. VI Brazilian Guidelines for Hypertension. *Arq. Bras. Cardiol.* **2010**, 95(1 supl.1), 1-51. (in Portuguese).
21. Lohman, T.G. *Advances in Body Composition Assessment*. Mon. 3. Champaign, Illinois: Human Kinetics Publishers, 1992.
22. Moreira, A.; Cavazzoli, P.B. [Monitoring training due portuguese versions of Wisconsin Upper Respiratory Symptom Survey-21 and daily analysis of life demands in athletes]. *R. da Educação Física/UEM*, **2009**, 20(1), 109-119. (in Portuguese).
23. Goto, D.M.; Obuti, C.A.; Barbosa, C.M.G.; Saldiva, P.H.N.; Zanetta, D.M.T.; Lorenzi-Filho, G.; et al. Effects of biomass burning on nasal mucociliary clearance and mucus properties after sugarcane harvesting. *Environ. Res.* **2011**, 111, 664–669.
24. Portney, L.G.; Watkins, M.P. *Foundations of clinical research: application to practice*. 3th ed. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice-Hall, 2009.
25. Ceccato, A.D.F.; Ramos, E.M.C.; Carvalho-Junior, L.C.S.; Xavier, R.F.; Teixeira, M.F.S.; Pereira, P.A.R.; et al. Short terms effects of air pollution from biomass burning in mucociliary clearance of Brazilian sugarcane cutters. *Respir. Med.* **2011**, 105, 1766-1768.
26. Romeo, L.; Dalle-Molle, K.; Zanoni, G.; Peretti, A.; Marangi, G.; Conrado, L.G.; Aragón, A.; et al. Respiratory health effects and immunological response to *Thermoactinomyces* among sugar cane workers in Nicaragua. *Int. J. Occup. Environ. Health*, **2009**, 15(3), 249-54.

27. Gascon, M.; Kromhout, H.; Heederik, D.; Eduard, W.; Van-Wendel de Joode, B. Respiratory, allergy and eye problems in bagasse-exposed sugar cane workers in Costa Rica. *Occup. Environ. Med.*, **2012**, 69(5), 331-8.
28. Mostafavi, N.; Vlaanderen, J.; Chadeau-Hyam, M.; Beelen, R.; Modig, L.; Palli, D.; et al. Inflammatory markers in relation to long-term air pollution. *Environ. Int.*, **2015**, 81, 1-7.
29. Robins, T.G.; Salie, F.; Gwagwa, T. Occupational hazards, living conditions, and physical assault of sugar cane workers in KwaZulu-Natal, South Africa. *S. Afr. Med. J.*, **1998**, 88(9), 1117-27.
30. Galvão, C.E.S. Occupational asthma and rhinitis – immunoallergic view. *Rev. Bras. Alerg. Imunopatol.*, **2010**, 33(1), 2-7. (in Portuguese).
31. Stevens, W.W.; Grammer, L.C. Occupational rhinitis: an update. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, **2015**, 15(1), 487.
32. Priuli, R.M.A.; Moraes, M.S.; Chiaravalloti, R.M. The impact of stress on the health of sugar cane cutters. *Rev. Saude Publica*, **2014**, 48(2), 225-231.
33. Carvalho-Junior, L.C.S.; Ramos, E.M.C.; Toledo, A.C.; Ceccato, A.D.F.; Macchione, M.; Braga, A.L.F.; et al. Assessment of health-related quality of life of sugarcane cutters in the pre-harvest and harvest periods. *Rev. Saude Publica*, **2012**, 46(6), 1058-65.
34. Barbosa, C.M.; Terra-Filho, M.; de Albuquerque A.L.; Di-Giorgi, D.; Grupi, C.; Negrao, C.E.; et al. Burnt sugarcane harvesting - cardiovascular effects on a group of healthy workers, Brazil. *PLoS One*, **2012**, 7(9), e46142.
35. Santos, U.P.; Braga, A.L.F.; Giorgi, D.M.; Pereira, L.A.A.; Grupi, C.J.; Lin, C.A.; et al. Effects of air pollution on blood pressure and heart rate variability: a panel study of the vehicular traffic controllers in the city of Sao Paulo, Brazil. *Eur. Heart J.*, **2005**, 26, 193-200.
36. Brook, R.D.; Urch, B.; Dovonch, J.T.; Bard, R.L.; Speck, M.; Keeler, G.; et al. Insights into mechanisms and mediators of the effects of air pollution exposure on blood pressure and vascular function in healthy humans. *Hypertension*, **2009**, 54, 659–667.
37. Baumgartner, J.; Schauer, J.J.; Ezzati, M.; Lu, L.; Cheng, C.; Patz, J.A.; et al. Indoor Air Pollution and Blood Pressure in Adult Women Living in Rural China. *Environ Health Perspect.*, **2011**, 119(10), 1390–1395.

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1. Características gerais dos cortadores de cana-de-açúcar do Oeste do estado de São Paulo.

Características gerais, [média±desvio padrão]	
Idade (anos)	40.6±10.7
IMC (Kg/m ²)	25.3±4.0
Anos-maço	12.5±14.1
Cigarros dia	13.5±10.8
Cana colhida/dia (toneladas)	8.8±2.1
Número de safras trabalhadas, N(%) ^a	
1 a 5	8 (20)
6 a 10	21 (51)
>10	12 (29)
Hábito Tabagístico, N(%) ^b	
Não tabagista	21 (51)
Tabagista	7 (17)
Ex-tabagista	13 (32)

IMC: índice de massa corporal, ^a: Diferença em relação ao número de safras trabalhadas (p=0,039), ^b: Diferença na frequência em relação ao hábito tabagístico (p=0,027), Teste qui-quadrado univariado

Tabela 2. Medidas atmosféricas de MP_{2.5} no canalial durante os períodos do estudo. Dados expressos em mediana e intervalo 25-75%.

	Safra			<i>p</i> -valor [†]
	Pré-safra	Meio	Final	
MP _{2.5} (µg/m ³)	28.00 (24.00-37.38)	111.50 ^a (96.42-122.50)	90.63 ^{ab} (36.39-131.90)	<0,0001

MP_{2.5}: Material particulado fino, ^a: diferente de pré-safra, ^b: diferente de meio da safra, [†]: ANOVA para medidas repetidas com pós teste de Bonferroni.

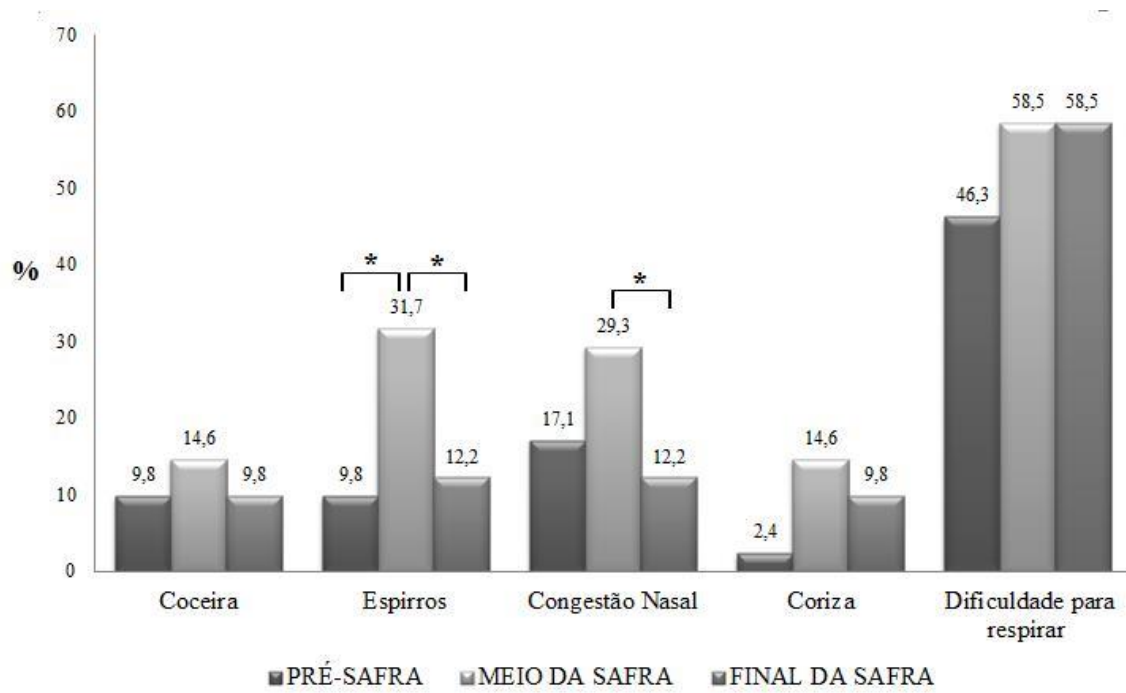


Figura 1. Comportamento da frequência dos sintomas nasais de cortadores de cana-de-açúcar.

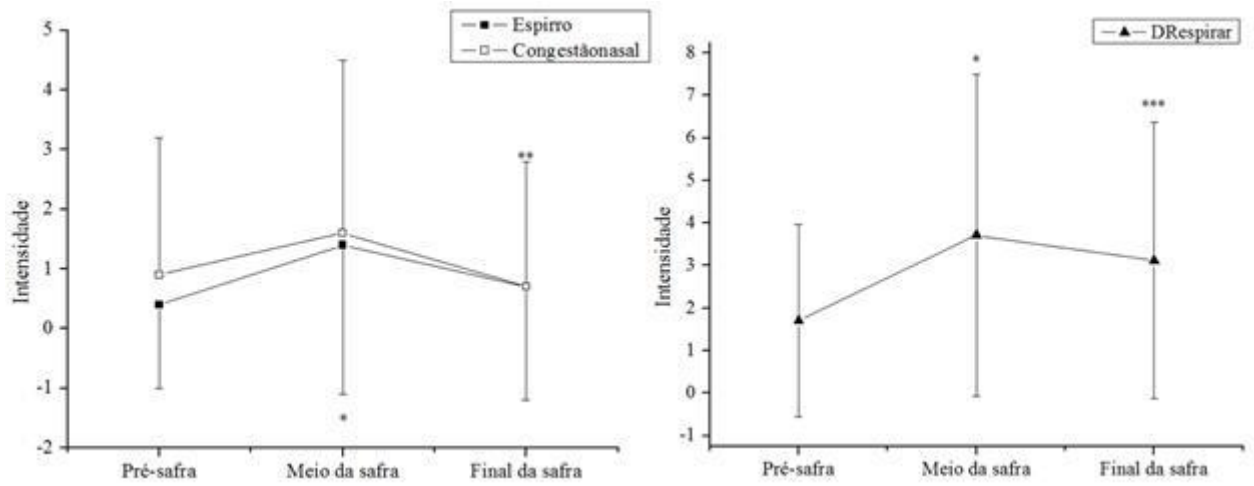


Figura 2. Comportamentos da intensidade dos sintomas nasais de cortadores de cana-de-açúcar.

*: pré-safra diferente de meio da safra ($p=0.031$), **: meio da safra diferente de final da safra ($p=0.045$), ***: pré-safra diferente de final da safra ($p=0.030$), DRespirar: dificuldade para respirar

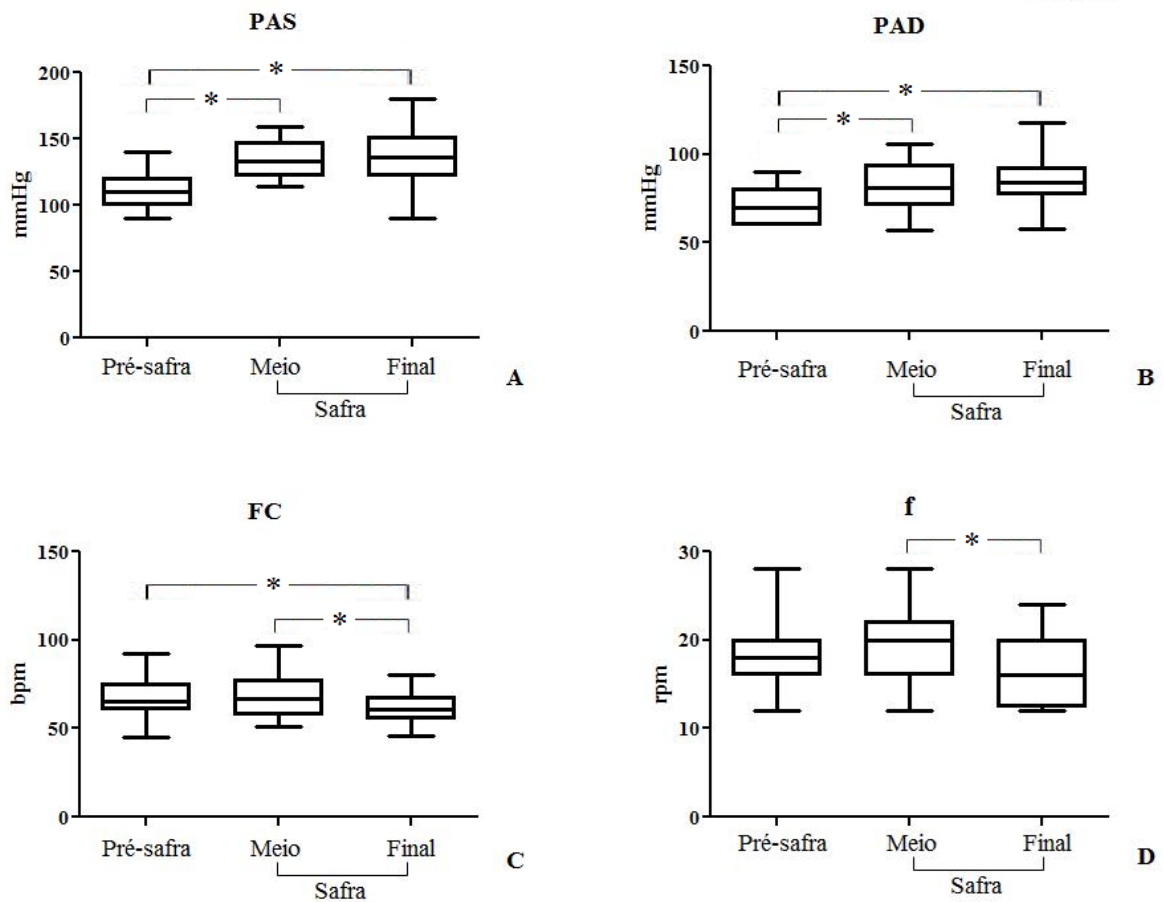


Figura 3. Comportamento dos sinais vitais nos períodos de pré-safra, meio da safra e final da safra.

PAS: pressão arterial sistólica, PAD: pressão arterial diastólica, FC: frequência cardíaca, f: frequência respiratória, A/B: meio de final da safra diferente de pré-safra ($p < 0.0001$), C: final da safra diferente de pré-safra ($p = 0.002$) e meio da safra ($p < 0.0001$), D: meio da safra diferente de final da safra ($p = 0.001$)

Perfil inflamatório nasal e sistêmico por inalação de material particulado fino em cortadores de cana-de-açúcar tabagistas e não tabagistas

Iara B. Trevisan¹, Fábio Santos de Lira², Ana Paula Coelho Figueira Freire¹, Bruna Spolador de Alencar Silva¹, Diego Giuliano D. Christofaro², Marcell Rocha Leite³, Aline Duarte Ferreira¹, Ercy Mara Cipulo Ramos¹, Dionei Ramos¹

1- Departamento de Fisioterapia, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Presidente Prudente, Brasil.

2- Departamento de Educação Física, Universidade Estadual de São Paulo (UNESP), Presidente Prudente, Brasil.

3- Departamento de Pneumologia, Universidade de São Paulo (USP), Brasil.

Autor correspondente

Iara Buriola Trevisan

Departamento de Fisioterapia, Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Rua Roberto Simonsen, no 305

Presidente Prudente, SP 19060-900 (Brasil)

E-mail: iara_buriola@hotmail.com

"Conflitos de interesse: nenhum"

RESUMO

Objetivo: Avaliar o perfil inflamatório nasal e sistêmico de trabalhadores tabagistas e não tabagistas envolvidos no corte manual de cana-de-açúcar expostos à queima de biomassa durante uma safra. **Métodos:** Foram avaliados 45 cortadores de cana-de-açúcar do gênero masculino de uma usina de açúcar e álcool, divididos em dois grupos: não tabagista (n=24) e tabagista (n=21). Inicialmente os trabalhadores responderam um questionário de saúde geral e ocupacional. Em seguida foram coletados níveis de monóxido de carbono exalado (COex), carboxihemoglobina (HbCO), lavado nasal para análise de IL-6, IL-10 e IL-4 e coleta de sangue venoso para análise de TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10, além da contagem total de monócitos e neutrófilos. Todas as avaliações aconteceram durante a pré-safra (março), meio da safra (julho) e final da safra (outubro) de 2014. Durante os mesmos períodos foram registrados valores de material particulado fino (MP_{2,5}). **Resultados:** Em soro sanguíneo houve diminuição significativa ao final da safra nas concentrações de IL-8 e contagem de neutrófilos tanto em não tabagistas como em tabagistas. Houve aumento significativo nas concentrações de IL-10 de indivíduos tabagistas comparado com não tabagistas em soro sanguíneo. Em lavado nasal todos os trabalhadores não apresentaram mudanças significativas em níveis de IL-6, IL-10 e IL-4. **Conclusões:** Conclui-se que trabalhadores tabagistas apresentam aumento da produção de IL-10 no meio da safra e que independente do hábito tabagístico trabalhadores expostos à queima de biomassa a longo prazo apresentam diminuição nas concentrações de IL-8 e número de neutrófilos a nível sistêmico. Tais achados podem estar associados ao tempo de exposição à queima de biomassa com possível desenvolvimento de tolerância a endotoxina.

Palavras-chave: exposição ocupacional, cana-de-açúcar, material particulado fino, inflamação.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the nasal and systemic inflammatory profile of nonsmokers and smokers workers involved in manual cutting of sugarcane exposed to biomass burning during a harvest. **Methods:** 45 sugarcane cutters, male cutters from a sugar and alcohol plant, were divided into two groups: nonsmokers (n = 24) and smokers (n = 21). Initially the workers answered a questionnaire of general health and occupational. Then were collected exhaled carbon monoxide levels (exCO), carboxyhemoglobin (HbCO), nasal lavage for analysis of IL-6, IL-10 and IL-4 and collection of blood serum for analysis of TNF- α , IL-6, IL-8 and IL-10, besides the total count of monocytes and neutrophils at the venous blood. All evaluations occurred during the pre-harvest (March), middle of harvest (July) and end of harvest (October) in 2014. During the same periods were recorded the values of fine particulate matter (PM_{2.5}). **Results:** In blood serum decreased significantly at the end of harvest in concentrations of IL-8 and neutrophils in non-smokers and in smokers. There was a significant increase in IL-10 concentrations in smokers compared to nonsmokers in blood serum. In nasal lavage all workers involved in manual cutting of sugarcane showed no significant changes in IL-6, IL-10 and IL-4 levels. **Conclusions:** We conclude that smoking workers show increased IL-10 concentrations in the middle of harvest and that regardless of habit smoking workers exposed to long-term biomass burning have decreased in IL-8 concentrations and neutrophil counts at the systemic level. These findings may be related to the time of exposure to biomass burning with possible development of endotoxin tolerance.

Keywords: occupational exposure, saccharum, fine particulate matter, inflammation.

Introdução

O Brasil é o maior produtor mundial de açúcar e álcool a partir do cultivo da cana-de-açúcar¹. Mais de 50% desse cultivo se encontra na região Centro-Sul do país², onde cerca de 597 mil toneladas de cana-de-açúcar foram colhidas na safra de 2013/2014³.

Apesar dos avanços tecnológicos neste setor, a colheita manual ainda é um método utilizado nas usinas sucroalcooleira⁴. Para facilitar o corte manual e eliminar a ocorrência de acidentes por animais peçonhentos, há a necessidade da queima noturna da cana-de-açúcar^{5,6}. No entanto, a queima de biomassa é a maior fonte de produção de material particulado (MP), e gases tóxicos⁷⁻⁹.

O MP é o principal poluente emitido pela queima de biomassa, constituído de uma mistura complexa de partículas sólidas ou líquidas contendo ácidos, produtos químicos orgânicos, metais, e partículas do solo ou poeira, derivadas de fontes naturais ou antropogênicas¹⁰.

O trabalho do corte de cana-de-açúcar exige um alto desempenho físico que acaba provocando além do desgaste físico e psicológico uma sobrecarga respiratória^{7,11}. Essa sobrecarga respiratória vem acompanhada do aumento do trabalho ventilatório e por conseguinte aumento da inalação de poluentes advindos da queima de biomassa¹².

Inicialmente o MP inalado induz uma inflamação local nas vias aéreas e pulmão causando danos pulmonares com diminuição da capacidade pulmonar, remodelamento das vias aéreas, inflamação crônica ocasionando a longo prazo o desenvolvimento de algumas doenças como asma e doença pulmonar obstrutiva crônica^{11,13}.

Similar a inflamação local, o MP também gera inflamação sistêmica, sendo ocasionada pela quantidade de partículas fagocitadas por macrófagos alveolares no pulmão que estimulam a medula óssea a liberar mediadores circulantes causadores de inflamação^{14,15},

que pode estar associado com o aparecimento de doenças cardiovasculares incluindo arritmias, insuficiência cardíaca, infarto e isquemia do miocárdio^{16,17}.

No entanto a exposição repetida ao um ambiente com altos níveis de MP pode também induzir mecanismos de compensação na tentativa de atenuar processos inflamatórios com a produção de produtos responsáveis pela remodelação tecidual¹⁸.

Deste modo, apesar das grandes evidências dos efeitos deletérios da exposição ao MP sobre a saúde da população, pouca atenção tem sido dada aos efeitos das exposições ocupacionais, principalmente nos trabalhadores envolvidos no cultivo da cana-de-açúcar. Sendo assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil inflamatório nasal e sistêmico de trabalhadores não tabagistas e tabagistas envolvidos no corte manual de cana-de-açúcar expostos a queima de biomassa durante uma safra.

Métodos

Sujeitos do estudo

Foram avaliados 78 cortadores de cana-de-açúcar, do gênero masculino de uma usina de açúcar e álcool localizada no oeste do estado de São Paulo, Brasil. Desta amostra, os indivíduos foram divididos em dois grupos de acordo com o seu hábito tabagístico: não tabagista (n=40) e tabagista (n=38). Durante as avaliações 16 indivíduos não tabagistas e 17 indivíduos tabagistas perderam follow-up, obtendo uma amostra final de 24 indivíduos não tabagistas e 21 indivíduos tabagistas (Figura 1).

INSERIR FIGURA 1

Os voluntários foram previamente comunicados sobre os objetivos e procedimentos da pesquisa e, após concordância e assinatura com o termo de consentimento livre e

esclarecido de acordo com a Declaração de Helsinki da Associação Médica Mundial, participaram de modo voluntário e efetivo do estudo. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNESP, Presidente Prudente, Brasil (parecer nº644.598). Foram excluídos do estudo indivíduos com doenças pulmonares crônicas pré-existentes e uso de medicamentos anti inflamatórios.

Delineamento do estudo

Todos os procedimentos do estudo foram realizados no campo de plantio e colheita da cana-de-açúcar em três períodos: durante o período de plantio manual (pré-safra – Março 2014) e durante o meio e final da safra (colheita manual da cana-de-açúcar queimada – Julho e Outubro de 2014 respectivamente).

Os voluntários foram previamente entrevistados por meio de questionários sobre a saúde geral (dados pessoais, histórico de tabagismo, cigarros/dia e índice de anos maço) e atividade ocupacional (anos trabalhado, quantidade de cana-de-açúcar colhida/dia e jornada de trabalho). Durante os três períodos de avaliação foram coletados níveis de monóxido de carbono exalado (COex), carboxihemoglobina (HbCO) para comprovação de abstinência do uso do cigarro por 12 horas, coleta de lavado nasal para análise do perfil inflamatório nasal (IL-6, IL-10 e IL-4), coleta de sangue venoso para análise do perfil inflamatório sistêmico (TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10) além da contagem total de monócitos e neutrófilos circulantes. Todos os voluntários foram instruídos a não ingerir alimentos de alto teor calórico e bebida alcoólica por pelo menos 12 horas antes das avaliações.

A análise do material particulado fino (MP_{2,5}) foi realizado no campo de cana-de-açúcar durante a jornada de trabalho dos cortadores que compreendiam entre 7:30 a 15:30 horas durante os períodos de avaliações especificados acima.

Monóxido de carbono no ar exalado e carboxihemoglobina

COex e HbCO foram aferidos por meio de um analisador de monóxido de carbono (CO) (medidor Micro CO, Cardinal Health, UK)¹⁹. Os voluntários foram instruídos a realizarem inspiração profunda seguida de pausa inspiratória de 15-20 segundos, a fim de atingir o equilíbrio entre o CO do sangue e o ar alveolar, permitindo uma estimativa da concentração de CO sanguíneo. Após a pausa respiratória, os voluntários foram orientados a expirar tranquilamente todo o conteúdo de ar no bocal do aparelho, com manutenção de fluxo expiratório constante e lento^{20,21}. A concentração de COex foi expressa em partes por milhão (ppm) e HbCO em %.

Determinação da concentração de citocinas

Lavado nasal

Para coleta de lavado nasal (LN), os voluntários foram orientados a realizar extensão cervical de aproximadamente 30°. A partir disto, foi instilados cinco ml de solução salina (cloreto de sódio a 0,9%) em temperatura ambiente em ambas as narinas. Os voluntários foram instruídos a realizar uma apneia durante 10 segundos sem engolir a solução salina^{22,23}. Em seguida, os voluntários expeliam o conteúdo de fluido nasal em um frasco plástico estéril sem forçar a saída do fluido da narina.

O material obtido foi transferido em tubos eppendorf de 1.5ml imersos em gelo, sendo homogenizados em um Vortex por 30 segundos. Em seguida, as amostras foram colocadas em uma centrífuga refrigerada a 4°C sob rotação de 1000 x g por 10 minutos e o sobrenadante aspirado e armazenado e congelado em tubos eppendorf de 1.5ml a -70°C.

As citocinas pró e anti-inflamatórias quantificadas a partir das amostras dos sobrenadantes obtidos do LN foram: IL-6, IL-10 e IL4.

Soro sanguíneo

Para obtenção de amostras de sangue venoso periférico foram coletados após 15 minutos de repouso, quatro mililitros de sangue venoso a partir da fossa antecubital em tubo à vácuo para coleta sorológica. A coleta foi realizada por um profissional habilitado utilizando equipamentos descartáveis visando a segurança do procedimento. Após a coleta as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm por 15 minutos em centrifuga refrigerada a 4°C, após a separação total o soro foi recolhido e separado em tubos eppendrofs de 1.5ml , sendo armazenado a -70°C. As citocinas pró e anti-inflamatórias quantificadas a partir das amostras do sangue venoso foram: TNF- α , IL-6, IL-10 e IL8.

Análise da concentração de citocinas por método enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

Para determinar as concentrações das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-8 e IL-6) e anti-inflamatórias (IL-10 e IL-4) em lavado nasal e sangue venoso foi utilizado o método enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA). Placas com 96 poços foram sensibilizadas com 100 μ L de anticorpo monoclonal anti-humano (anticorpo de captura) e incubadas *overnight* a 4°C. Após este período, os poços foram lavados por 3 vezes com tampão para lavagem (0.05% Tween 20 em PBS, pH 7.2 - 7.4). Posteriormente, a placa foi bloqueada, para evitar ligações inespecíficas com 200 μ L de solução de bloqueio (1% BSA em PBS, pH 7.2 - 7.4, 0.2 μ m filtrado) e incubada por 1 hora em temperatura ambiente. Ao final deste prazo, os poços foram lavados novamente como descrito acima.

Após o bloqueio, foram adicionados 100 μ L por poço das amostras e dos padrões diluídos previamente em reagente de diluição (1% BSA em PBS, pH 7.2 - 7.4, 0.2 μ m filtrado). Para caracterização do branco foi adicionados 100 μ L reagente de diluição em apenas dois poços. A placa *overnight* a 4°C para máxima sensibilização. Após este período, os

poços foram lavados por 5 vezes com tampão de lavagem (0.05% Tween 20 em PBS, pH 7.2 - 7.4).

Após as lavagens, foram adicionados 100 µL do anticorpo de detecção (Anticorpo anti-humano Biotinilado) diluídos previamente em reagente de diluição (1% BSA em PBS, pH 7.2 - 7.4, 0.2 µm filtrado) na concentração estabelecida pelo fabricante. Em seguida as placas foram seladas e incubadas por 1 hora em temperatura ambiente. Após este período, os poços foram lavados novamente como descrito acima. Posteriormente, foram adicionados 100 µL de Streptoavidina-HRP (1:250) por poço, selados e incubados por 30 minutos em temperatura ambiente, evitando contato com a luz. Em seguida, os poços foram lavados 7 vezes com tampão para lavagem (0.05% Tween 20 em PBS, pH 7.2 - 7.4). Posteriormente, foi adicionado 100 µL/poço da solução de substrato (mistura dos reagentes de cores A - H₂O₂ e B - Tetrametilbenzidina), na diluição de 1:1 e incubado por 15 minutos em temperatura ambiente evitando o contato direto com a luz. A reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 30% por poço sob agitação lenta. A leitura foi feita em leitor de ELISA (Power Wave, Bio-tek) utilizando filtro de 450 nm. O coeficiente de variação inter e intra-placa utilizado foi <7% para todos os kits.

Contagem total de monócitos e neutrófilos

Para contagem total de monócitos e neutrófilos a nível sanguíneo foi utilizado a contagem automatizada por equipamento Coulter, modelo STKS a partir a coleta de quatro mililitros de sangue da veia antecubital em tubo à vácuo para análise hematológica. Este aparelho determinar o tamanho celular, a condutividade celular e as características da dispersão da luz na célula por meio dos raios laser afim de promover a contagem e o volume de eritrócitos e plaquetas; a contagem global de leucócitos e a concentração de hemoglobina,

além de adicionar agentes líticos para remover eritrócitos e estabilizadores para manter os leucócitos em seu estado nativo para a contagem diferencial^{24,25}.

Avaliação Ambiental

A mensuração da concentração atmosférica de $MP_{2.5}$ foi realizada por meio de um espectrofotômetro de massa portátil PM DUSTTRAK Aerosol Monitor, Modelo 8520 (TSI Inc., Mn, EUA), calibrado com uma taxa de fluxo de 1,7L/min gerando um valor de PM expressos em $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ²⁶. O monitor de $MP_{2.5}$ foi instalado próximo ao local de trabalho dos cortadores de cana, onde a atividade de corte manual da cana foi realizada. Os dados adquiridos foram transferidos através de um programa próprio do fabricante e exportados para uma planilha de dados.

Análise Estatística

As variáveis foram apresentadas em média \pm desvio padrão (DP) ou mediana e intervalo interquartil exceto para os dados de temperatura e umidade relativa do ar que foram apresentados em mediana, mínimo e máximo. Para comparação dos dados basais entre os grupos foi utilizado teste t de Student para amostras independentes. Na comparação dentro de cada grupo em pré-safra, meio e final da safra foi utilizado o teste de medidas repetidas com pós-teste de bonferroni. Na comparação entre os grupos em todos os períodos avaliados foi utilizado o teste de ANOVA bifatorial com o pós teste de bonferroni. A análise estatística foi realizada por meio do software SPSS 22.0 e para montagem dos gráficos foi utilizado o programa OriginPro 8. O nível de significância adotado para todos os testes foi de 5% ($p < 0.05$).

Resultados

Quarenta e cinco cortadores de cana-de-açúcar do gênero masculino foram divididos em dois grupos: não tabagista (n=24, 38.8±10.8 anos) e tabagista (n=21, 43.0±10.7 anos). Na comparação dos dados basais dos indivíduos não tabagistas e tabagistas não houve diferença significativa para idade, IMC, anos trabalhados na função de corte de cana-de-açúcar, citocinas inflamatórias no lavado nasal e sangue venoso e contagem de monócitos e neutrófilos a nível sistêmico. O grupo de indivíduos tabagistas apresentaram uma média de 13.2±14.2 anos maço, fumando em média 13.8±10.6 cigarros/dia (leve a moderado), durante cerca de 17.8±12.6 anos (Tabela 1).

INSERIR TABELA 1

A Tabela 2 apresenta as medidas registradas da concentração atmosférica de MP_{2.5}, que durante o meio e final da safra apresentaram concentrações significativamente maiores que na pré-safra (p<0.0001).

INSERIR TABELA 2

Na análise intergrupos e intragrupos as concentrações de citocinas no lavado nasal não apresentaram diferenças significativas (Figura 2).

INSERIR FIGURA 2

No soro sanguíneo as concentrações de citocinas apresentaram comportamentos diferentes na análise intergrupos, onde as concentrações de IL-10 no meio da safra foram maiores para o grupo tabagista comparado com o não tabagista (Figura 3; $p=0.041$).

INSERIR FIGURA 3

Em relação as análises intragrupos o grupo não tabagista e tabagista apresentaram diferenças significativas para concentrações de IL-8, apresentando decréscimo ao final da safra (pré-safra= 20.6 ± 12.7 e 16.9 ± 8.7 ; meio da safra= 25.3 ± 15.5 e 17.2 ± 8.9 ; final da safra= 19.1 ± 10.6 e 10.7 ± 7.2 , respectivamente; Figura 4A/B). Já com relação as demais citocinas como TNF- α , IL-6 e IL-10, ambos os grupos não apresentaram alterações significativas durante os períodos avaliados.

INSERIR FIGURA 4

Contagem de monócitos e neutrófilos a nível circulante de ambos os grupos apresentaram diferença significativa apenas para neutrófilos durante os períodos avaliados. Desta forma foi possível observar que a contagem de neutrófilos no sangue venoso periférico aumentou no meio da safra porém diminuiu ao final da safra para não tabagistas e tabagistas (pré-safra= 52.9 ± 13.3 e 54.6 ± 9.3 ; meio da safra= 62.6 ± 8.1 e 63.0 ± 8.3 ; final da safra= 57.4 ± 9.8 e 56.1 ± 9.1 , respectivamente) (Figura 5A). Já a contagem de monócitos não apresentou diferença significativa durante os períodos avaliados para não tabagistas e tabagistas (pré-safra= 7.6 ± 2.5 e 7.4 ± 1.6 ; meio da safra= 7.3 ± 1.4 e 7.7 ± 1.3 ; final da safra= 8.2 ± 2.2 e 8.3 ± 2.0 , respectivamente) (Figura 5B). Não houve diferenças significativas entre os grupos em relação a contagem de monócitos e neutrófilos.

INSERIR FIGURA 5

Discussão

Este estudo mostrou que trabalhadores envolvidos no corte manual de cana-de-açúcar apesar de não apresentarem mudanças significativas em concentrações de IL-6, IL-10 e IL-4 no lavado nasal, demonstraram alterações no perfil inflamatório sistêmico de caráter pró-inflamatório para IL-8 tanto em não tabagistas como em tabagistas. Tais alterações se caracterizaram com o declínio das concentrações de IL-8 ao final da safra em ambos os grupos avaliados.

A queima de biomassa é um importante emissor de diversos poluentes, entre eles o MP apresenta a maior toxicidade, pois de acordo com o seu diâmetro aerodinâmico e composição química pode atingir vias aéreas mais inferiores com danos a função pulmonar principalmente de indivíduos com doenças crônicas pré-existentes como asma e DPOC^{27,28}, podendo extravasar para a circulação sistêmica provocando prejuízos ao sistema cardiovascular^{12,14,15}. Porém até atingir a circulação sistêmica o MP derivado da queima de biomassa que também está presente na fumaça do cigarro passa primeiramente pela interação com os macrófagos alveolares e células epiteliais das vias respiratórias²⁹.

Esta interação acontece pela afinidade de endotoxinas denominada de lipopolissacarídeos (LPS) presentes no MP^{30,30} com os receptores Toll-like (TLRs), principalmente o TLR2 envolvendo células epiteliais³² e TLR4 em macrófagos alveolares. Após a ligação do LPS ao TLR4 ocorre a ativação de vias de sinalização intracelular resultando na ativação de fator nuclear Kappa B (NF- κ B) para posterior transcrição de citocinas como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8³³.

Para induzir a uma inflamação sistêmica ocorre o extravasamento destes mediadores inflamatórios pulmonares para o sangue estimulando a medula óssea para aumentar a liberação de leucócitos e plaquetas. No entanto a estimulação da medula óssea se dá

principalmente por estimulação de IL-1 β e IL-6 que apresentam principalmente características de fase aguda como proteína C reativa e fibrinogênio³⁴⁻³⁷. É elucidado pela literatura que o aumento de citocinas circulantes em geral são evidenciados pela exposição a curto prazo ao MP^{38,39}.

No entanto, a exposição crônica ao LPS pode induzir a um estado estacionário do número de macrófagos, fenômeno chamado de “tolerância a endotoxina”. Quando o organismo passa por repetidas exposições a endotoxinas, as células imunitárias principalmente os monócitos/macrófagos se adapta na fase tardia da inflamação na tentativa de resolução da inflamação. Essa adaptação se dá pela redução da produção de citocinas pró-inflamatórias com o aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias, que é ocasionado por defeitos em vários níveis nas vias de sinalização a partir do receptor TLR4^{18,40}. Informações essas que podem explicar o fato da diminuição nas concentrações de IL-8 a nível sanguíneo ao final da safra, uma vez que todos os indivíduos relataram já ter participado de safras anteriores apresentando um elevado tempo de serviço neste âmbito trabalhista.

Além da diminuição nas concentrações de IL-8 ao final da safra também houve diminuição do número de neutrófilos quando comparado com o meio da safra. Sabe-se que IL-8 é uma das principais quimiocinas responsável pelo recrutamento de neutrófilos a partir da estimulação da medula óssea, tornando-se essencial para a proteção contra os agentes patogênicos^{41,42}. Deste modo, possivelmente a diminuição na concentração de IL-8 possa ter influenciado a comportamento de neutrófilos ao longo da safra em ambos os grupos.

Outro achado foi a diferença nas concentrações de IL-10 em soro sanguíneo, onde o grupo tabagista apresentou níveis mais elevados do que não tabagistas. Estudo realizado por Shaykhiev et al⁴³, relataram que fumantes mesmo sem apresentar indícios de doenças pulmonares já apresentam indicativos de tolerância a endotoxina pela desativação de macrófagos indutores de inflamação e ativação incomum de macrófagos responsáveis pela

remodelação tecidual, deixando o organismo mais susceptível a infecções bacterianas devido a supressão de genes inflamatórios quando comparado com não fumantes. Achados esses que corroboram com o presente estudo.

Já com relação as citocinas em lavado nasal e as demais citocinas em soro sanguíneo não apresentarem alterações significativas, além do fato da tolerância a endotoxina o período de pré-safra mesmo com níveis de poluição menores do que o meio e final da safra, o processo de plantação neste período ocasiona a erudição de poeira advindo do solo pela necessidade do processo de preparação para o plantio, que por muitas vezes apresenta resíduos de fuligens e poluentes de safras anteriores, fazendo com que esses trabalhadores já partam de uma inflamação a partir deste período. No entanto, outros estudos devem ser realizados para tentar esclarecer tal questão com avaliações em períodos em que não estejam exercendo tal função.

Deste modo, conclui-se que trabalhadores tabagistas apresentam aumento da produção de IL-10 no meio da safra e que independente do hábito tabagístico trabalhadores expostos à queima de biomassa a longo prazo apresentam diminuição nas concentrações de IL-8 e número de neutrófilos a nível sistêmico . Tais achados podem estar associados ao tempo de exposição à queima de biomassa com possível desenvolvimento de tolerância a endotoxina.

Referências

1. FAO Food and Agriculture Organization of the United Nations. Available: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>. Accessed on 2015 Nov 17.
2. UNICA União da Indústria de Cana-de-açúcar. Setor sucroenergético: mapa de produção. Available: <http://www.unica.com.br/mapa-da-producao/>. Accessed on 2015 Nov 17.
3. UNICA Relatório final da safra 2013/2014 Região Centro-Sul. Available: <http://www.unicadata.com.br/listagem.php?idMn=88>. Accessed on 2015 Nov 17.
4. Ribeiro H, Ficarelli TRA. Sugarcane burning and perspectives for harvesters in Macatuba, São Paulo. *Saúde Soc.* 2010;19(1):48-63.
5. Rocha FLR, Marziale MHP, Hong OS. Work and health conditions of sugar cane workers in Brazil. *Rev Esc Enferm USP.* 2010;44(4):974-9.
6. Luz VG, Zangirolani LTO, Vilela RAG, Correa-Filho HR. Food consumption and working conditions in manual sugarcane harvesting in Sao Paulo state. *Saúde Soc.* 2014;23(4):1316-1328.
7. Ribeiro H. Sugar cane burning in Brazil: respiratory health effects. 2008;42(2):370-6.
8. Arbex MA, Cançado JED, Pereira LAA, Braga ALF, Saldiva PHN. Biomass burning and its effects on health. *J Bras Pneumol.* 2004;30:158-75.
9. França DA, Longo KM, Soares Neto TG, Santos JC, Freitas SR, Rudorff BFT, et al. Pre-harvest sugarcane burning: determination of emission factors through laboratory measurements. *Atmosphere.* 2012;3:164–80.
10. Salvi S, Holgate ST. Mechanisms of particulate matter toxicity. *Clin Exp Allergy.* 1999;29:1187-94.
11. Arbex MA, Santos UP, Martins LC, Saldiva PH, Pereira LA, Braga AL. Air pollution and the respiratory system. *J Bras Pneumol.* 2012;38:643-55.
12. Barbosa CMG, Terra-Filho M, de Albuquerque AL, Di Giorgi D, Grupi C, Negrão CE, et al. Burnt Sugarcane Harvesting – Cardiovascular Effects on a Group of Healthy Workers, Brazil. *PLoS One.* 2012;7(9):e46142.
13. Hiraiwa K, van Eeden SF. Contribution of Lung Macrophages to the Inflammatory Responses Induced by Exposure to Air Pollutants. *Mediators Inflamm.* 2013;2013:619523.
14. Hogg JC, van Eeden S. Pulmonary and systemic response to atmospheric pollution. *Respirology.* 2009;14:336–346.
15. Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, et al. Passage of Inhaled Particles Into the Blood Circulation in Humans. *Circulation.* 2002;105(4):411-4.

16. Fang SC, Cassidy A, Christiani DC. A Systematic Review of Occupational Exposure to Particulate Matter and Cardiovascular Disease. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2010;7: 1773-1806.
17. Brook RD, Rajagopalan S, Pope CA, Brook JR, Bhatnagar A, Diez-Roux AV, et al. Particulate matter and air pollution and cardiovascular disease: An update to the scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2010;121: 2331–2378.
18. Biswas, S.K. & Lopez-Collazo, E. (2009) Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol*. 2009;30(10):475-487.
19. Jarvis MJ, Belcher M, Vessey C, et al. Low cost carbon monoxide monitors in smoking assessment. *Thorax* 1986;41(11):886e7.
20. Javors MA, Hatch JP, Lamb RJ. Cut-off levels for breath carbon monoxide as a marker for cigarette smoking. *Addiction* 2005;100(2):159e67.
21. Santos UP, Gannam S, Abe JM, Esteves PB, Freitas Filho M, Wakassa TB, et al. Emprego da determinação de monóxido de carbono no ar exalado para a detecção do consumo de tabaco. *J Pneumol*. 2001;27(5):231-6.
22. Naclerio RM, Meier HL, Kagey-Sobotka A, Adkinson NF Jr, Meyer DA, Norman OS, et al. Mediator release after nasal airway challenge with allergen. *Am Ver Respir Dis*. 1983;128(4):597-602.
23. Belda J, Parameswaran K, Keith PK, Hargreave FE. Repeatability and validity of cell and fluid-phase measurements in nasal fluid: a comparison of two methods of nasal lavage. *Clin Exp Allerg*. 2001;31(7):1111-5.
24. Fernández de Castro M, Vilorio A, Ezquieta B, García San Andrés A, Larrocha C, Jiménez C .Evaluation of the Coulter STKS hematologic autoanalyzer. *Sangre (Barc)*. 1992;37(2):93-100.
25. Robertson EP, Lai HW, Wei DC. An evaluation of leucocyte analysis on the Coulter STKS. *Clin Lab Haematol*. 1992;14(1):53-68.
26. Goto DM, Obuti CA, Barbosa CMG, Saldiva PHN, Zanetta DMT, Lorenzi-Filho G, et al. Effects of biomass burning on nasal mucociliary clearance and mucus properties after sugarcane harvesting. *Environmental Research*. 2011;111:664–669.
27. Ling SH, McDonough JE, Gosselink JV, et al. Patterns of retention of particulate matter in lung tissues of patients with COPD: potential role in disease progression. *Chest*. 2011;140(6):1540–1549.
28. César AC, Nascimento LF, Mantovani KC, Pompeo Vieira LC. Fine particulate matter estimated by mathematical model and hospitalizations for pneumonia and asthma in children. *Rev Paul Pediatr*. 2015;S0103-0582(15):00113-6

29. Hiraiwa K and van Eeden SF. Contribution of Lung Macrophages to the Inflammatory Responses Induced by Exposure to Air Pollutants. *Mediators of Inflammation*. 2013;619523:10.
30. Becker S, Fenton MJ, Soukup JM. Involvement of Microbial Components and Toll-like Receptors 2 And 4 in Cytokine Responses to Air Pollution Particles. *Am . Respir Cell Mol Biol*. 2002;27:611–618.
31. Shoenfelt J, Mitkus RJ, Zeisler R, Spatz RO, Powell J, Fenton MJ, Squibb KA, Medvedev AE. Involvement of TLR2 and TLR4 in inflammatory immune responses induced by fine and coarse ambient air particulate matter. *J Leukoc Biol*. 2009;86(2):303-12.
32. Becker S, Dailey L, Soukup JM, Silbajoris R, Devlin RB. TLR-2 is involved in airway epithelial cell response to air pollution particles. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 2005;203:45–52.
33. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008;42:145–151.
34. Fujii T, Hayashi S, Hogg JC, Mukae H, Suwa T, Goto Y, et al. Interaction of Alveolar Macrophages and Airway Epithelial Cells Following Exposure to Particulate Matter Produces Mediators that Stimulate the Bone Marrow. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 2002;27:34–41.
35. Mukae H, Hogg JC, English D, Vincent R, Van Eeden SF. Phagocytosis of particulate air pollutants by human alveolar macrophages stimulates the bone marrow. *American Journal of Physiology*. 2000;279(5):L924–L931.
36. Van Eeden SF, Tan WC, Suwa T, et al. Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM10). *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 2001;164(5):826–830.
37. Kido T, Tamagawa E, Bai N, et al. Particulate matter induces translocation of IL-6 from the lung to the systemic circulation. *American Journal of Respiratory Cell andMolecular Biology*. 2011;44(2):197–204.
38. Tsai DH, Amyai N, Marques-Vidal P, Wang JL, Riediker M, Mooser V, et al. Effects of particulate matter on inflammatory markers in the general adult population. *Particle and Fibre Toxicology*. 2012;9:24.
39. Hertel S, Viehmann A, Moebus S, Mann K, Bröcker-Preuss M, Möhlenkamp S, et al. Influence of short-term exposure to ultrafine and fine particles on systemic inflammation. *Eur J Epidemiol*. 2010;25(8):581-92.
40. Pena OM, Pistolic J, Raj D, Fjell CD, Hancock RE. Endotoxin tolerance represents a distinctive state of alternative polarization (M2) in human mononuclear cells. *J Immunol*. 2011;186(12):7243-7254.
41. Seagrave J. Mechanisms and implications of air pollution particle associations with chemokines. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008;232(3):469-77.

42. Ohta T, Yamashita N, Maruyama M, Sugiyama E, Kobayashi M. Cigarette smoking decreases interleukin-8 secretion by human alveolar macrophages. *Respiratory Medicine*. 1998;92:922-927.
43. Shaykhiev R, Krause A, Salit J, Strulovici-Barel Y, Harvey BG, O'Connor TP, et al. Smoking-Dependent Reprogramming of Alveolar Macrophage Polarization: Implication for Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *The Journal of Immunology*. 2009;183: 2867–2883.

TABELAS E FIGURAS

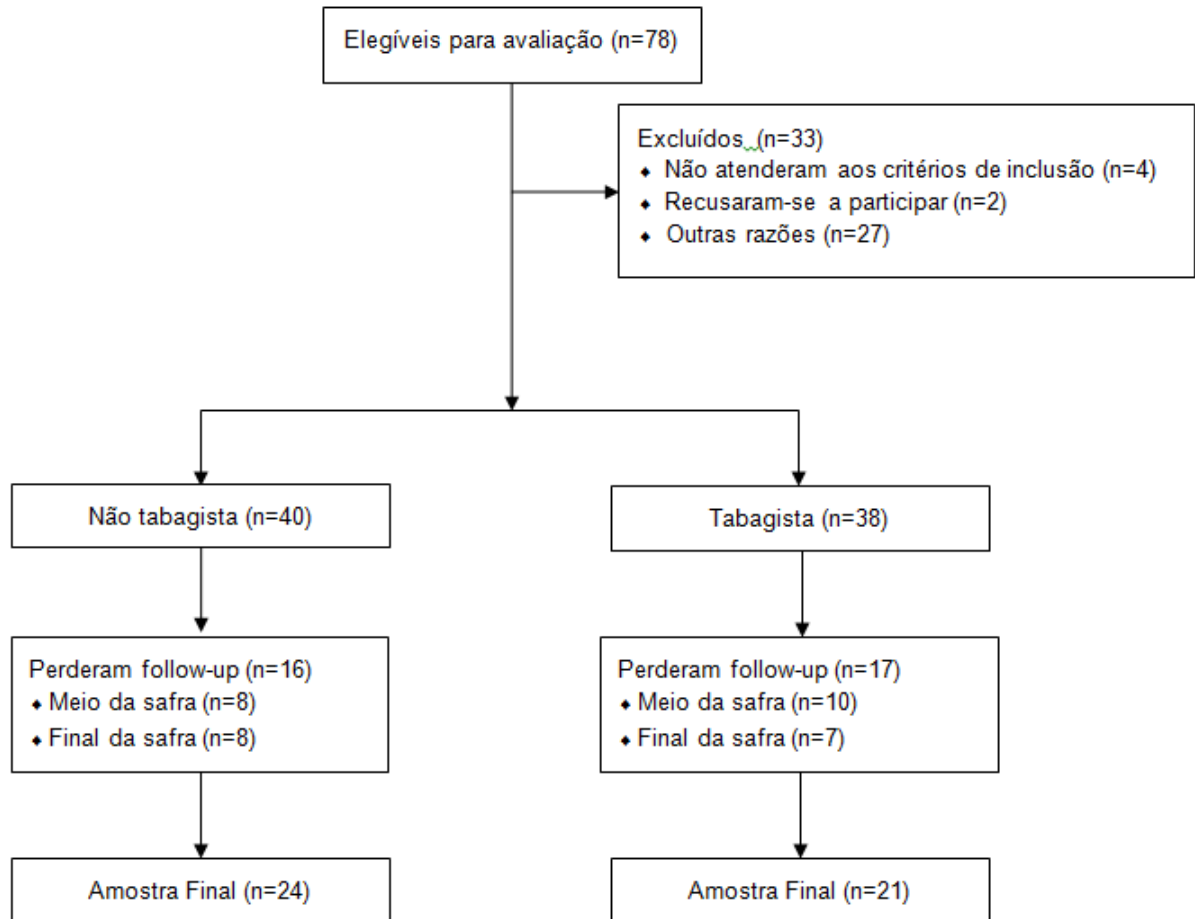


Figura 1. Fluxograma da amostra do estudo

Tabela 1. Características antropométricas, atividade ocupacional, histórico tabagístico, perfil inflamatório nasal e sistêmico, células inflamatórias e concentrações de Coex, HbCO em não tabagistas e tabagistas. Dados apresentados em média±DP.

	Não Tabagistas (n=24)	Tabagistas (n=21)	<i>p-valor</i>
Características antropométricas			
Idade (anos)	38.8±10.8	43.0±10.7	0.177
IMC (Kg/m ²)	24.5±3.9	25.7±4.4	0.651
Atividade ocupacional			
Anos Trabalhados	11.6±7.4	12.9±9.1	0.606
Cana cortada/dia (toneladas)	8.4±3.0	8.5±1.8	0.976
Histórico tabagístico			
Tempo de tabagismo	-	17.8±12.6	-
Cigarros/dia	-	13.8±10.6	-
Anos maço	-	13.2±14.2	-
Coex (ppm)	2.8±3.1	6.8±5.3	0.005*
HbCO (%)	0.4±0.5	1.1±0.8	0.005*
Perfil inflamatório			
Lavado Nasal			
IL-6 (pg/ml)	3.6±2.5	3.1±2.0	0.509
IL-10 (pg/ml)	0.8±1.0	0.7±0.9	0.929
IL-4 (pg/ml)	5.7±8.1	5.7±8.3	0.995
Soro sanguíneo			
TNF- α (pg/ml)	30.2±5.2	31.0±5.0	0.896
IL-6 (pg/ml)	6.0±5.2	2.8±5.3	0.100
IL-8 (pg/ml)	20.6±12.7	16.9±8.7	0.351
IL-10 (pg/ml)	1.6±0.3	1.9±0.6	0.069
Células inflamatórias			
Monócitos (%)	7.6±2.5	7.4±1.6	0.796
Neutrófilos (%)	52.9±13.3	54.6±9.3	0.734

DP: desvio padrão; IMC: índice de massa corporal; TNF- α : fator de necrose tumoral; IL-6: interleucina 6; IL-8: intrleucina 8; IL-10: interleucina 10; COex: monóxido de carbono no ar exalado; HbCO: carboxihemoglobina.

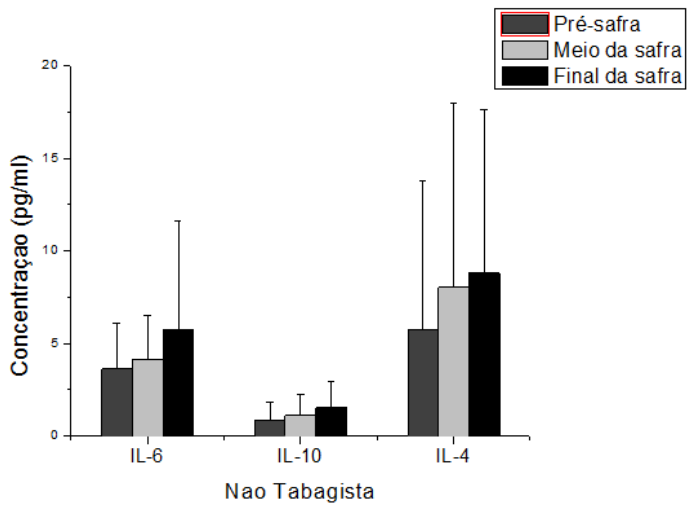
*: p<0.05 - Teste t de Student para amostras independentes

Tabela 2. Medidas atmosféricas de MP_{2.5} no canalial durante os períodos do estudo. Dados expressos em mediana e intervalo 25-75%.

	Safra			<i>p</i> -valor [†]
	Pré-safra	Meio	Final	
MP _{2.5} (µg/m ³)	28.00 ^{bc} (24.00-37.38)	111.50 ^{ac} (96.42-122.50)	90.63 ^{ab} (36.39-131.90)	<0,0001**

*(*p*<0,05); **(*p*<0,0001); ^a: diferente de pré-safra; ^b: diferente de meio da safra; ^c: diferente de final da safra; [†]: ANOVA para medidas repetidas com pós teste de Bonferroni.

A



B

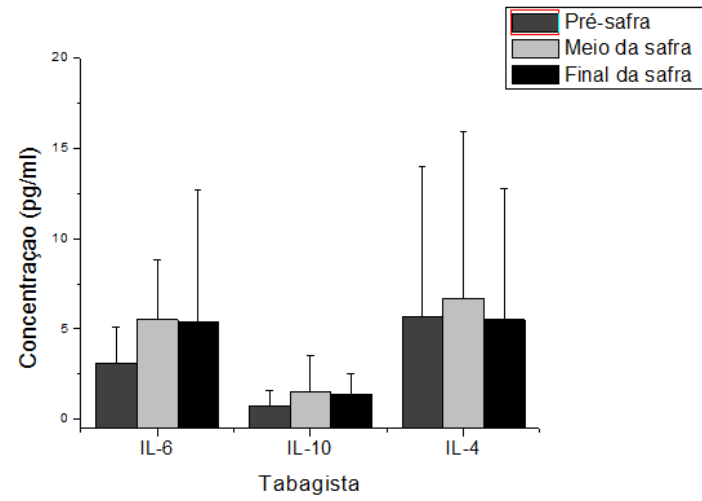


Figura 2. Comportamento da concentração de citocinas no lavado nasal de cortadores de cana-de-açúcar não tabagistas (A) e tabagistas (B) durante os períodos de pré-safra, meio e final da safra

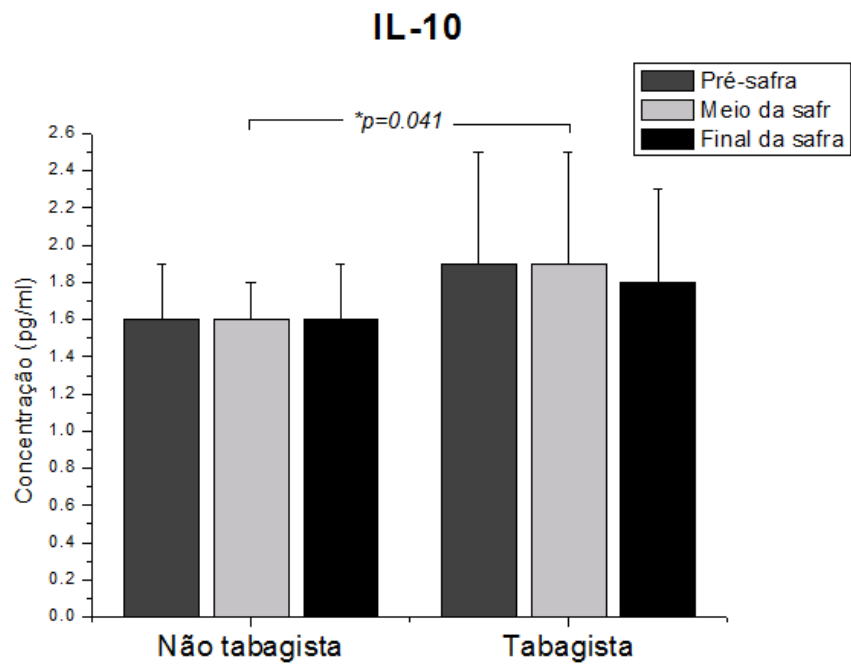


Figura 3. Comportamento da concentração de IL-10 no soro sanguíneo de cortadores de cana-de-açúcar não tabagistas e tabagistas (* $p < 0.05$).

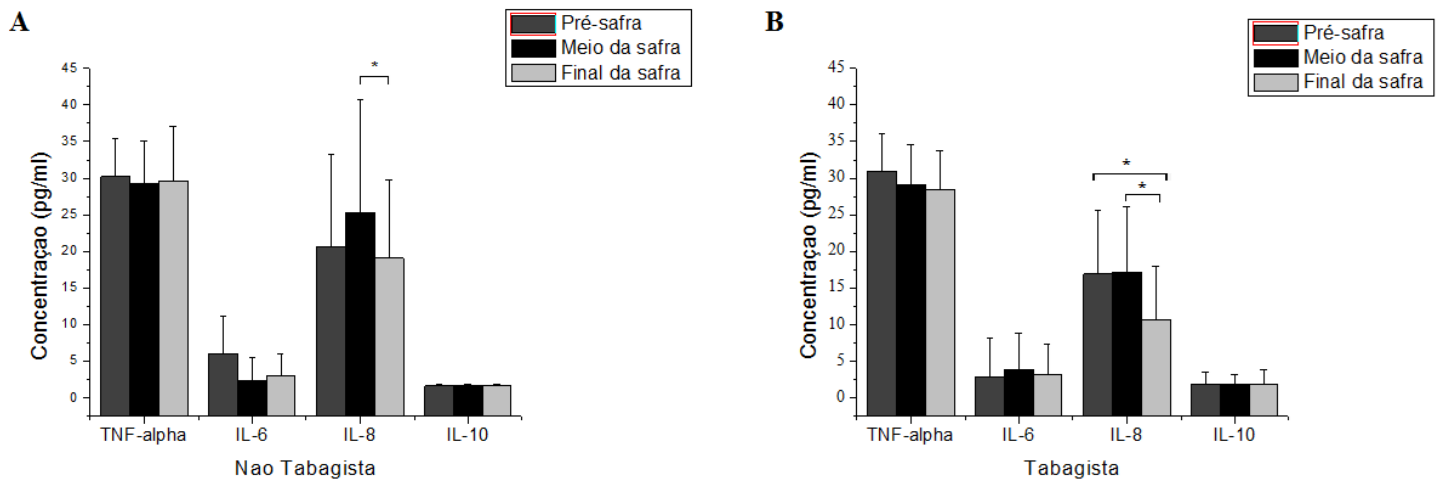


Figura 4. Comportamento da concentração de citocinas no soro sanguíneo de cortadores de cana-de-açúcar não tabagistas (A) e tabagistas (B) durante os períodos de pré-safra, meio e final da safra (*Diferença com final da safra).

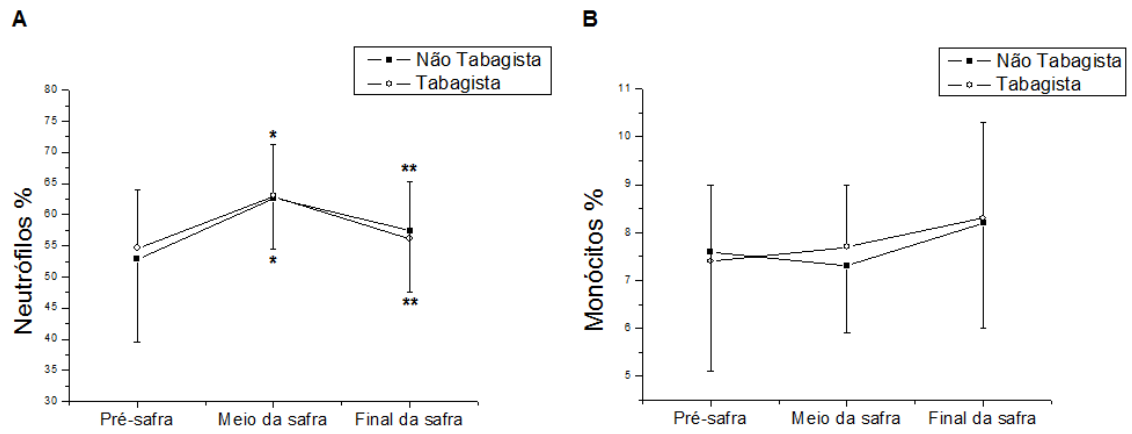


Figura 5. Contagem de neutrófilos (A) e monócitos (B) de cortadores de cana-de-açúcar não tabagistas e tabagistas (*Diferença de pré-safra com meio da safra; **Diferença de pré-safra com final da safra).

Conclusões

Os artigos compilados nessa dissertação demonstraram o efeito da exposição à poluição atmosférica advinda da queima noturna da cana-de-açúcar sobre os sintomas nasais, parâmetros hemodinâmicos e perfil inflamatório nasal e sistêmico de cortadores de cana-de-açúcar.

No primeiro estudo, os indivíduos demonstraram que principalmente no meio da safra houve aumento da frequência e intensidade dos sintomas espirros e congestão nasal, e da intensidade em dificuldade para respirar, além de aumento na pressão arterial sistólica e diastólica, frequência cardíaca e respiratória, independente do hábito tabagístico. Tais achados se correlacionaram com as alterações ambientais de material particulado fino que se apresentaram mais elevadas neste período.

Em relação ao segundo estudo, a longo prazo os trabalhadores envolvidos no corte manual apesar de não apresentaram mudanças significativas no perfil inflamatório nasal, demonstraram alterações no perfil inflamatório sistêmico de caráter pró-inflamatório. Tais achados podem estar associados a tolerância a endotoxina devido ao tempo de exposição à queima de biomassa.

Diante dos resultados apresentados, o estudo procura contribuir e orientar políticas preventivas e intervencionistas de saúde desta população, incentivando em novas investigações para maiores esclarecimentos no quadro inflamatório destes indivíduos e sua relação com o período de exposição e não exposição neste âmbito trabalhista.

Referências

1. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Anuário Estatístico da Agroenergia 2012. Brasília; 2013.
2. UNICA. Sustentabilidade. São Paulo; 2014 [acessado em 2015 set 15]. Disponível em: <http://www.unica.com.br/noticia/6551584920310621254/sao-paulo-fecha-safra-2013-por-cento2F2014-com-colheita-mecanizada-em-83-por-cento-dos-canaviais/>.
3. Ripoli TCC, Ripoli MLC. Biomassa de cana-de-açúcar: colheita, energia e ambiente. Piracicaba: Barros & Marques Editoração Eletrônica; 2004.
4. Ribeiro H. Sugar cane burning in Brazil: respiratory health effects. *Rev Saude Publica*. 2008;42(2):370-6
5. França DA, Longo KM, Soares Neto TG, Santos JC, Freitas SR, Rudorff BFT, et al. Pre-harvest sugarcane burning: determination of emission factors through laboratory measurements. *Atmosphere*. 2012;3:164–80.
6. Torres-Duque C, Maldonado D, Pérez-Padilla R, Ezzati M, Vieg G. Forum of internacional respiratory studies (FIRS) Task force on Health effects of biomass exposure. *Proc Am Thorac Soc*. 2008;15(5):577-90.
7. Arbex MA, Cançado JED, Pereira LAA, Braga ALF, Saldiva PHN. Queima de biomassa e efeitos sobre a saúde. *J. bras. Pneumol*. 2004;30(2):158-175.
8. Oliveira RC. Efeito da composição do material partilado fino, PM_{2,5} e “residual oil fly ash” (ROFA), como determinante do potencial mutagênico e tóxico celular: um estudo em bioensaios vegetais e animais [tese de doutorado]. São Paulo: Faculdade de Medicina da USP; 2006.
9. Salvi S, Holgate ST. Mechanisms of particulate matter toxicity. *Clin Exp Allergy*. 1999;29:1187-94.
10. Huang YC, Karoly ED, Dailey LA, Schmitt MT, Silbajoris R, Graff DW, et al. Comparison of gene expression profiles induced by coarse, fine, and ultrafine particulate matter. *J Toxicol Environ Health*. 2011;74(Part A):296-312.
11. Arbex MA, Santos UP, Martins LC, Saldiva PH, Pereira LA, Braga AL. A poluição do ar e o sistema respiratório. *J Bras Pneumol*. 2012;38:643-55.
12. Anderson JO, Thundiyil JG, Stolbach A. Clearing the Air: A Review of the Effects of Particulate Matter Air Pollution on Human Health. *J. Med. Toxicol*. 2012;8:166–175.
13. Rocha FLR, Marziale MHP, Hong OS. Work and health conditions of sugar cane workers in Brazil. *Rev Esc Enferm USP*. 2010;44(4):974-9.
14. Alves F. Por que morrem os cortadores de cana? *Saude e soc*. 2006;15:90-8.
15. Carvalho Junior LCS, Ramos EM, Toledo AC, Ceccato ADF, Macchione M, Braga ALF, et al. Avaliação da qualidade de vida relacionada à saúde de cortadores de cana-de-açúcar nos períodos de entressafra e safra. *Rev Saude Publica*. 2012;46:1058-65.

16. Alessi NP, Navarro VL. Saúde e trabalho rural: o caso dos trabalhadores da cultura canavieira na região de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil. *Cad Saude Publica*. 1997;13:111-121.
17. Plataforma BNDS. Impacto sobre as condições de trabalho: poluição atmosférica, ameaça a recursos hídricos, riscos para a produção de alimentos, relações de trabalho atrasadas e proteção insuficiente à saúde de trabalhadores. Brasil; 2008.
18. Hogg JC, van Eeden S. Pulmonary and systemic response to atmospheric pollution. *Respirology*. 2009;14:336–346.
19. Sawyer K, Mundandhara S, Ghio AJ, Madden MC. The effects of ambient particulate matter on human alveolar macrophage oxidative and inflammatory responses. *Journal of Toxicology and Environmental Health A*. 2010;73(1):41–57.
20. Tsai DH, Amyai N, Marques-Vidal P, Wang JL, Riediker M, Mooser V, Paccaud F, Waeber G, Vollenweider P, Bochud M. Effects of particulate matter on inflammatory markers in the general adult population. *Particle and Fibre Toxicology*. 2012;9:24.
21. Prado GF, Zanetta DM, Arbex MA, Braga AL, Pereira LA, de Marchi MR, et al. Burnt sugarcane harvesting: Particulate matter exposure and the effects on lung function, oxidative stress, and urinary 1-hydroxypyrene. *Sci Total Environ*. 2012;437:200–8.
22. Ferreira-Ceccato AD, Ramos EM, de Carvalho LC Jr, Xavier RF, Teixeira MF, Raymundo-Pereira PA, et al. Short-term effects of air pollution from biomass burning in mucociliary clearance of Brazilian sugarcane cutters. *Respir Med*. 2011;105(11):1766-8.
23. Becker S, Fenton MJ, Soukup JM. Involvement of Microbial Components and Toll-like Receptors 2 And 4 in Cytokine Responses to Air Pollution Particles. *Am . Respir Cell Mol Biol*. 2002;27:611–618.
24. Shoenfelt J, Mitkus RJ, Zeisler R, Spatz RO, Powell J, Fenton MJ, Squibb KA, Medvedev AE. Involvement of TLR2 and TLR4 in inflammatory immune responses induced by fine and coarse ambient air particulate matter. *J Leukoc Biol*. 2009;86(2):303-12.
25. Cruz-Machado SS. Lipopolissacarídeo (LPS): ativador e regulador da transcrição gênica via fator de transcrição NFκB. *Revista da biologia*. 2010;4:40-43.
26. Kido T, Tamagawa E, Bai N, Suda K, Yang HH, Li Y, Chiang G, Yatera K, Mukae H, Sin DD, Van Eeden SF. Particulate Matter Induces Translocation of IL-6 from the Lung to the Systemic Circulation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44(2):197-204.
27. Hiraiwa K, van Eeden SF. Contribution of Lung Macrophages to the Inflammatory Responses Induced by Exposure to Air Pollutants. *Mediators Inflamm*. 2013;2013:619523.
28. Fujii T, Hayashi S, Hogg JC, Mukae H, Suwa T, Goto Y, Vincent R, van Eeden SF. Interaction of Alveolar Macrophages and Airway Epithelial Cells Following Exposure to Particulate Matter Produces Mediators that Stimulate the Bone Marrow. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol*. 2002;27:34–41.

29. Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Nemery B. Passage of Inhaled Particles Into the Blood Circulation in Humans. *Circulation*. 2002;105(4):411-4.
30. Nemmar A, Vanbilloen H, Hoylaerts MF, Hoet PHM, Verbruggen A, Nemery B. Passage of Intratracheally Instilled Ultrafine Particles from the Lung into the Systemic Circulation in Hamster. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:1665–1668.
31. van Eeden SF, Tan WC, Suwa T, Mukae H, Terashima T, Fujii T, Qui D, Vincent R, Hogg JC. Cytokines involved in the systemic inflammatory response induced by exposure to particulate matter air pollutants (PM(10)). *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164(5):826-30.
32. Fang SC, Cassidy A, Christiani DC. A Systematic Review of Occupational Exposure to Particulate Matter and Cardiovascular Disease. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2010;7: 1773-1806.
33. Barbosa CMG, Terra-Filho M, de Albuquerque AL, Di Giorgi D, Grupi C, Negrão CE, et al. Burnt Sugarcane Harvesting – Cardiovascular Effects on a Group of Healthy Workers, Brazil. *PLoS One*. 2012;7(9):e46142.
34. Biswas SK and Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol*. 2009;30(10):475-487.
35. Pena OM, Pistolic J, Raj D, Fjell CD, Hancock RE. Endotoxin tolerance represents a distinctive state of alternative polarization (M2) in human mononuclear cells. *J Immunol*. 2011;186(12):7243-7254.
36. Shaykhiev R, Krause A, Salit J, Strulovici-Barel Y, Harvey BG, O'Connor TP, et al. Smoking-Dependent Reprogramming of Alveolar Macrophage Polarization: Implication for Pathogenesis of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *The Journal of Immunology*. 2009;183: 2867–2883.
37. Assembléia legislativa do Estado de São Paulo. Lei n. 11.241, de 19 de setembro de 2002. Dispõe sobre a eliminação gradativa da queima da palha da cana-de-açúcar e dá providências correlatas. [Acessado em 20 de agosto 2015]. Disponível em: <http://www.al.sp.gov.br/repositorio/legislacao/lei/2002/lei-11241-19.09.2002.html>.

Anexo 1

Normas do Periódico International Journal of Environmental Research and Public Health (ISSN: 1660-4601)

Aims and Scope

International Journal of Environmental Research and Public Health (IJERPH) (ISSN 1660-4601) is a peer-reviewed scientific journal that publishes original articles, critical reviews, research notes, and short communications in the interdisciplinary area of environmental health sciences and public health. It links several scientific disciplines including biology, biochemistry, biotechnology, cellular and molecular biology, chemistry, computer science, ecology, engineering, epidemiology, genetics, immunology, microbiology, oncology, pathology, pharmacology, and toxicology, in an integrated fashion, to address critical issues related to environmental quality and public health. Therefore, *IJERPH* focuses on the publication of scientific and technical information on the impacts of natural phenomena and anthropogenic factors on the quality of our environment, the interrelationships between environmental health and the quality of life, as well as the socio-cultural, political, economic, and legal considerations related to environmental stewardship and public health. The primary areas of research interests to the *IJERPH* include:

- Gene-environment interactions
- Environmental genomics and proteomics
- Environmental toxicology, mutagenesis and carcinogenesis
- Environmental epidemiology and disease control
- Health risk assessment and management
- Ecotoxicology, and ecological risk assessment and management
- Natural resources damage assessment
- Environmental chemistry and computational modeling
- Environmental policy and management
- Environmental engineering and biotechnology
- Emerging issues in environmental health and diseases
- Environmental education and public health

Submission Checklist

Please

1. read the [Aims & Scope](#) to gain an overview and assess if your manuscript is suitable for this journal;
2. use the [Microsoft Word template](#) or [LaTeX template](#) to prepare your manuscript;
3. make sure that issues about [publication ethics](#), [research ethics](#), [copyright](#), [authorship](#), [figure formats](#), and [references format](#) have been appropriately considered; and
4. ensure that all authors have approved the content of the submitted manuscript.

Manuscript Submission Overview

Types of Publications

IJERPH has no restrictions on the length of manuscripts, provided that the text is concise and comprehensive. Full experimental details must be provided so that the results can be reproduced by other groups. *IJERPH* encourages authors to publish all experimental controls and full datasets as supplementary files (please read the [guidelines about Supplementary Materials](#) carefully and [references to unpublished data](#)). The different types of articles published in *IJERPH* are indicated in the first section of the [Aims & Scope](#). The main types are:

- *Articles*: research manuscripts report new evidence or new conclusions which have neither been published before nor are under consideration for publication in another journal. MDPI considers all original research manuscripts provided that the work reports scientifically sound experiments and provides a substantial amount of new information. We strongly recommend authors not to unnecessarily divide their work into several related manuscripts.
- *Short communications* of preliminary, but significant, results will also be considered.
- *Reviews*: review manuscripts provide concise and precise updates on the latest progress made in a given area of research.
- *Conference Papers*: Expanded and high quality conference papers are also considered in *IJERPH* if they fulfill the following requirements: (1) the paper should be expanded to the size of a research article; (2) the conference paper should be cited and noted on the first page of the paper; (3) if the authors do not hold the copyright to the published conference paper, authors should seek the appropriate permission from the copyright

holder; (4) authors are asked to disclose that it is conference paper in their cover letter and include a statement on what has been changed compared to the original conference paper.

Submission Process

Manuscripts for *IJERPH* should be submitted online at susy.mdpi.com. The submitting author, who is generally the corresponding author, is responsible for the manuscript during the submission and peer-review process. The submitting authors must ensure that all co-authors have been included in the author list (read the [criteria to qualify for authorship](#)) and that they all have read and approved the submitted version of the manuscript. To submit your manuscript, [register and log in](#) to this website. Once you are registered, [click here to go to the submission form for IJERPH](#). All co-authors can see the manuscript details in the submission system, if they register and log in using the e-mail address provided during manuscript submission.

Accepted File Formats

Authors must use the [Microsoft Word template](#) or [LaTeX template](#) to prepare their manuscript. Using the template file will substantially shorten the time to complete copy-editing and publication of accepted manuscripts. Accepted file formats are:

- *Microsoft Word*: Manuscripts prepared in Microsoft Word must be converted into a single file before submission. When preparing manuscripts in Microsoft Word, the *IJERPH Microsoft Word template file* must be used. Please insert your graphics (schemes, figures, *etc.*) in the main text after the paragraph of its first citation.
- *LaTeX*: Manuscripts prepared in LaTeX must be collated into one ZIP folder (include all source files and images, so that the Editorial Office can recompile the submitted PDF). When preparing manuscripts in LaTeX, please use the *IJERPH LaTeX template files*. You can now also use the online application [writeLaTeX](#) to submit articles directly to *IJERPH*. The MDPI LaTeX template file should be selected from the [writeLaTeX template gallery](#).

Cover Letter

A cover letter must be included with each manuscript submission. It should be concise and explain why the content of your paper is significant, placing your findings in the context of

existing work and why it fits the scope of the journal. Please confirm that neither the manuscript nor any parts of its content are currently under consideration or published in another journal. Any prior submissions of the manuscript to MDPI journals must be acknowledged. The names of proposed and excluded reviewers should be provided in the submission system, not in the cover letter.

Note for Authors Funded by the National Institutes of Health (NIH)

This journal automatically deposits papers to PubMed Central after publication of an issue. Authors do not need to separately submit their papers through the NIH Manuscript Submission System (NIHMS, <http://nihms.nih.gov/>).

Preparation of a Manuscript

General Considerations

- **Research manuscripts** should comprise:
 - Front matter: Title, Author list, Affiliations, Abstract, Keywords
 - Research manuscript sections: Introduction, Experimental Section, Results, Discussion, Conclusions (optional), Supplementary Materials
 - Back matter: Acknowledgments, Author Contributions, Conflicts of Interests, References.
- **Review manuscripts** should comprise the front matter, literature review sections and the back matter. The template file can also be used to prepare the front and back matter of your review manuscript. It is not necessary to follow the remaining structure.
- **Abstract Graphic**: Authors are encouraged to provide a graphical abstract to display on the website alongside the textual abstract. It should be a self-explanatory snapshot of your article giving a view on its rationale, study design, and/or conclusions. The graphic should not exceed 550 pixels. When prepared in Adobe Photoshop or Microsoft PowerPoint, the frame should be 5–15 cm in width and height. The text should be kept to a minimum and the font size comprised between 10 pt and 14 pt to ensure readability. The graphic should be provided as a JPG, PNG or GIF file.
- **"Data not shown"** should be avoided in research manuscripts. We encourage our authors to publish all observations related to the submitted manuscript as Supplementary Materials. **"Unpublished data"** intended for publication in a different

manuscript, *i.e.*, in a manuscript that is either planned, "**in preparation**" or that have been "**submitted**" but not yet accepted, should be cited in the text and a reference should be added in the References section. "**Personal Communications**" should also be cited in the text and reference added in the References section. (see also the MDPI reference list and citations style guide).

- **Abbreviations** should be defined in parentheses the first time they appear in the abstract, main text and in figure captions.
- **SI Units** (International System of Units) should be used for this journal. Imperial, US customary and other units should be converted to SI units whenever possible before submission of a manuscript to the journal.
- **Accession numbers** of RNA, DNA and protein sequences used in the manuscript should be provided in the Materials and Methods section. Please also read the Guidelines for Deposition of Sequences and of Expression Data
- **Equations:** If you are using Word, please use either the Microsoft Equation Editor or the MathType add-on in your paper. Equations should be editable by the editorial office and not appear in a picture format.
- **Supplementary Materials and Research Data:** To maintain the transparency and reproducibility of research results, authors are encouraged to make their experimental and research data openly available either by depositing into data repositories or by publishing the data and files as "Supplementary Materials". Large datasets and files should be deposited in specialized data repositories. Small datasets, spreadsheets, images, video sequences, conference slides, software source code, *etc.* can be uploaded as "Supplementary Files" during the manuscript submission process. The supplementary files will also be made available to the referees during the peer-review process and be published online alongside the manuscript. Please read the information about Supplementary Materials and Data Deposit for additional guidelines.

Front Matter

These sections should appear in all manuscript types

- **Title:** The title of your manuscript should be concise, specific and relevant. When gene or protein names are included, the abbreviated name rather than full name should be used.

- **Author List and Affiliations:** Authors' full first and last names must be provided. The initials of any middle names can be added. The PubMed/MEDLINE standard format is used for affiliations: complete address information including city, zip code, state/province, country, and all email addresses. At least one author should be designated as corresponding author, and his or her email address and other details should be included at the end of the affiliation section. Please read the [criteria to qualify for authorship](#).
- **Abstract:** The abstract should be a total of about 200 words maximum. The abstract should be a single paragraph and should follow the style of structured abstracts, but without headings: 1) Background: Place the question addressed in a broad context and highlight the purpose of the study; 2) Methods: Describe briefly the main methods or treatments applied; 3) Results: Summarize the article's main findings; and 4) Conclusion: Indicate the main conclusions or interpretations. The abstract should be an objective representation of the article: it must not contain results which are not presented and substantiated in the main text and should not exaggerate the main conclusions.
- **Keywords:** Three to ten pertinent keywords need to be added after the abstract. We recommend that the keywords are specific to the article, yet reasonably common within the subject discipline.

Research Manuscript Sections

- **Introduction:** The introduction should briefly place the study in a broad context and highlight why it is important. It should define the purpose of the work and its significance. The current state of the research field should be reviewed carefully and key publications should be cited. Please highlight controversial and diverging hypotheses when necessary. Finally, briefly mention the main aim of the work and highlight the main conclusions. As far as possible, please keep the introduction comprehensible to scientists outside your particular field of research.
- **Experimental Section:** This section should be divided by subheadings. Materials and Methods should be described with sufficient details to allow others to replicate and build on published results. Please note that publication of your manuscript implies that you must make all materials, data, and protocols associated with the publication available to readers. Please disclose at the submission stage any restrictions on the

availability of materials or information. New methods and protocols should be described in detail while well-established methods can be briefly described and appropriately cited.

- Research manuscripts reporting large datasets that are deposited in a publicly available database should specify where the data have been deposited and provide the relevant accession numbers. If the accession numbers have not yet been obtained at the time of submission, please state that they will be provided during review. They must be provided prior to publication.
- **Results:** This section may be divided by subheadings. It should provide a concise and precise description of the experimental results, their interpretation as well as the experimental conclusions that can be drawn.
- **Discussion:** This section may be divided by subheadings. Authors should discuss the results and how they can be interpreted in perspective of previous studies and of the working hypotheses. The findings and their implications should be discussed in the broadest context possible. Future research directions may also be highlighted.
- **Conclusions:** This section is not mandatory, but can be added to the manuscript if the discussion is unusually long or complex.
- **Supplementary Materials:** This section should be included when supplementary information is published online alongside the manuscript. Please indicate the name and title of each supplementary file as follows **Figure S1:** title, **Table S1:** title, *etc.*

Back Matter

- **Acknowledgments:** All sources of funding of the study should be disclosed. Please clearly indicate grants that you have received in support of your research work. Clearly state if you received funds for covering the costs to publish in open access. Note that some funders will not refund article processing charges (APC) if the funder and grant number are not clearly identified in the paper. Funding information can be entered separately into the submission system by the authors during submission of their manuscript. Such funding information, if available, will be deposited to FundRef if the manuscript is finally published. Authors must have obtained specific permission from individuals and institutions to mention their names in the Acknowledgements.

- **Author Contributions:** For research articles with several authors, a short paragraph specifying their individual contributions must be provided. The following statements should be used "X and Y conceived and designed the experiments; X performed the experiments; Y analyzed the data; W contributed reagents/materials/analysis tools; Y wrote the paper." **Authorship must be limited to those who have contributed substantially to the work reported. Please read the section concerning the criteria to qualify for authorship carefully.**
- **Conflicts of Interest:** Authors must identify and declare any personal circumstances or interest that may be perceived as inappropriately influencing the representation or interpretation of reported research results. If there is no conflict of interest, please state "The authors declare no conflict of interest." Any role of the funding sponsors in the design of the study; in the collection, analyses or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results must be declared in this section. If there is no role, please state "The founding sponsors had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, and in the decision to publish the results".
- **References:** References must be numbered in order of appearance in the text (including tables and legends) and listed individually at the end of the manuscript. We recommend preparing the references with a bibliography software package, such as EndNote, ReferenceManager or Zotero to avoid typing mistakes and duplicated references. Citations and References in Supplementary files are permitted provided that they also appear in the main text and in the reference list.
 - In the text, reference numbers should be placed in square brackets [], and placed before the punctuation; for example [1], [1–3] or [1,3]. For embedded citations in the text with pagination, use both parentheses and brackets to indicate the reference number and page numbers; for example [5] (p. 10). or [6] (pp. 101–105).
 - The Reference list should include the full title as recommended by the ACS style guide. The style file for endnote, MDPI.ens, can be found at <http://endnote.com/downloads/style/mdpi>
 - References should be described as follows depending on the type of work:
 - Journal Articles:
 1. Author 1, A.B.; Author 2, C.D. Title of the article. *Abbreviated*

Journal Name **Year**, *Volume*, page range, DOI or other identifier.
Available online: URL (accessed on Day Month Year).

- Books and Book Chapters:
 2. Author 1, A.; Author 2, B. *Book Title*, 3rd ed.; Publisher: Publisher Location, Country, Year; pp. 154–196.
 3. Author 1, A.; Author 2, B. Title of the chapter. In *Book Title*, 2nd ed.; Editor 1, A.; Editor 2, B., Eds.; Publisher: Publisher Location, Country, Year; Volume 3, pp. 154–196.
- Unpublished work, submitted work, personal communication:
 4. Author 1, A.B.; Author 2, C. Title of Unpublished Work. status (unpublished; manuscript in preparation).
 5. Author 1, A.B.; Author 2, C. Title of Unpublished Work. *Abbreviated Journal Name* stage of publication (under review; accepted; in press).
 6. Author 1, A.B. (University, City, State, Country); Author 2, C. (Institute, City, State, Country). Personal communication, Year.
- Conference Proceedings:
 7. Author 1, A.B.; Author 2, C.D.; Author 3, E.F. Title of Presentation. In *Title of the Collected Work* (if available), Proceedings of the Name of the Conference, Location of Conference, Country, Date of Conference; Editor 1, Editor 2, Eds. (if available); Publisher: City, Country, Year (if available); Abstract Number (optional), Pagination (optional).
- Thesis:
 8. Author 1, A.B. Title of Thesis. Level of Thesis, Degree-Granting University, Location of University, Date of Completion.
- Websites:
 9. Title of Site. Available online: URL (accessed on Day Month Year). Unlike published works, websites may change over time or disappear, so we encourage you create an archive of the cited website using a service such as [WebCite](#). Archived websites should be cited using the link provided as follows:
 10. Title of Site. URL (archived on Day Month Year).

See the [Reference List and Citations Guide](#) for more detailed information.

Preparing Figures, Schemes and Tables

- All figure files should be separately uploaded during submission.
- Figures and schemes must be provided at a sufficiently high resolution (minimum 1000 pixels width/height, or a resolution of 300 dpi or higher). All Figure file formats are accepted. However, TIFF, JPEG, EPS and PDF files are preferred.
- *IJERPH* can publish multimedia files in articles or as supplementary materials. Please get in touch with the Editorial office for further information.
- All Figures, Schemes and Tables should also be inserted into the main text close to their first citation and must be numbered following their number of appearance (Figure 1, Scheme I, Figure 2, Scheme II, Table 1, *etc.*).
- All Figures, Schemes and Tables should have a short explanatory title and a caption.
- All table columns should have an explanatory heading. To facilitate the copy-editing of larger tables, smaller fonts may be used, but in no less than 8 pt. in size. Authors should use the Table option of Microsoft Word to create tables.
- For multi-panel figures, the file must contain all data in one file. For tips on creating multi-panel figures, please read the helpful advice provided by [L2 Molecule](#).
- Authors are encouraged to prepare figures and schemes in color (RGB at 8-bit per channel). Full color graphics will be published free of charge.

Qualification for Authorship

Authorship must include and be strictly limited to researchers who substantially contributed to the design of the study, the production, analysis, or interpretation of the results, and/or preparation of the manuscript. Those who contributed to the work but do not qualify for authorship should be listed in the acknowledgments. More detailed guidance on authorship is given by the [International Council of Medical Journal Editors \(ICMJE\)](#). The journal also adheres to the standards of the Committee on Publication Ethics ([COPE](#)) that "all authors should agree to be listed and should approve the submitted and accepted versions of the publication. Any change to the author list should be approved by all authors including any who have been removed from the list. The corresponding author should act as a point of contact between the editor and the other authors and should keep co-authors informed and involve them in major decisions about the publication (e.g. answering reviewers' comments)."

[1]

1. Wager, E.; Kleinert, S. Responsible research publication: international standards for authors. A position statement developed at the 2nd World Conference on Research Integrity, Singapore, July 22-24, 2010. In *Promoting Research Integrity in a Global Environment*; Mayer, T., Steneck, N., eds.; Imperial College Press / World Scientific Publishing: Singapore; Chapter 50, pp. 309-16.

Research Ethics Guidelines

1. Research Involving Animals

The editors will require that the benefits potentially derived from any research causing harm to animals are significant in relation to any suffering endured by animals, and that procedures followed are unlikely to cause offense to the majority of readers. Authors should particularly ensure that their research complies with the commonly-accepted '3Rs':

- Replacement of animals by alternatives wherever possible,
- Reduction in number of animals used, and
- Refinement of experimental conditions and procedures to minimize the harm to animals.

Any experimental work must be conducted in accordance with relevant national legislation on the use of animals for research. Authors should follow the ARRIVE (Animal Research: Reporting of *In Vivo* Experiments) guidelines (<http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=1357>) for reporting experiments using live animals. Authors may use the ARRIVE guidelines as a checklist (www.nc3rs.org.uk/ARRIVEchecklist).

An approval from an ethics committee must be obtained before undertaking the research. The project identification code, date of approval and name of the ethics committee or institutional review board should be cited in the Methods section.

Editors reserve the rights to reject any submission that does not meet these requirements.

An example of Ethical Statements:

The animal protocols used in this work were evaluated and approved by the Animal Use and Ethic Committee (CEUA) of the Institute Pasteur Montevideo (Protocol 2009_1_3284). They are in accordance with FELASA guidelines and the National law for Laboratory Animal Experimentation (Law no. 18.611).

2. Research Involving Human Subject

When reporting on research that involves human subjects, human material, human tissues or human data, authors must declare that the investigations were carried out following the rules of the Declaration of Helsinki of 1975(<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>), revised in 2008. According to point 23 of this declaration, an approval from an ethics committee should have been obtained before undertaking the research. As a minimum, a statement including the project identification code, date of approval and name of the ethics committee or institutional review board should be cited in the Methods Section of the article. Data relating to individual participants must be described in detail, but private information identifying participants need not be included unless the identifiable materials are of relevance to the research (for example, photographs of participants' faces that show a particular symptom). A written informed consent for publication must be obtained from participating patients in this case.

Editors reserve the rights to reject any submission that does not meet these requirements.

Example of Ethical Statements:

All subjects gave their informed consent for inclusion before they participated in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Ethics Committee of XXX (Project identification code).

3. Research Involving Cell Line

Methods sections for submissions reporting on research with cell lines should state the origin of any cell lines. For established cell lines the provenance should be stated and references must also be given to either a published paper or to a commercial source. If previously unpublished *de novo* cell lines were used, including those gifted from another laboratory, details of institutional review board or ethics committee approval must be given, and confirmation of written informed consent must be provided if the line is of human origin.

An example of Ethical Statements:

The HCT116 cell line was obtained from XXXX. The MLH1⁺ cell line was provided by XXXXX, Ltd. The DLD-1 cell line was obtained from Dr. XXXX. The DR-GFP and SA-GFP reporter plasmids were obtained from Dr. XXX and the Rad51K133A expression vector was obtained from Dr. XXXX.

Potential Conflicts of Interest

It is the authors' responsibility to identify and declare any personal circumstances or interests that may be perceived as inappropriately influencing the representation or interpretation of clinical research. If there is no conflict, please state here "The authors declare no conflict of interest." This should be conveyed in a separate "Conflicts of Interest" section preceding the "References" sections at the end of the manuscript.

Editorial Procedures and Peer-Review

Initial Checks

All submitted manuscripts received by the Editorial Office will be checked by a professional in-house *Managing Editor* to determine whether it is properly prepared and whether the manuscript follows the ethical policies of the journal, including those for human and animal experimentation. Manuscripts that do not fit the journal's ethical policy will be rejected before peer-review. Manuscripts that are not properly prepared will be returned to the authors for revision and resubmission. After these checks, the *Managing Editor* will consult the journal's *Editor-in-Chief* or the *Guest Editor* (or an *Editorial Board member* in case of a conflict of interest) to determine whether the manuscript fits the scope of the journal and whether it is scientifically sound. No judgment on the significance or potential impact of the work will be made at this stage. Reject decisions at this stage will be verified by the *Editor-in-Chief*.

Peer-Review

Once a manuscript passes the initial checks, it will be assigned to at least two independent experts for peer-review. A single blind peer-review process is applied, where authors' identities are known to reviewers.

In the case of regular submissions, in-house assistant editors will invite experts, including recommendations by an academic editor. These experts may also include *Editorial Board members* and *Guest Editors* of the journal. In the case of a special issue, the *Guest Editor* will advise in the selection of reviewers.

Potential reviewers suggested by the authors may also be considered. Reviewers should not have published with any of the co-authors during the past five years and should not currently work or collaborate with one of the institutes of the co-authors of the submitted manuscript.

Editorial Decision and Revision

Based on the comments and advice of the peer-reviewers, an external editor – usually the *Editor-in-Chief* or a *Guest Editor* – will make a decision to accept, reject, or to ask authors to revise the manuscript.

For *Minor Revisions* the authors will have one week to resubmit their revised manuscript. For *Major Revisions* the authors will have two weeks to resubmit their revised manuscript. However, authors should contact the editorial office if extended revision time is anticipated.

Author Appeals

Authors may appeal a rejection by sending an e-mail to the Editorial Office of the journal. The appeal must provide a detailed justification, including point-by-point responses to the reviewers' and/or Editor's comments. The *Managing Editor* of the journal will forward the manuscript and relating information (including the identities of the referees) to an Editorial Board member who was not involved in the initial decision-making process. If no appropriate Editorial Board member is available, the editor will identify a suitable external scientist. The Editorial Board member will be asked to give an advisory recommendation on the manuscript and may recommend acceptance, further peer-review, or uphold the original rejection decision. A reject decision at this stage will be final and cannot be revoked.

In the case of a special issue, the *Managing Editor* of the journal will forward the manuscript and relating information (including the identities of the referees) to the *Editor-in-Chief* who will be asked to give an advisory recommendation on the manuscript and may recommend acceptance, further peer-review, or uphold the original rejection decision. A reject decision at this stage will be final and cannot be revoked.

Production and Publication

Once accepted, the manuscript will undergo professional copy-editing, English editing, proofreading by the authors, final corrections, pagination, and, publication on the www.mdpi.com website.

Suggesting Reviewers

During the submission process, authors are pre encouraged to list five names of potential reviewers with the appropriate expertise to review the manuscript. The editors will not necessarily approach these referees. Please provide detailed contact information (address, homepage, phone, e-mail address). The proposed referees should neither be current

collaborators of the co-authors nor have published with any of the co-authors of the manuscript within the last five years. Proposed reviewers should be from different institutions to the authors. You may identify appropriate Editorial Board members of the journal as potential reviewers. You may also suggest reviewers from among the authors that you frequently cite in your paper.

English Corrections

This journal is published in English. To facilitate proper peer-reviewing of your manuscript, it is essential that it is submitted in grammatically correct English. If you are not a native English speaker, we strongly recommend that you have your manuscript professionally edited before submission or read by a native English-speaking colleague. Professional editing will mean that reviewers and future readers are better able to read and assess the content of your manuscript. For additional information see the [English Editing Guidelines for Authors](#).

Publication Ethics Statement

IJERPH is a member of the Committee on Publication Ethics ([COPE](#)). We fully adhere to its [Code of Conduct](#) and to its [Best Practice Guidelines](#).

The editors of this journal take the responsibility to enforce a rigorous peer-review process together with strict ethical policies and standards to ensure to add high quality scientific works to the field of scholarly publication. Unfortunately, cases of plagiarism, data falsification, image manipulation, inappropriate authorship credit, and the like, do arise. The editors of *IJERPH* take such publishing ethics issues very seriously and are trained to proceed in such cases with a zero tolerance policy.

Authors wishing to publish their papers in *IJERPH* are asked to abide to the following rules:

- Any facts that might be perceived as a possible conflict of interest of the author(s) must be disclosed in the paper prior to submission.
- Authors should accurately present their research findings and include an objective discussion of the significance of their findings.
- Data and methods used in the research need to be presented in sufficient detail in the paper, so that other researchers can replicate the work.
- Raw data should preferably be publicly deposited by the authors before submission of their manuscript. Authors need to at least have the raw data readily available for presentation to the referees and the editors of the journal, if requested. Authors need to

ensure appropriate measures are taken so that raw data is retained in full for a reasonable time after publication.

- Simultaneous submission of manuscripts to more than one journal is not tolerated.
- Republishing content that is not novel is not tolerated (for example, an English translation of a paper that is already published in another language will not be accepted).
- If errors and inaccuracies are found by the authors after publication of their paper, they need to be promptly communicated to the editors of this journal so that appropriate actions can be taken. Please refer to our [policy regarding publication of publishing addenda and corrections](#).
- Your manuscript should not contain any information that has already been published. If you include already published figures or images, please obtain the necessary permission from the copyright holder to publish under the CC-BY license.
- Plagiarism, data fabrication and image manipulation are not tolerated.

- **Plagiarism is not acceptable** in *IJERPH* submissions.

Plagiarism includes copying text, ideas, images, or data from another source, even from your own publications, without giving any credit to the original source.

Reuse of text that is copied from another source must be between quotes and the original source must be cited. If a study's design or the manuscript's structure or language has been inspired by previous works, these works must be explicitly cited.

If plagiarism is detected during the peer review process, the manuscript may be rejected. If plagiarism is detected after publication, we may publish a correction or retract the paper.

- **Image files must not be manipulated or adjusted in any way** that could lead to misinterpretation of the information provided by the original image.

Irregular manipulation includes: 1) introduction, enhancement, moving, or removing features from the original image; 2) grouping of images that should obviously be presented separately (e.g., from different parts of the same gel, or from different gels); or 3) modifying the contrast, brightness or color balance to obscure, eliminate or enhance some information.

If irregular image manipulation is identified and confirmed during the peer review process, we may reject the manuscript. If irregular image manipulation is identified and confirmed after publication, we may correct or retract the paper.

Our in-house editors will investigate any allegations of publication misconduct and may contact the authors' institutions or funders if necessary. If evidence of misconduct is found, appropriate action will be taken to correct or retract the publication. Authors are expected to comply with the best ethical publication practices when publishing with MDPI.

Supplementary Materials, Data Deposit and Software Source Code

In order to maintain the integrity, transparency and reproducibility of research records, authors are strongly encouraged to make their experimental and research data openly available either by depositing into data repositories or by publishing the data and files as supplementary information in this journal.

For papers in which new computer code (e.g., analytical bioinformatics tools or computer simulations) is of central importance, the authors are encouraged to release custom computer code either by depositing in public source code repositories or by publishing the source code as supplementary information to the publication.

Additional data and files can be uploaded as "Supplementary Files" during the manuscript submission process. The supplementary files will also be available to the referees as part of the peer-review process, although referees are not specifically asked to review these files.

Accepted file formats include (but are not limited to):

- data tables and spreadsheets (text files, MS Excel, OpenOffice, CSV, XML, *etc.*)
- text documents (text files, PDF, MS Word, OpenOffice, *etc.*; text documents will usually be converted to PDF files for publication)
- images (JPEG, PNG, GIF, TIFF, BMP, *etc.*)
- videos (AVI, MPG, QuickTime, *etc.*)
- executables (EXE, Java, *etc.*)
- software source code

Citations and References in Supplementary files are permitted provided that they also appear in the main text and in the reference list.

Large data sets and files should be deposited to specialized service providers (such as [Figshare](#)) or institutional/subject repositories, preferably those that use the [DataCite](#) mechanism. For a list of specialized repositories for the deposit of scientific and experimental data, please consult [datatib.org](#) or [re3data.org](#). The data repository name, link to the data set (URL) and accession number, doi or handle number of the data set must be provided in the paper. The journal *Data* (ISSN 2306-5729) also accepts submissions of data set papers, and the publication of small data sets along with the paper, and/or software source codes is encouraged.

Guidelines for Deposition of Sequences and of Expression Data

New sequence information must be deposited to the appropriate database prior to submission of the manuscript. Accession numbers provided by the database should be included in the submitted manuscript. Manuscripts will not be published until the accession number is provided.

- **New nucleic acid sequences** must be deposited in one of the following databases: GenBank, EMBL, or DDBJ. Sequences should be submitted to only one database.
- **New high throughput sequencing (HTS) datasets** (RNA-seq, ChIP-Seq, degradome analysis, ...) must be deposited either in the GEO database or in the NCBI's Sequence Read Archive.
- **New microarray data** must be deposited either in the GEO or the ArrayExpress databases. The "Minimal Information About a Microarray Experiment" (MIAME) guidelines published by the Microarray Gene Expression Data Society must be followed.
- **New protein sequences** obtained by protein sequencing must be submitted to UniProt (submission tool SPIN).

All sequence names and the accession numbers provided by the databases should be provided in the Materials and Methods section of the article.

Anexo 2

Normas do Periódico Respiratory Medicine (ISSN: 0954-6111)

GUIDE FOR AUTHORS

Your Paper Your Way We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article. **To find out more, please visit the Preparation section below.**

Respiratory Medicine is an internationally-renowned, clinically-oriented journal, combining cuttingedge original research with state-of-the-art reviews dealing with all aspects of respiratory diseases and therapeutic interventions, but with a clear clinical relevance. The journal is an established forum for the publication of phased clinical trial work at the forefront of interventive research. As well as fulllength original research papers, the journal publishes reviews, correspondence, and short reports. The Journal also publishes regular supplements on areas of special interest.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <https://www.elsevier.com/publishingethics> and <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If there are no conflicts of interest then please state this: 'Conflicts of interest: none'. See also <https://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at:

http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <https://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <https://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed. Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Clinical trial results

In line with the position of the International Committee of Medical Journal Editors, the journal will not consider results posted in the same clinical trials registry in which primary registration resides to be prior publication if the results posted are presented in the form of a brief structured (less than 500 words) abstract or table. However, divulging results in other circumstances (e.g., investors' meetings) is discouraged and may jeopardise consideration of the manuscript. Authors should fully disclose all posting in registries of results of the same or closely related work.

When submitting a Clinical Trial paper to the journal via the online submission system please select Clinical Trial Paper as an article type.

Reporting clinical trials

Randomized controlled trials should be presented according to the CONSORT guidelines. At manuscript submission, authors must provide the CONSORT checklist accompanied by a flow diagram that illustrates the progress of patients through the trial, including recruitment, enrollment, randomization, withdrawal and completion, and a detailed description of the randomization procedure. The CONSORT checklist and template flow diagram can be found on <http://www.consort-statement.org>.

Registration of clinical trials

Registration in a public trials registry is a condition for publication of clinical trials in this journal in accordance with International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE, <http://www.icmje.org>) recommendations. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. A clinical trial is defined as any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects of health outcomes. Health-related interventions include any intervention used to modify a biomedical or health-related outcome (for example drugs, surgical procedures, devices, behavioural treatments, dietary interventions, and process-of-care

changes). Health outcomes include any biomedical or health-related measures obtained in patients or participants, including pharmacokinetic measures and adverse events. Purely observational studies (those in which the assignment of the medical intervention is not at the discretion of the investigator) will not require registration.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information about this can be found here: <https://www.elsevier.com/authors/article-transfer-service>.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <https://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <https://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <https://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information

see <https://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <https://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <https://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <https://www.elsevier.com/fundingbodies>.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse

- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<https://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 3250**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy:<http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/yrmed>.

Submissions are allocated to a handling editor, typically an Associate Editor. Should the paper be considered suitable for peer review, appropriate reviewers will be recruited. Authors are required to provide the name and full contact details of 2 potential reviewers, though choice of reviewers is at the discretion of the handling editor. The final decision-making responsibility lies with the handling editor, who reserves the right to reject the paper despite favourable reviews depending on the priorities of the journal.

Reviews

The journal welcomes submission of state-of-the-art reviews on important topics with a clinical relevance. Potential review authors are encouraged to contact the Deputy Editor Dr N. Hanania hanania@bcm.tmc.edu in advance with their review proposals.

Case Reports

Case reports will no longer be considered for publication in Respiratory Medicine, but instead should be directed to the sister publication Respiratory Medicine Case Reports. Please note that this is a separate publication. Case reports should be submitted for consideration by Respiratory Medicine Case Reports via <http://ees.elsevier.com/rmcr/>. Respiratory Medicine Case Reports is an open access journal and all authors will be required to pay a £250 processing fee to cover the costs of publishing the article, which authors will be required to pay once an article has passed peer review.

<Brief Communications

These should be submitted as detailed above but should not exceed 1000 words, and may normally contain only one illustration or table. Brief communications containing new information may be selected for rapid peer review and publication at the discretion of the editor and editorial board.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process. As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book

chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes. Divide the article into clearly defined sections.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier:<https://www.elsevier.com/guidepublication>). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as

possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- ***Author names and affiliations.*** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the

authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Structured abstract

A structured abstract, by means of appropriate headings, should provide the context or background for the research and should state its purpose, basic procedures (selection of study subjects or laboratory animals, observational and analytical methods), main findings (giving specific effect sizes and their statistical significance, if possible), and principal conclusions. It should emphasize new and important aspects of the study or observations.

A list of three to six keywords should be supplied: full instructions are provided when submitting the article online.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.

- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):
EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.
TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted

article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Illustration services

Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/illustrationservices>) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in

the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/respiratory-medicine>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations: <http://www.issn.org/services/online-services/access-to-the-ltwa/>.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information

and examples are available at <https://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address
- All necessary files have been uploaded, and contain:
- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)
- Further considerations
- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa

- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet) Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white
- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal *Physics Letters B*): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors. If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

Author Inquiries

You can track your submitted article at <https://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <https://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.