

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**

Luciana Rizzieri Figueiró

***Avaliação *in vitro* da Toxicidade do
Thirdhand Smoke***

UFCSPA

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2016**

Luciana Rizzieri Figueiró

Avaliação *in vitro* da Toxicidade do *Thirdhand Smoke*

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Doutor

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Denise Conceição Mesquita Dantas
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Luiza Ziulkoski

**Porto Alegre
2016**

Catálogo na Publicação

Figueiró, Luciana Rizzieri

Avaliação in vitro da toxicidade do thirdhand smoke /
Luciana Rizzieri Figueiró. -- 2016.

144 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências
da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em
Patologia, 2016.

Orientador(a): Denise Conceição Mesquita Dantas ;
coorientador(a): Ana Luiza Ziulkoski.

1. thirdhand smoke. 2. fumaça de cigarro. 3.
citotoxicidade. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Vou tomar a liberdade de ocupar algumas linhas antes de meus agradecimentos...

Sempre achei que o doutorado seria a continuidade de tudo aquilo que se vinha fazendo ao longo da jornada acadêmica. Sabia que não seria fácil, mas esperava já saber o que e como fazer. E pode ser assim, a menos que se decida mudar de rota. No meu caso, significou voltar para a bancada. De certa forma, senti-me começando do zero! Apreendi tanto esses anos! Desde a trabalhar com cultivo celular até a completar as horas de sono no ônibus ou a dirigir na BR-116. Se hoje tenho a tese em mãos, preciso reconhecer e estender meus agradecimentos a quem tornou isso possível.

Obrigada, primeiramente ao meu bom Pai Celestial. Sem a proteção e orientação divina, a vida perde o sentido. Quantas vezes o doutorado foi incluído em minhas preces! E Ele nunca falhou!

Obrigada à minha família, que sempre acreditou em meu potencial e forneceram-me todo o suporte para estudar e ir além. Muito obrigada a meu esposo, que foi paciente e bondoso ao longo do caminho. Sem teu apoio e abraço consolador, não teria conseguido. Larri, te amo!

Muito obrigada à minha orientadora, Denise. Quando bati em tua porta, ainda na graduação, talvez não tenhamos planejado tantos anos de trabalho em conjunto. Sou muito grata pela tua orientação científica, mas muito mais pela tua amizade, preocupação pelo meu bem-estar e orientação para a vida.

Muito obrigada à minha co-orientadora, Ana Luiza, que me recebeu de braços abertos. Quem diria que uma conversa em um congresso em outro

estado renderia tanto! Obrigada pela confiança, estímulo e por compartilhar comigo tanto conhecimento.

Denise e Ana, vocês são as melhores orientadoras do mundo!

Obrigada ao prof. Rafael Linden pela parceria e suporte nas análises toxicológicas.

Obrigada a toda equipe do Laboratório de Citotoxicidade da Universidade Feevale. Vocês são pessoas fáceis de se trabalhar e de quem se quer sempre estar por perto. Também agradeço pela companhia da equipe do Laboratório de Microbiologia Molecular da Universidade Feevale. Ofereço um agradecimento especial para Amanda Ferreira Becker, minha IC que deu certo! Obrigada pela tua dedicação e competência. Tua ajuda foi fundamental para a realização do trabalho.

Obrigada a todos os colegas do Lige 132, que para mim sempre será VIVAVOZ. Vocês acompanharam minhas aflições, compreenderam meu afastamento do convívio diário e torceram por mim. Carrego vocês no meu coração.

Obrigada à família que meu coração escolheu, meus amigos que sempre me incentivaram e me ajudaram a esporecer para manter-me firme e forte.

Obrigada à equipe do Laboratório de Toxicologia, da Farmácia-Escola e do Laboratório de Química da Universidade Feevale. Obrigada à Letícia e ao Felipe do Laboratório de Farmacologia da UFCSPA. Vocês foram sempre muito generosos ao me ajudar no que necessitei.

Obrigada à Maristela, secretária do PPG Patologia da UFCSPA. Foste sempre muito solícita e, mesmo por e-mail, ofereceste uma palavra bondosa e animadora.

Obrigada a todos os meus professores e colegas do Programa de Pós-Graduação. Cada um contribuiu das mais variadas formas para meu crescimento como pesquisadora.

Obrigada a todos que aceitaram participar da pesquisa. Sem a disposição genuína e desinteressada de 'anônimos', a ciência não progride em nosso meio.

Obrigada ao Programa de Apoio à Pós-Graduação da UFCSPA e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo apoio financeiro.

Fico muito feliz em poder contar com cada um de vocês e ofereço meus mais sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Epidemiologia do Tabagismo	5
1.2. Poluição Tabagística Ambiental (PTA)	8
1.3. <i>Thirdhand Smoke</i> (THS)	17
1.3.1. <i>A retenção do THS</i>	20
1.3.2. <i>A composição do THS</i>	26
1.3.3. <i>Efeitos do THS na saúde</i>	37
1.4. Avaliação da Citotoxicidade	43
1.5. Referências Bibliográficas	52
2. OBJETIVOS	65
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS	66
3.1. Artigo Científico 1: <i>Cellular effects of thirdhand tobacco smoke from smokers' homes</i>	66
3.2. Artigo Científico 2: <i>Effects of residual tobacco smoke in A549, Hep-2 and 3T3 cells</i>	98
3.3. Artigo Científico 3: <i>Thirdhand tobacco smoke: procedures to evaluate cytotoxicity in cell cultures</i>	114
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	140
5. ANEXOS	143
5.1. Parecer do Comitê de Ética	143
5.2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	144
5.3. Divulgação dos Resultados	145

LISTA DE ABREVIATURAS

2,5-DMF: 2,5-dimetilfurano

3-EP: 3-etinilpiridina

BCA: ácido bicinconínico

CFC: condensado de fumaça de cigarro

CO: monóxido de carbono

CO₂: dióxido de carbono

COSVs: compostos orgânicos semivoláteis

COVs: compostos orgânicos voláteis

CQCT: Convenção Quadro para o Controle do Tabaco

EPA: *Environmental Protection Agency*

HAPs: hidrocarbonetos aromáticos policíclicos

hDF: fibroblastos dérmicos humanos

HONO: ácido nitroso

IC95: intervalo de confiança 95%

IIQ: intervalo interquartil

iso-NNAL: 4-(methilnitrosamina)-4-(3-piridil)-1-butanol

MG: média geométrica

mNSC: células-tronco neurais de camundongo

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

NNA: N-nitrosopirrolidina e a 4-(metilnitrosamino)-4-(3-piridil)-butanal

NNAL: 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanol

NNK: 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona

NNN: N'-nitrosonornicotina

O₃: ozônio

OMS: Organização Mundial da Saúde

OSHA: Administração de Segurança e Saúde Ocupacional

PM: material particulado

PNAD: Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios

PPAR- γ : receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama

PTA: poluição tabagística ambiental

THS: *thirdhand smoke*

VN: vermelho neutro

RESUMO

Introdução: O *Thirdhand Smoke* (THS) consiste nos poluentes residuais da fumaça de cigarro que permanecem nos ambientes. A principal preocupação com o THS é embasada na presença e longa persistência de muitos compostos tóxicos, alguns ausentes na fumaça emitida enquanto o cigarro está aceso. Além de pouca informação sobre o THS, há um desconhecimento da sua existência e seus efeitos na saúde.

Objetivo: Avaliar a toxicidade do THS por meio de ensaios *in vitro*.

Materiais e Métodos: Papel cromatográfico e discos de algodão foram impregnados com fumaça produzida pela queima espontânea de cigarros em câmara ou utilizados para coletar o THS em casas de fumantes (n= 9) e casas de não fumantes (n= 3). Os materiais coletados foram imersos em meio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) para recuperação dos compostos retidos na amostra. Linhagens celulares A549, Hep-2 e 3T3 foram expostas por 24 horas ao DMEM utilizado para recuperação do THS. Ensaios de redução do MTT, recaptção do vermelho neutro (VN) e exclusão do azul de tripano foram realizados para avaliação da funcionalidade mitocondrial, viabilidade lisossomal e número de células.

Resultados: Nas amostras impregnadas com fumaça de cigarro, observaram-se aumento na atividade mitocondrial e diminuição da taxa de proliferação nas células 3T3, enquanto que, nas células Hep-2, houve alteração na viabilidade lisossomal. Nas amostras coletadas nas casas de fumantes, a principal alteração celular encontrada foi aumento na atividade mitocondrial nas três linhagens celulares.

Conclusão: O THS provocou alterações em funções importantes para a sobrevivência celular. Devido à diferente sensibilidade das células ao THS, é importante estudar seus efeitos em diferentes ensaios e tipos celulares. Mesmo que nossos resultados não tenham mostrado efeito citotóxico clássico, como morte ou diminuição crítica da função celular, esse foi o primeiro estudo sobre os efeitos do THS coletado em casas de fumantes.

Palavras-chave: *thirdhand smoke*, nicotina, poluição tabágica ambiental, citotoxicidade.

ABSTRACT

Introduction: Thirdhand Smoke (THS) is the pollutants from cigarette smoke that remain in the environment. The main concern with THS is grounded in the present and long persistence of many toxic compounds, some absent in freshly emitted smoke. In addition to knowing little about the THS, few people know of its existence and worrying impact on health.

Aim: To evaluate the toxicity of THS through *in vitro* assays.

Material and Methods: Cellulose papers and cotton wipes were used to impregnate with the smoke generated by burning cigarettes in laboratory chamber or used to collect THS from smoker's homes (n= 9) and nonsmoker's homes (n= 3). The collected materials were immersed in Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) to transfer the compounds of the material to the solvent. A549, Hep-2 and 3T3 cells were exposed for 24 hours to the DMEM with THS. MTT reduction, Neutral Red uptake and Trypan blue exclusion assays were performed to assess the number of cells, mitochondrial activity and lysosomal viability.

Results: In samples with cigarette smoke, there was increased mitochondrial activity and decreased cell proliferation rate in 3T3 cells, while, in Hep-2 cells, there was change in lysosomal viability. In samples collected from smokers' homes, the main cellular effect was increased mitochondrial activity in the three cell lines.

Conclusion: THS was able to cause changes in important functions for suitable cell survival. Because of different sensibility of cells to THS, screening multiple cell types is critical to better assess its cytotoxicity. Even showing no

classical cytotoxic effect, as death or critical decreased cell function, this was the first study to evaluate the cellular effects of THS based on samples collected from smokers' homes.

Keywords: thirdhand smoke, nicotine, environmental tobacco smoke, cytotoxicity.

1. INTRODUÇÃO

Quando Cristóvão Colombo chegou ao continente americano, utilizava-se o tabaco em todo o território (Musk e De Klerk, 2003; Rosenberg, 2003). Inicialmente, o uso do tabaco era visto no continente europeu como um comportamento danoso, sendo o primeiro fumante aprisionado pela Inquisição (Musk e de Klerk, 2003). No entanto, as propriedades medicinais conferidas à planta ganharam notoriedade e, assim, os colonizadores levaram as sementes ou a planta do tabaco para Europa. Rapidamente o tabaco integrou-se a todas as populações do mundo civilizado (Rosenberg, 2003; Balbani e Mantovani, 2005).

A popularidade do tabagismo foi tão notória que, no período pós-guerra, o ato de fumar era estimulado e conferia aos fumantes um *status* social invejável. A valorização social do ato de fumar ainda é o principal contribuinte para os problemas de saúde pública enfrentados em nossos dias (Guerra, 2004), pois grande parte dos fumantes que apresentam alguma doença tabaco-relacionada começou a fumar na época em que o tabagismo era associado ao charme e à inofensividade.

A visão glamorizada do tabagismo começou a ser revertida com a publicação de fortes evidências nas décadas de 50 e 60 quanto à associação entre tabagismo e câncer de pulmão e mortes (Doll e Hill, 1950; Hammond, 1958; Musk e De Klerk, 2003). Também nessa época, o *Advisory Committee to the Surgeon General* publicou um relatório com evidências robustas de que o fumo ativo causava câncer de pulmão em homens (*U.S. Department of Health and Human Services*, 2014). A partir destas evidências, o tabagismo foi

considerado nocivo em relação aos seus efeitos na saúde dos fumantes. Somente em 1988, o Ministério da Saúde dos Estados Unidos publicou um relatório revisando os estudos que comprovavam a capacidade do tabaco de causar dependência (*U.S. Department of Health and Human Services*, 1988). Desse modo, a comunidade científica mundial passou a reconhecer o próprio tabagismo como uma doença.

Em 1986, o Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos publicou o primeiro relatório sobre as consequências do tabagismo involuntário indicando que indivíduos expostos passivamente à fumaça de cigarro em casa, no local de trabalho ou em locais públicos apresentavam maior risco de desenvolver doenças respiratórias e cardiovasculares além de cânceres em comparação a pessoas não expostas (*U.S. Department of Health and Human Services*, 2006). Tanto os prejuízos aos fumantes ativos quanto aos fumantes involuntários são oriundos das substâncias liberadas durante a queima dos produtos derivados do tabaco.

A fumaça do cigarro é uma mistura heterogênea de gases, vapores e partículas líquidas, que formam um aerossol de milhões ou bilhões de partículas por centímetro cúbico (Silva, 2004). A quantidade dos constituintes da fumaça a que um indivíduo é exposto involuntariamente depende da dimensão do espaço, número de fumantes ativos, intensidade do fumo, tempo de exposição e frequência de troca do ar no ambiente (Okoli, Kelly e Hahn, 2007). Os poluentes da fumaça de produtos derivados do tabaco dispersam-se homogeneamente na atmosfera de modo que qualquer indivíduo fica exposto a concentrações significativas dessas substâncias, quer esteja próximo ou distante da fonte de produção (Jenkins, Guerin e Tomkins, 2000).

Nos últimos anos, passou a ser discutido o perigo que a contaminação pelas substâncias residuais da fumaça, mesmo após o cigarro ser apagado, pode trazer a indivíduos assim expostos. Essa exposição tem sido chamada de *thirdhand smoke* (THS) (Winickoff e cols., 2009) ou, termo ainda pouco difundido em português, fumo de terceira mão. O THS consiste em uma mistura de compostos voláteis e materiais particulados que pode ser depositada ou adsorvida em superfícies, incluindo móveis, estofados e roupas (Matt e cols., 2011a). A principal preocupação com o THS é embasada na presença e persistência de muitos compostos tóxicos, até mesmo por meses, incluindo algumas nitrosaminas específicas do tabaco ausentes na fumaça recém-emitida ou que possuem atividade carcinogênica (Sleiman e cols., 2010a; Matt e cols., 2011b). Além disso, parece não haver nenhum procedimento eficaz para a remoção desses constituintes, principalmente em materiais estofados (Kuschner e cols., 2011).

Enquanto há evidências científicas sobre os prejuízos do tabagismo involuntário na saúde de indivíduos e não há como ignorar a existência do THS, pouco é conhecido sobre os mecanismos de ação desse poluente. Nem mesmo todos os seus constituintes foram identificados (Matt e cols., 2011b). Em geral, as medidas para impedir essa forma de exposição se baseiam na necessidade de remover o odor deixado pelo cigarro no ambiente, porém o risco de contaminação permanece. Por sua natureza invisível e silenciosa, pouco se sabe sobre os seus efeitos na saúde. De fato, dos primeiros estudos sobre o tema, um apontou a capacidade do THS, gerado experimentalmente, provocar dano oxidativo ao DNA em linhagem celular (Hang e cols., 2013), enquanto outro falhou em comprovar sua mutagenicidade (Petrick, Svidovsky e

Dubowsky, 2011). O único estudo em ambiente real para avaliar os riscos dessa exposição utilizou modelo matemático para estimar o risco de câncer relacionado ao grau de exposição às nitrosaminas provenientes do THS (Ramírez e cols., 2014).

Em 2003, os Estados Membros da Organização Mundial da Saúde (OMS), entre eles o Brasil, adotaram a Convenção Quadro para o Controle do Tabaco (CQCT), um tratado internacional de saúde pública que preconiza a responsabilidade do poder público em criar e aplicar programas eficazes para controlar o uso dos produtos derivados do tabaco em seus países (*World Health Organization*, 2003). A CQCT fixa padrões para proteger as gerações presentes e futuras das devastadoras consequências sanitárias, sociais, ambientais e econômicas geradas pelo consumo e pela exposição à fumaça do tabaco, resultando na redução da prevalência do consumo e da exposição à fumaça de maneira contínua e substancial (Ministério da Saúde, 2003).

Com a adoção prática das medidas protetoras preconizadas pela CQCT, percebe-se o crescimento de ‘ambientes 100% livres do tabaco’, porém tais locais se concentram em estabelecimentos de domínio público ou de uso coletivo. Tal medida ainda falha em abranger os locais em que as pessoas se encontram mais vulneráveis: em seus próprios domicílios ou em outros locais em que os dispositivos legais não conseguem ter um controle rigoroso, como em carros particulares (Samet, Chanson e Wipfli, 2015).

O potencial efeito na saúde individual e pública do THS promove a necessidade de pesquisas básicas para comprovar ou desmistificar tais riscos e estimular um debate embasado em evidências. O esclarecimento sobre os danos provocados pelo THS poderia ser usado clinicamente para encorajar a

adoção de práticas restritivas ao fumo em locais em que não fumantes frequentem, até mesmo em casa e ambientes particulares, e também estimular a cessação do tabagismo.

1.1. Epidemiologia do Tabagismo

Estima-se que o tabagismo ativo atinja 20% da população mundial com idade acima de 15 anos. Em número, isso significa que há aproximadamente um bilhão de fumantes no mundo. Os homens representam 82% do total de fumantes, no entanto, entre os adolescentes e países de baixa renda, observa-se aumento na prevalência de indivíduos do gênero feminino entre os tabagistas (Asma e cols., 2015; *World Health Organization*, 2015). Nos países em que a carga de doença e morte é mais elevada, ou seja, nos países de baixa e média renda, encontram-se 80% dos consumidores dos produtos derivados do tabaco (*World Health Organization*, 2015).

Em nosso país, o uso de tabaco só é menor que o consumo de álcool. Conforme o II Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas, a prevalência do uso na vida, no ano e no mês de produtos derivados do tabaco correspondeu a 44%, 19,2% e 18,4%, respectivamente (Carlini, Galduróz e Noto, 2007). Segundo o Instituto Nacional do Câncer, a prevalência do tabagismo no Brasil é 17,5% sendo que a maioria faz uso diário de produtos de tabaco fumado (Instituto Nacional do Câncer, 2011). Dados do maior sistema de vigilância global de saúde pública indicam que a população brasileira abrange 2,8% dos adultos fumantes do mundo e que a prevalência é maior em

homens do que em mulheres (21,7% versus 13,4%, respectivamente) (Asma e cols., 2015).

Atualmente o uso do tabaco é responsável por mais de seis milhões de falecimentos ao ano no mundo e, conforme previsão, poderá atingir mais de oito milhões em 2030. A OMS alerta que mais da metade dos usuários de tabaco morrerão de alguma doença relacionada ao tabagismo (*World Health Organization*, 2011). Durante o século XX, o tabaco causou a morte de cem milhões de pessoas no mundo todo e poderá matar até um bilhão de pessoas no século XXI caso não sejam tomadas medidas eficazes para controlar o consumo (*World Health Organization*, 2008). No Brasil, calcula-se que, de 1970 a 2000, um milhão de mortes ocorreram em função do tabagismo, a maioria por doenças cardiovasculares (Achutti, 2001).

No entanto, essas estimativas não se referem apenas ao tabagismo ativo. A OMS estima que um terço da população mundial adulta seja exposto regularmente à fumaça de cigarro de forma involuntária. Enquanto há 1,5 bilhão de pessoas expostas passivamente à fumaça de cigarro em suas casas e 392 milhões em seus locais de trabalho (Asma e cols., 2015), 600 mil mortes de não fumantes resultam da exposição ao tabagismo passivo. Destas mortes, 31% ocorrem em crianças, enfatizando o dano que 40% desta população (equivalente a 700 milhões de crianças) ficam expostas regularmente em suas casas (*World Health Organization*, 2010). Apesar de nos últimos anos, devido às leis de restrição ao fumo, se observar uma diminuição de indivíduos expostos ao tabagismo passivo, a exposição permanece alta em crianças em situações mais vulneráveis (Homa e cols., 2015).

O tabagismo involuntário ocorre em todos os locais coletivos onde é permitido fumar. No Brasil, 15 milhões de não fumantes são expostos diariamente à fumaça de cigarro em suas casas e nove milhões em seus locais de trabalho (Instituto Nacional do Câncer, 2011). Uma subamostra da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios (PNAD), realizada em 2008, revelou que dos 25.005 não fumantes incluídos na amostra, 16,1% eram expostos diariamente ou semanalmente à fumaça de cigarro em suas residências. Dos que trabalhavam em ambientes fechados (10.933 indivíduos), 67% eram expostos em seu local de trabalho (Passos, Giatti e Barreto, 2011). Mesmo em locais em que o fumo é restringido legalmente ou incoerente com suas atividades, a exposição à fumaça de produtos derivados do tabaco foi relatada pelos frequentadores de restaurantes (32%), serviços de saúde (10%) e transporte público (9%) (Asma e cols., 2015).

A literatura a respeito dos efeitos do tabagismo involuntário sobre a saúde dos não fumantes está repleta de dados preocupantes. Nos Estados Unidos, ocorrem aproximadamente 41 mil mortes anuais em que o tabagismo passivo é o principal contribuidor (*U.S. Department of Health and Human Services*, 2014). Uma metanálise concluiu que não fumantes com 65 anos de idade que convivem com tabagistas têm 30% mais chance de sofrerem de doença cardíaca isquêmica em comparação aos não expostos (Law, Morris e Wald, 1997). Indivíduos expostos simultaneamente em casa e no local de trabalho apresentam mais que o dobro de chance de infarto agudo do miocárdio sendo que a exposição no trabalho é o que mais atribui valor ao risco (Panagiotakos e cols., 2002). Mulheres adultas não fumantes expostas regularmente à fumaça de cigarro apresentaram quase o dobro de chance de

desenvolver doença coronariana (Kawachi e cols., 1997). Além disso, esse risco é mais elevado quanto maior o tempo e o número de cigarros a que se é exposto (He e cols., 1999). Em virtude da poluição tabagística ambiental (PTA), ocorrem 3.000 óbitos anualmente por câncer de pulmão e a chance de neoplasia é 35% maior nos fumantes passivos do que nos não expostos (*U.S. Environmental Protection Agency*, 1992). O tabagismo passivo também está associado a maior risco de diabetes *mellitus* tipo 2 (Eze e cols., 2014), sinusite (Hur, Liang e Lin, 2014), tuberculose (Dogar e cols., 2015) e câncer de mama (Johnson e Glantz, 2008), entre outras doenças. Há evidências suficientes para afirmar que o tabagismo passivo provoca doenças e mortes prematuras em crianças e adultos e que não existem níveis seguros de exposição à fumaça de cigarro (*U.S. Department of Health and Human Services*, 2006).

1.2. Poluição Tabagística Ambiental (PTA)

A contaminação do ar pelos constituintes dos produtos derivados do tabaco ocorre durante a queima e a liberação da fumaça desses produtos. Qualquer produto que gera fumaça contribui para a formação da PTA, no entanto, como o cigarro é o produto mais utilizado, sua contribuição para esse tipo de poluição é de particular relevância. Muitas das substâncias prejudiciais à saúde que existem no ar em ambientes internos estão presentes na fumaça de cigarro e são periodicamente revistas e incluídas em consensos baseados em evidências científicas para a promoção da qualidade do ar (*World Health Organization*, 2010). Na década de 70, a OMS considerou que a poluição pela fumaça de cigarro era responsável por 80% de todas as fontes de poluição e

que as pessoas passavam mais de 80% de seu tempo respirando ar poluído com nicotina proveniente da fumaça de cigarro e outros produtos derivados do tabaco (*World Health Organization*, 1979). A fumaça de cigarro gera até dez vezes mais material particulado que a exaustão de um carro a diesel (Invernizzi e cols., 2004).

Partículas e gases são formados pela queima do tabaco e, em menor parte, pela queima do papel e dos aditivos do cigarro (Silva, 2004; *U.S. Department of Health and Human Services*, 2006). Com a ocorrência de reações químicas, como combustão e pirólise, a fumaça dos produtos derivados do tabaco libera mais de 5.300 substâncias as quais o fumante e demais pessoas ao redor ficam expostas (*International Agency for Research on Cancer*, 2012). A fumaça de cigarro é constituída por duas fases fundamentais: 1) a fase gasosa ou de vapor, que representa 60% do total e é formada por nitrogênio, monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO₂), amônia, formaldeído, acetaldeído e cetonas, entre outros; e 2) a fase particulada ou dispersa, composta por nicotina e alcatrão (condensado de toda a fase particulada e todos os componentes condensáveis da fase gasosa) (Silva, 2004).

A queima de um cigarro gera dois tipos de fumaça: a corrente primária (*mainstream*) e a corrente secundária ou paralela (*sidestream*). A corrente primária é exalada pelos fumantes durante as tragadas, enquanto a corrente secundária é a fumaça que evola da ponta acesa do cigarro (Jenkins, Guerin e Tomkins, 2000). As correntes primária e secundária liberadas no ambiente misturam-se e diluem-se no ar para formar a PTA, no entanto, a corrente secundária é seu principal constituinte (Woodward e Al-Delaimy, 1999)

compondo 85% da fumaça do cigarro liberada no ambiente (*International Agency for Research on Cancer*, 2004; Hang e cols., 2013). A corrente secundária é responsável por quase todos os constituintes da fase de vapor e cerca de metade do material particulado (*U.S. Environmental Protection Agency*, 1992). Qualitativamente, as duas correntes apresentam composições similares (*U.S. Department of Health and Human Services*, 2006), porém a corrente secundária apresenta concentrações maiores de muitas substâncias tóxicas, pois há menor degradação de muitas substâncias uma vez que essa corrente não passa pelo filtro e é gerada à baixa temperatura (200°C a 600°C em contraste a 950°C da corrente primária) resultando na queima incompleta das substâncias (Geiss e Kotzias, 2007; Moir e cols., 2008). Algumas das substâncias encontradas em maior concentração na corrente secundária são amônia, benzeno, CO, nicotina e os carcinógenos 2-naftilamina, 4-aminobifenil, N-nitrosamina, antraceno e benzopireno (*U.S. Department of Health and Human Services*, 1986). Alguns compostos estão presentes em concentrações dez vezes maiores na corrente secundária em comparação à corrente primária (*U.S. Department of Health and Human Services*, 2006).

A PTA está em constante e dinâmica mudança. As características e as concentrações das muitas substâncias que a compõem mudam com o tempo e com a distância que percorrem no ambiente, diluindo-se no ar ou sofrendo reações químicas ou fotoquímicas, assim a PTA não pode ser explicada simplesmente pela composição das correntes primária e secundária (Rickert, 1999). As partículas mudam de tamanho e composição à medida que impactam as superfícies ou que a fração gasosa volatiliza ou é adsorvida (Schick e Glantz, 2006; *U.S. Department of Health and Human Services*, 2006).

A concentração das substâncias depende do tamanho do ambiente, tempo transcorrido durante a produção da fumaça, quantidade de cigarros e frequência da troca de ar ambiente (Okoli, Kelly e Hahn, 2007). A fumaça do cigarro é distribuída naturalmente pela ventilação do ar e, 30 minutos após acender um cigarro, mesmo um ambiente distante já apresenta níveis detectáveis de material particulado fino (e, portanto, inalável) proveniente da fumaça (Van Deusen e cols., 2009).

Muitas outras substâncias estão presentes na PTA, mesmo que não sejam exclusivamente provenientes da fumaça de produtos do tabaco: material particulado fino (menor que $2,5\ \mu\text{m}$ – $\text{PM}_{2,5}$), compostos orgânicos voláteis (COVs), CO, óxidos de nitrogênio, benzeno, formaldeído, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs), metais pesados e N-nitrosaminas (Jenkins, Guerin e Tomkins, 2000). Há pelo menos 250 substâncias tóxicas ou carcinogênicas na PTA (*U.S. Department of Health and Human Services*, 2006). Muitas dessas substâncias são conhecidos carcinógenos, e a Agência Internacional para Pesquisa do Câncer classificou o próprio tabagismo passivo como carcinógeno do Grupo 1 (reconhecidamente cancerígeno para o homem) (*International Agency for Research on Cancer*, 2004).

Os prejuízos da fumaça de cigarro já eram conhecidos pela indústria tabagística desde os anos 1980, no entanto, eram mantidos em segredo e só se tornaram públicos a partir de 2000 com a quebra de sigilo dos documentos e experimentos que realizavam internamente. Em modelos animais, vários experimentos comprovaram que, em comparação à corrente primária, a fumaça secundária recém-emitida provocou maiores concentrações de material particulado, nicotina, cotinina e carboxiemoglobina no sangue. Além disso, o

condensado da corrente secundária foi capaz de provocar maior dano às células epiteliais do trato respiratório e seis vezes mais tumores em roedores do que o condensado da corrente primária (Schick e Glantz, 2005).

Estudos sobre a composição da PTA em ambiente real são de difícil interpretação devido à presença de fontes adicionais dos muitos poluentes (*World Health Organization*, 2010). Assim muitos estudos foram realizados em ambientes controlados, com a utilização de câmaras e bombas para simular o ato de fumar. Mesmo não refletindo situações na vida real, esses estudos forneceram informações úteis para a compreensão dessa forma de exposição. Outro limitador importante refere-se à falta de critérios padronizados para quantificar essa exposição. Além disso, os estudos utilizaram diferentes marcadores em sua metodologia (*International Agency for Research on Cancer*, 2004). Isso se deve principalmente à natureza complexa da PTA, impossibilitando eleger um único componente universalmente aceito como indicador da magnitude e toxicidade.

Marcadores ideais da PTA devem ser específicos da fumaça de cigarro ou sofrer pouca interferência de outras fontes, estar presentes em quantidade suficiente para permitir a detecção no ar mesmo quando a exposição é baixa, exibir emissão similar entre os diferentes produtos derivados do tabaco e apresentar-se proporcionalmente aos componentes da PTA que causam riscos à saúde (Rickert, 1999; Jenkins, Guerin e Tomkins, 2000; Geiss e Kotzias, 2007). Na impossibilidade de encontrar um marcador que satisfaça todos os pressupostos, diferentes substâncias são comumente utilizadas nos estudos.

A nicotina é o marcador mais utilizado, já que é liberada em grandes quantidades durante a combustão e é específica dos produtos derivados do

tabaco. Está presente na fase particulada da corrente principal e dilui-se na corrente secundária, pois volatiliza e é um dos principais constituintes da fase gasosa da PTA (Geiss e Kotzias, 2007). No entanto, possui baixa pressão de vapor e apresenta maior afinidade a superfícies. Isso confere-lhe a capacidade de depositar-se em móveis e demais superfícies do ambiente e de ser posteriormente reemitida para o ar aumentando a concentração de nicotina mesmo na ausência de nova exposição à fumaça (Jaakkola e Jaakkola, 1997; Matt e cols., 2011b). A nicotina presente na corrente secundária encontra-se principalmente na forma não ionizada, em função do caráter menos ácido em relação à corrente primária. Isso favorece a absorção oral ou nasal da nicotina encontrada na corrente secundária pelo organismo (*U.S. Department of Health and Human Services*, 1986). Como a PTA é principalmente composta pela corrente secundária, boa parte da nicotina que a compõe é passível de ser absorvida.

A concentração de nicotina na PTA foi similar quando diferentes marcas de cigarros de diferentes países foram fumadas em um ambiente de 45m³, variando de 101 a 154 µg/m³ (Nelson e cols., 1998). Em locais em que era proibido fumar, foi possível detectar e quantificar nicotina no ar do ambiente, mesmo esta sendo de 18 a 25 vezes menor do que em ambientes onde o tabagismo era permitido (Bratan e cols., 2014). Estudo revisando trabalhos sobre o tema em quase 20 anos concluiu que a concentração de nicotina na PTA em locais sem restrição ao fumo (14 a 65,5 µg/m³) ultrapassou o limite estabelecido como risco para mortalidade por câncer de pulmão de 1 em 1000 pela Administração de Segurança e Saúde Ocupacional - OSHA (6,8 µg/m³) (Rickert, 1999; López e Nebot, 2003). Em geral, mesmo em locais públicos, a

concentração de nicotina na PTA é menor em áreas em que o fumo é proibido, mas não é inexistente (Nebot e cols., 2005). Na América Latina, os países com maiores prevalências de tabagismo foram os que apresentaram maior concentração de nicotina na PTA em locais de uso coletivo. A maior concentração de nicotina ($13,3 \mu\text{g}/\text{m}^3$) nesse estudo foi encontrada no espaço de não fumantes de um restaurante localizado um andar acima da área de fumantes (Navas-Acien e cols., 2004).

$\text{PM}_{2,5}$ são partículas finas o suficiente para serem respiráveis e atingir a região de troca gasosa das vias aéreas inferiores. Na PTA, são menores do que na corrente primária e podem compreender de um terço a até mais de dois terços das partículas suspensas respiráveis no ar de ambientes internos (Jenkins, Guerin e Tomkins, 2000). Sua mensuração pode ser realizada por meio de leitura direta (utilizando uma bomba que retira o ar e quantifica em tempo real) ou amostragem ativa (utilizando-se filtros e posterior análise gravimétrica). Outros métodos incluem ultravioleta, fluorescência e solanesol (Woodward e Al-Delaimy, 1999; Florescu e cols., 2009; Apelberg e cols., 2013). A queima de três cigarros em uma garagem (60m^3) resultou em $319 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de $\text{PM}_{2,5}$ uma hora depois da queima (Invernizzi e cols., 2004). Mesmo em ambientes externos, foi possível verificar diferença na concentração dessas partículas em locais em que era permitido fumar em comparação aos que não era permitido ($8,32$ a $124 \mu\text{g}/\text{m}^3$ versus $4,6$ a $17,8 \mu\text{g}/\text{m}^3$, respectivamente) (Sureda e cols., 2013). Para comparação, o padrão anual de qualidade do ar recomendado pelo OMS para concentração média de $\text{MP}_{2,5}$ equivale a $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (World Health Organization, 2006). Após fumar, o fumante continua a expelir material particulado no ar exalado por cerca de 90 segundos,

contribuindo substancialmente para a PTA (Invernizzi e cols., 2007). $PM_{2,5}$ são associadas a maior risco de morte por doenças respiratórias e cardiovasculares (*Institute of Medicine*, 2010).

O produto da pirólise da nicotina, 3-etinilpiridina (3-EP), pode ser detectado no ar e ser utilizado como um marcador da PTA. A 3-EP é emitida em grande quantidade, porém é mais volátil que a nicotina (sendo um bom representante dos compostos voláteis) e não tem relação linear com a quantidade de PTA (López e Nebot, 2003; Geiss e Kotzias, 2007). A concentração de CO é facilmente medida e apresenta alta correlação com o número de cigarros fumados, no entanto, tem como principal desvantagem sua baixa especificidade, uma vez que outras fontes de poluição também contribuem para elevar sua concentração (Dhar, 2004). A concentração média de CO presente na PTA gerada por diferentes marcas de cigarros de diferentes países foi igual a 6,6 $\mu\text{L/L}$ (Nelson e cols., 1998), bem acima da concentração de fundo em áreas sem fonte de poluição (0,05 a 0,12 ppm) e do limite estabelecido pela OMS para a concentração de CO em uma hora para qualidade do ar (0,03 ppm) (*World Health Organization*, 2000; *World Health Organization*, 2006). Os HAPs também podem ser utilizados para mensurar a concentração da PTA, porém são emitidos em baixas quantidades e não são específicos dos produtos de tabaco. Semelhantemente à 3-EP, parece não haver uma relação linear entre a concentração de HAPs e da PTA (López e Nebot, 2003).

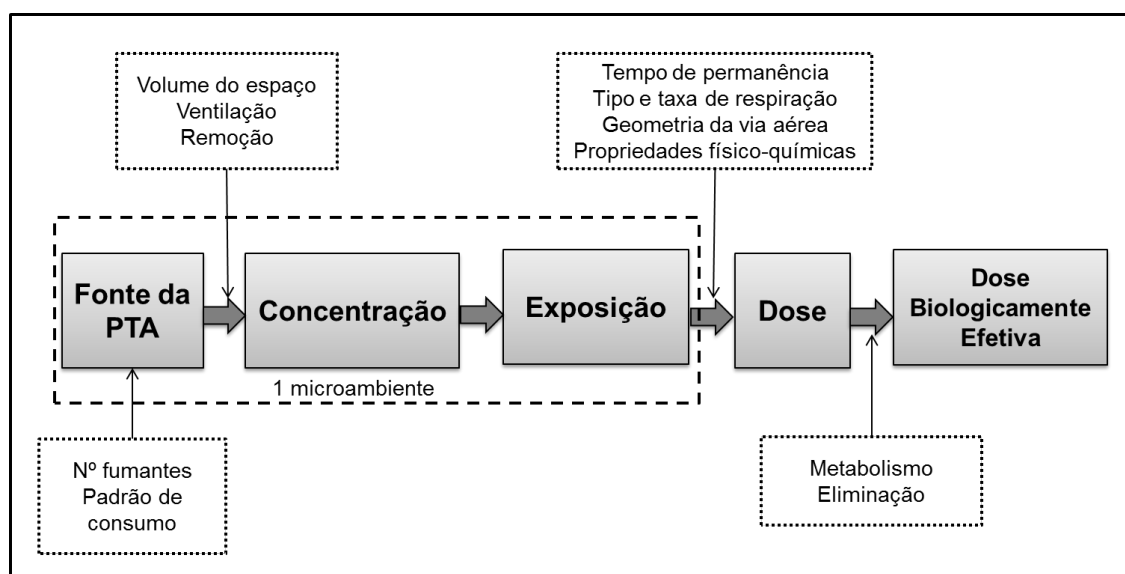
Todos esses marcadores são utilizados para estudar tanto a exposição ambiental quanto individual e são úteis em estudos epidemiológicos e para avaliar os programas de controle ao tabagismo passivo. No entanto, pode ser

mais útil avaliar a exposição biológica e os riscos à saúde, sendo mais interessante utilizar um biomarcador. CO no ar expirado, carboxiemoglobina e tiocianato são úteis para distinguir fumantes de não fumantes ou avaliar a exposição de não fumantes à fumaça de produtos do tabaco, porém não são específicos. A dosagem em fluidos biológicos (ou cabelo, em alguns casos) de nicotina, cotinina, nitrosaminas e seus metabólitos e adutos de DNA em fluidos biológicos são os biomarcadores mais utilizados para esse tipo de avaliação (Hecht e cols., 1994; Jaakkola e Jaakkola, 1997; López e Nebot, 2003; Dhar, 2004).

A mensuração da exposição à PTA segue o modelo microambiental. Um microambiente é um espaço onde as concentrações dos poluentes de interesse são uniformes ou com características constantes, como o quarto ou outro cômodo da casa, o local de trabalho, o carro ou o transporte público (Castro, Gouveia e Escamilla-Cejudo, 2003). A estimativa de exposição leva em conta a concentração de um poluente em cada microambiente e o tempo de permanência em cada um deles (*International Agency for Research on Cancer*, 2012). Há muitos fatores que interferem na exposição de um indivíduo à PTA e na dose biologicamente efetiva (Jaakkola e Jaakkola, 1997). A intensidade da fonte de exposição depende do número de fumantes ativos e seu padrão de consumo. O volume do espaço, o sistema de ventilação e outros mecanismos que influenciam a remoção ou degradação dos compostos da fumaça de cigarro modificam a concentração da PTA no microambiente. Além disso, a dose inalada depende do tipo (nasal ou oral) e da taxa de respiração e da geometria das vias aéreas (área de superfície das mucosas e diâmetro dos vasos sanguíneos). A dose biologicamente efetiva ainda sofre influência dos

processos de metabolismo e eliminação dos diferentes compostos que apresentam variabilidade interindividual (Figura 1). Além disso, as propriedades físico-químicas das substâncias da fumaça determinam a maneira como serão absorvidas. Gases altamente solúveis e reativos, como o formaldeído, são adsorvidos no trato respiratório superior enquanto os gases menos solúveis e inertes, como o CO, alcançam os alvéolos e são sistematicamente absorvidos (Jenkins, Guerin e Tomkins, 2000).

Figura 1 – Exposição à PTA e fatores ambientais e individuais que afetam a dose biologicamente ativa.



Fonte: adaptado de Jaakkola e Jaakkola (1997).

1.3. *Thirdhand Smoke* (THS)

A fumaça fresca liberada durante a queima do cigarro dura de 90 a 120 minutos no ambiente interno (Schick e Glantz, 2006). No entanto, muito da fumaça que constitui a PTA muda tanto química quanto fisicamente (Sleiman e cols., 2010a; Petrick, Svidovsky e Dubowsky, 2011) principalmente com o passar do tempo (Schick e Glantz, 2006). A partir de 2009, a exposição aos componentes residuais da fumaça dos produtos derivados do tabaco que

permanecem no ambiente após a extinção da chama passou a ser chamada de *thirdhand smoke* (THS) (Winickoff e cols., 2009), apesar de ser mencionado sem muita ênfase em artigo no ano anterior (Matt e cols., 2008a). Outros termos possíveis são *residual tobacco smoke* e *aged tobacco smoke* (Matt e cols., 2011b), reforçando a característica de permanência e envelhecimento da fumaça mesmo após a fumaça se dissipar. Logo que a fumaça de produtos derivados do tabaco começa até poucas horas depois, fumaça e THS coexistem ocorrendo a predominância do THS à medida que a fumaça se dissipa e é removida pela ventilação (Matt e cols., 2011b).

Uma definição realizada por Burton (2011) e difundida por outros pesquisadores descreve o THS em três R's: poluentes da fumaça dos produtos derivados do tabaco que ficam retidos no ambiente (*remain*) e são reemitidos para o ar (*re-emitted*) ou reagem com oxidantes e outros compostos no ambiente para formar poluentes secundários (*react*). O tabagismo passivo deixa de ser somente a exposição involuntária à fumaça de cigarro e passa a incorporar a exposição às substâncias que permanecem ou são formadas no ambiente (Protano e Vitali, 2011). Os resíduos da fumaça podem ser ressuspensos no ar e provocar contaminação por inalação ou podem permanecer na superfície em que foram depositados e ocasionar contaminação oral ou dérmica (Petrick, Svidovsky e Dubowsky, 2011).

Apesar de ser encarado com ceticismo por algumas pessoas (Matt e cols., 2011b; Tuma, 2010), 61% de quase 1.500 adultos questionados reconheceram que o THS poderia ser prejudicial à saúde das crianças, enquanto 22% não souberam opinar a respeito. A percepção desse risco foi menor que a do tabagismo involuntário (93,2%), no entanto, apresentou

associação positiva com a adoção de práticas de restrição ao fumo em suas casas (Winickoff e cols., 2009). Outro estudo realizado alguns anos mais tarde verificou que 91% dos pais que fumavam acreditavam que o THS poderia prejudicar seus filhos, no entanto, os que fumavam mais eram menos propensos a considerar o THS prejudicial (Drehmer e cols., 2012). Em comunidades de baixa renda, muitos desconheciam o termo ao participar de um programa para a promoção de ambientes livres da fumaça de cigarro, mas após serem esclarecidos sobre a existência do THS, percebeu-se que mais participantes se preocuparam com a possibilidade do THS prejudicar as crianças do que com o tabagismo involuntário provocar doenças cardíacas (Escoffery e cols., 2013). Latino-americanos morando em prédios residenciais da Califórnia desconheciam o termo THS e reconheceram que, apesar de proibirem o tabagismo em suas residências, não eram capazes de evitar eficazmente a exposição à fumaça de cigarro proveniente de seus vizinhos (Rendón e cols., 2015).

O estudo de Winickoff e cols. (2009) atraiu a atenção pelo uso do termo como objeto de pesquisa pela primeira vez. Quase na mesma época, apenas mais três estudos se propuseram a divulgar achados inéditos sobre o tema, ressaltando a permanência da nicotina no ambiente ou a formação de substâncias carcinogênicas (Sleiman e cols., 2010a; Matt e cols., 2011a; Petrick, Svidovsky e Dubowsky, 2011). Mais artigos foram publicados no caráter de editorial, correspondência ou comentário de especialistas republicando os dados anteriores (Dreyfuss, 2010; Tuma, 2010; Burton, 2011; Protano e Vitali, 2011; Schick, 2011; Tillett, 2011; Ganjre e Sarode, 2016). A primeira publicação em língua portuguesa foi realizada em 2015 como uma

carta ao editor (Oliveira e cols., 2015). Mais estudos foram desenvolvidos e adicionaram novas evidências ao tema no decorrer dos anos, mas até o momento, pouco mais de 50 artigos resultam da busca pelo termo *thirdhand smoke* no banco de dados *Pubmed*.

1.3.1. A retenção do THS

A primeira publicação de que a nicotina permanecia na poeira de casas de fumantes data há mais de 20 anos (Hein e cols., 1991). Há pouco mais de dez anos, Matt e cols. (2004) reportaram que, mesmo em ambientes em que mães tabagistas não fumavam, como o quarto das crianças, era possível encontrar nicotina em quantidades significativas na poeira do cômodo, cerca de cinco a sete vezes maior do que em casas de não fumantes. Esse dado é relevante, uma vez que a ingestão de poeira por crianças equivale a 250 mg por dia, mais que o dobro do que ocorre nos adultos.

Um único cigarro fumado em um dia em algum ambiente pode expor muitas outras pessoas aos toxicantes da fumaça por muitos dias e até meses (Escoffery e cols., 2013). O primeiro estudo a corroborar a permanência do THS foi realizado por Matt e cols. (2011a) em casas alugadas habitadas anteriormente por fumantes. Mesmo após dois meses em que as casas ficaram desocupadas e um mês depois que os novos residentes não fumantes passaram a morar nas casas, foi possível detectar nicotina no ar, na poeira e nas superfícies dos móveis do quarto e da sala de estar. Houve uma redução considerável nessas medições, porém a redução não chegou a atingir os índices encontrados nas casas anteriormente ocupadas por não fumantes. Não só a persistência do THS foi comprovada nesse estudo, como também a

exposição dos novos moradores: nicotina na ponta dos dedos de não fumantes que passaram a morar nas casas anteriormente habitadas por fumantes foi sete vezes maior bem como o nível urinário de cotinina foi três vezes maior do que quando os residentes anteriores eram não fumantes (Figura 2).

Figura 2 – Concentração de nicotina em casas alugadas anteriormente ocupadas por fumantes e não fumantes e posteriormente habitadas por não fumantes.

Antigos Moradores Novos Moradores	
 Nicotina no ar <i>Sala de estar:</i> 1,86 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ <i>Quarto:</i> 1,44 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Nicotina em superfícies <i>Sala de estar:</i> 98,7 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ <i>Quarto:</i> 50,1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ Nicotina na poeira <i>Sala de estar:</i> 39,6 $\mu\text{g}/\text{g}$ <i>Quarto:</i> 30,7 $\mu\text{g}/\text{g}$ Nicotina no dedo: 660,21 ng Cotinina urinária: 5,42 ng/mL	Nicotina no ar <i>Sala de estar:</i> 0,2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ <i>Quarto:</i> 0,12 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Nicotina em superfícies <i>Sala de estar:</i> 10,0 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ <i>Quarto:</i> 7,5 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ Nicotina na poeira <i>Sala de estar:</i> 10,9 $\mu\text{g}/\text{g}$ <i>Quarto:</i> 11,0 $\mu\text{g}/\text{g}$ Nicotina no dedo: 5,19 ng Cotinina urinária: 0,45 ng/mL
 Nicotina no ar: 0,02 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Nicotina em superfícies 1,6 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ Nicotina na poeira: 2,9 $\mu\text{g}/\text{g}$ Nicotina no dedo: 1,35 ng Cotinina urinária: 0,15 ng/mL	Nicotina no ar: 0,14 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ Nicotina em superfícies: 1,5 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ Nicotina na poeira: 2,3 $\mu\text{g}/\text{g}$ Nicotina no dedo: 0,75 ng Cotinina urinária: 0,13 ng/mL

Fonte: Matt e cols. (2011a).

As medidas de ambientes nas casas ocupadas primeiramente por não fumantes foram obtidas na sala de estar.

A nicotina também se acumula em veículos. Em uma cabine de caminhão, a limpeza da parte frontal do porta-luvas resultou em 0,6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ de nicotina enquanto a exposição de uma tira de papel de tamanho equivalente durante três dias em que foram fumados 34 cigarros gerou a sorção de 1,4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ da substância (Sleiman e cols., 2010a). Em carros de aluguel em San Diego (EUA), mesmo naqueles designados para não fumantes, foi possível

detectar nicotina no ar, na poeira e nas superfícies do interior dos veículos, ficando claro que a política das empresas falha em proteger os indivíduos não fumantes do tabagismo passivo. As concentrações de nicotina no ar, na poeira e nas superfícies internas foram duas a três vezes maiores nos carros em que era permitido fumar, sendo que na poeira e nas superfícies, quanto mais velho e maior a quilometragem do carro, maior era a concentração (Matt e cols., 2013). A Tabela 1 apresenta a quantidade de nicotina encontrada no estudo. Para comparação, são apresentadas também informações quanto à presença de contaminação residual da fumaça de cigarro em carros particulares de não fumantes com restrição ao fumo colocados à venda (Matt e cols., 2008b). A nicotina, como um dos poluentes da fumaça de cigarro, acumula-se ao longo do tempo nas superfícies e na poeira de automóveis mesmo que o fumo ocorra apenas ocasionalmente. Quanto maior a quantidade de cigarros fumados no interior do veículo, maior é a concentração de nicotina no ar e na superfície de carros à venda. Os procedimentos de aumentar a ventilação e manter o cigarro próximo à janela têm pouco ou nenhum impacto ao longo do tempo, reduzindo os níveis apenas enquanto o cigarro está aceso (Fortmann e cols., 2010).

Tabela 1 – THS em carros de aluguel e em carros particulares

	Carros de aluguel		Particulares
	Não fumante	Fumante	Não fumante
Nicotina no ar ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	0,024 (0,008-0,063)	0,05 (0,018-0,086)	0,01 (0-0,01)
Nicotina em superfícies ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	0,2 (0-1,2)	0,9 (0,3-2,9)	0 (0-0,07)
Nicotina na poeira ($\mu\text{g}/\text{g}$)	8,1 (4,9-28,6)	33,2 (16,8-52,1)	3,1 (1,5-6,0)

Fonte: adaptado de Matt e cols. (2013) e Matt e cols. (2008b).

Os dados são apresentados como mediana (percentil 25 - percentil 75).

Estudo conduzido em hotéis (Tabela 2) demonstrou que restringir apenas alguns ambientes à fumaça de cigarro não protege as pessoas da exposição. Quartos de não fumantes em hotéis sem restrição completa ao fumo mostraram maiores níveis de nicotina no ar, na cabeceira e na face externa da porta do quarto em comparação com hotéis 100% livres da fumaça de cigarro. Os hóspedes desses quartos também apresentaram maior quantidade de nicotina no dedo e de cotinina na urina (Matt e cols., 2014). Esses dados evidenciam que o THS é ubíquo uma vez que não é limitado ao espaço em que o produto de tabaco foi fumado (Ferrante e cols., 2013), movendo-se facilmente por meio do sistema de ventilação, corredores, encanamento, dutos de ar, janelas e portas.

Tabela 2 – THS em hotéis

	Hotéis 100% livres da fumaça de cigarro	Hotéis sem restrição completa ao fumo	
		Quarto de não fumantes	Quarto de fumantes
Nicotina no ar ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	0,023 (0,008 – 0,05)	0,036 (0,013 – 0,118)	0,703 (0,202 – 1,609)
Nicotina na superfície ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	1,2 (0 - 3,4)	3,3 (0 - 10,3)	77,0 (7,3 - 353,2)
Nicotina no dedo (ng)	2,5 (0 - 10,9)	13,6 (0 - 41,3)	93,7 (44,2 - 251,1)
Cotinina urinária (ng/mL)	0,05 (0 - 0,25)	0,1 (0 - 0,17)	0,64 (0,23 - 0,97)

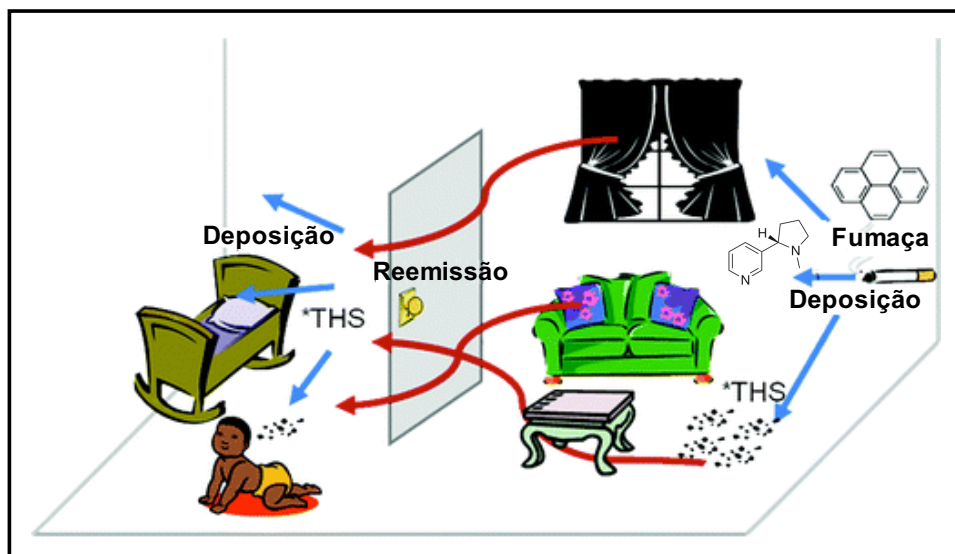
Os dados são apresentados como mediana (percentil 25 - percentil 75).

Fonte: Matt e cols., 2014

Mesmo em casas de fumantes que não permitem fumar dentro das residências, há níveis consideráveis de nicotina nas superfícies que continuam se acumulando ao longo do tempo (Northrup e cols., 2015a). Quartos de unidade de tratamento intensivo neonatal, em que o cuidador da criança era

fumante, apresentaram níveis consideráveis de nicotina na superfície dos móveis alcançando $34,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Além disso, essas crianças apresentaram níveis detectáveis de metabólito de nicotina na urina (Northrup e cols., 2015b). A própria pessoa pode ser um veículo desses poluentes, uma vez que podem ser adsorvidos nas roupas, pele e cabelos e posteriormente depositados nas superfícies de outros ambientes e provocar a contaminação de outras pessoas que nem sequer tiveram contato com a fumaça de cigarro. Essa característica do THS tem sido chamada de ‘efeito gafanhoto’ (Figura 3) fazendo alusão à capacidade que seus constituintes têm de ‘saltarem’ de um ambiente para outro (Lioy, 2006; Hoh e cols., 2012).

Figura 3 – ‘Efeito-gafanhoto’ do THS.



Fonte: Retirada e adaptada de Hoh e cols. (2012)

Em um estudo realizado na Espanha, todas as 24 casas de não fumantes apresentaram níveis quantificáveis de nicotina na poeira (mediana = $2,3 \mu\text{g}/\text{g}$; Intervalo interquartil IIQ = $1,5$ a $3,3 \mu\text{g}/\text{g}$), porém foram dez vezes menores do que nas 22 casas de fumantes (mediana = $26 \mu\text{g}/\text{g}$; IIQ = 17 a $62 \mu\text{g}/\text{g}$). Nas casas de fumantes, mesmo que não fosse fumado no interior do

domicílio, houve correlação entre a concentração de nicotina e o número de cigarros fumados pelos moradores (Ramírez e cols., 2014). Esse achado reforça que os componentes da fumaça de cigarro são liberados no ambiente por outras vias que não envolvem a corrente primária e a secundária.

Qualquer produto derivado do tabaco que gera fumaça pode contribuir para a formação do THS. Quartos de crianças em casas em que o narguilé era a única forma de uso do tabaco apresentaram maiores níveis de nicotina no ar (Média geométrica MG = $0,17 \mu\text{g}/\text{m}^3$; Intervalo de confiança 95% IC95 = 0,02 a $0,35 \mu\text{g}/\text{m}^3$) e nas superfícies (MG = $44,06 \mu\text{g}/\text{m}^2$; IC95 = 16,9 a $112,6 \mu\text{g}/\text{m}^2$) em comparação a casas de não fumantes (ar: MG = $0,01 \mu\text{g}/\text{m}^3$; IC95 = 0,01 a $1,02 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Superfícies: MG $1,36 \mu\text{g}/\text{m}^2$; IC95 = 0 a $6,6 \mu\text{g}/\text{m}^2$). Mesmo que o uso do narguilé acontecesse poucas vezes na semana ou no mês, os níveis de nicotina nas superfícies do quarto também foram elevados (MG $33,3 \mu\text{g}/\text{m}^2$; IC95 = 9,5 a $111,2 \mu\text{g}/\text{m}^2$). Semelhante a outros estudos, a exposição a níveis mais elevados de nicotina no THS foi legitimada pela maior concentração de cotinina na urina das crianças, que foi quase cinco vezes maior naquelas que viviam com usuários de narguilé em comparação àquelas que conviviam com não fumantes (GM = 2,1 IC95 = 1,1 a 3,6 ng/mg creatinina *versus* GM = 0,4 IC95 = 0,2 a 0,8 ng/mg creatinina, respectivamente) (Kassem e cols., 2014).

A persistência de nicotina também foi analisada experimentalmente. Tecidos de algodão e poliéster foram expostos continuamente à fumaça de cigarro por um ano e por oito meses, respectivamente. Para analisar o efeito do envelhecimento sobre a fumaça impregnada nos tecidos, as amostras só foram analisadas 11, 16 e 19 meses após a exposição. Apenas no algodão foi detectada nicotina em quantidades consideráveis ($105,8 \mu\text{g}/\text{g}$, $112,9 \mu\text{g}/\text{g}$ e

69,9 µg/g tecido, respectivamente). O THS tem a capacidade de ficar retido em fibras naturais por um ano e meio após a exposição à fumaça (Bahl e cols., 2014). Até mesmo cigarros eletrônicos contendo refil com solução de nicotina aumentaram a quantidade da substância depositada em superfícies em um ambiente controlado. Nos azulejos do chão desse ambiente, local em que mais se acumulou nicotina, a quantidade passou de praticamente zero antes da utilização dos cigarros eletrônicos para 205 µg/m² após 100 baforadas (Goniewicz e Lee, 2015).

1.3.2. A composição do THS

A identificação e quantificação dos compostos do THS dependem de uma coleta de material representativa. Os mesmos marcadores para PTA podem ser utilizados para estimar a quantidade de THS presente no ambiente. Como 80 a 90% da nicotina liberada na queima de um cigarro é adsorvida nas superfícies (Daisey, Mahanama e Hodgson, 1998), a limpeza com discos ou lenços de 100% algodão tem sido utilizada como um método simples que se correlaciona bem com os níveis de nicotina no ar e na poeira (Matt e cols., 2004; Quintana e cols., 2013). A coleta também pode ser realizada por meio de tiras de papel (substrato de celulose) ou pedaços de diferentes tecidos, como algodão, poliéster, seda, acetato de celulose e linho expostos à fumaça de cigarro (Sleiman e cols., 2010a; Ueta e cols., 2010; Fleming 2012; Bahl e cols., 2014). Dependendo da substância analisada, um material pode ter melhor desempenho do que outro, pois a capacidade de adsorção e dessorção sofre influência da volatilidade e polaridade da substância, da propriedade química da superfície do material e da umidade relativa e taxa de troca do ar do

ambiente (Ueta e cols., 2010; Petrick, Svidovsky e Dubowsky, 2011; Bahl e cols., 2014). Para nicotina, materiais feitos de celulose são os mais vantajosos, pois a molécula de nicotina possui grupos polares que formam pontes de hidrogênio com as hidroxilas livres dos monômeros de glicose que compõem a celulose (Petrick e cols., 2010; Bahl e cols., 2014). A mesma preferência ao algodão é vista para amônia e 2-furaldeído, enquanto benzeno, tolueno e pirrol são melhores adsorvidos por tecido de acetato (Ueta e cols., 2010).

Muitos dos poluentes presentes na fase gasosa da fumaça depositam-se nas superfícies dos ambientes em que se fuma. A fumaça contém COVs e compostos orgânicos semivoláteis (COSVs), cuja afinidade com as superfícies é inversamente proporcional à pressão de vapor do composto. A nicotina é um dos principais COSVs liberados e possui alta afinidade a materiais, pois sua pressão de vapor à temperatura ambiente é baixa e corresponde a 0,04 mmHg (Matt e cols., 2011b). Assim, a nicotina é quase completamente transferida da fase gasosa para a superfície dos materiais (sorção) e posteriormente reemitida (dessorção) para o ar do ambiente. A reemissão torna-se uma fonte adicional de nicotina na fase gasosa tão importante quanto a nicotina liberada na fumaça do cigarro aceso (Singer, Hodgson e Nazaroff, 2003).

A ressuspensão das partículas da fumaça do cigarro foi verificada pelo aumento da concentração de partículas ultrafinas após manobras para que as partículas depositadas em superfícies voltassem ao ar do ambiente de uma sala em que 10 cigarros foram queimados um dia antes (Becquemin e cols., 2010). A quantidade de nicotina no painel de carros foi maior quando os motoristas dirigiam com as janelas abertas, sugerindo que a movimentação do

ar causava a ressuspensão das partículas depositadas no estofado, assoalho e outras superfícies dos carros (Fortmann e cols., 2010).

A nicotina desorvida das superfícies e reemitida para o ar ambiente pode formar poluentes secundários ao sofrer reações com espécies oxigenadas e nitrogenadas presentes no ar (Matt e cols., 2011b). A nicotina presente no substrato de celulose impregnado com fumaça de cigarro em ambiente controlado ou do material exposto em uma cabine de caminhão cujo motorista era fumante sofreu reação de nitrosação pelo ácido nitroso (HONO) ocorrendo a formação de nitrosaminas específicas do tabaco, como a 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), a N'-nitrosonornicotina (NNN), a N-nitrosopirrolidina e a 4-(metilnitrosamino)-4-(3-piridil)-butanal (NNA) (Sleiman e cols., 2010a). O HONO frequentemente está presente no ar de ambientes internos em alta concentração, pois resulta da emissão direta de aparelhos de combustão sem ventilação, da fumaça de cigarro e da conversão de NO_2 e NO. A pronta disponibilidade de agentes que promovam a formação dessas nitrosaminas é de especial importância já que a NNK e a NNN possuem atividade carcinogênica (Hecht, 2008). A NNA possui atividade mutagênica semelhante à NNN e está ausente na fumaça recém-emitada, pois é altamente instável à alta temperatura (*International Agency for Research on Cancer*, 1985). Estas nitrosaminas também apresentam baixa pressão de vapor e, por isso, alta afinidade a superfícies (Matt e cols., 2011b). O mecanismo proposto por Sleiman e cols. (2010a) para formação das nitrosaminas específicas do tabaco envolve o ataque eletrofílico de NO^+ à nicotina formando um intermediário catiônico instável cujo átomo de hidrogênio é subtraído para

formar um cátion imínio que é hidrolisado pelas moléculas de água adsorvidas nas superfícies reagindo novamente ao HONO para formar NNA, NNK e NNN.

É importante lembrar que muitas nitrosaminas naturalmente compõem a fumaça de cigarro (Hecht, 2008) e, quando presentes no THS, é difícil determinar sua proveniência, se já existente na fumaça de cigarro ou formada a partir de reações com a nicotina. Aproximadamente 80% das nitrosaminas específicas do tabaco presentes na fumaça emitida pelo cigarro depositam-se nas superfícies dos ambientes e não são removidas sob condições usuais de ventilação (Schick e cols., 2014). NNK foi encontrada nas superfícies de quase todas as casas e carros de fumantes, mas encontrada apenas ocasionalmente nas casas de não fumantes (Thomas e cols., 2014). Ramírez e cols. (2014) constataram que a concentração de cinco nitrosaminas específicas do tabaco (entre elas, NNN, NNK e seu metabólito 4-(metilnitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanol - NNAL) e oito nitrosaminas voláteis não específicas (comumente liberadas durante a combustão de produtos do tabaco, mas que apresentam outras fontes adicionais) na poeira de 22 casas de fumantes foi cerca de oito vezes maior do que em 24 casas de não fumantes. Nas casas de fumantes, os níveis das nitrosaminas específicas do tabaco correlacionaram-se positivamente com o número de cigarros fumados dentro de casa e com a concentração de nicotina no ambiente, indicando que a maioria dessas nitrosaminas resultou dos cigarros fumados dentro do ambiente. Em estudo posterior do mesmo autor, níveis de NNK e NNN na poeira de casas de fumantes foram seis e quinze vezes maiores do que nas casas de não fumantes, respectivamente. Outras aminas aromáticas carcinogênicas também foram detectadas pela primeira vez na casa de fumantes, com maior

abundância de 2-aminonaftaleno e 4-aminobifenil (Ramírez e cols., 2015). NNAL foi detectada na urina de camundongos expostos ao THS sem exposição involuntária à fumaça de cigarro (Martins-Green e cols., 2014). Em estudo avaliando a ação do tempo na concentração de nitrosaminas depositadas em tecido de algodão, verificou-se que os níveis de NNK aumentaram após 16 meses e diminuíram três meses depois. O aumento também ocorreu na concentração de NNN, enquanto os níveis de NNA mantiveram-se constantes até 16 meses após a exposição e reduziram três meses mais tarde. O aumento foi explicado pela formação *de novo* de nitrosaminas a partir da nicotina depositada no material antes de alcançar um limite e começar a decair devido a transformações químicas (Bahl e cols., 2014). A formação *de novo* dessas nitrosaminas também foi comprovada em experimento longitudinal pelo aumento da concentração nos meses em que não ocorria exposição à fumaça de cigarro (Bahl e cols., 2015a).

Outros subprodutos também são formados da reação da nicotina com ozônio (O_3) e outros oxidantes. O O_3 em ambientes internos é proveniente da contaminação do ar pelos poluentes presentes no ar externo e pelo uso de purificadores de ar (Petrick e cols., 2011). A ozonização pode ocorrer tanto com a nicotina presente na fase gasosa (reação homogênea) quanto com a nicotina adsorvida na superfície ou reemitida para o ar (reação heterogênea). O ataque eletrofílico pelo O_3 à pirrolidina presente na estrutura química da nicotina acarreta a formação de cotinina, formaldeído, n-metilformamida e nicotinaldeído. Esses produtos não foram detectados na ausência de O_3 e o efeito foi melhor observado em ambiente seco e com materiais constituídos de algodão (Destailats e cols., 2006). A presença de O_3 proporciona maior perda

de nicotina, ou seja, há uma drástica diminuição dos níveis de nicotina na fase gasosa já que fica mais suscetível a reações e transformações em poluentes secundários.

Estudo sobre a ação de O_3 em superfícies exposta ao THS (mimetizado pela incorporação de solução de nicotina a algodão, papel cromatográfico e substrato de celulose) verificou a formação de aerossol secundário contendo maior quantidade de partículas de tamanho pequeno em condições de umidade relativa mais baixa (Petrick, Svidovski e Dubowski, 2011). A formação de partículas ultrafinas (tamanho inferior a 100 nm) a partir da reação da fumaça de cigarro com O_3 também foi comprovada por Sleiman e cols. (2010b). A formação de aerossol secundário pode ser afetada tanto pelo tipo de material da superfície quanto pela umidade. A morfologia do material pode impedir a penetração da nicotina enquanto a água pode revesti-la e impedir o acesso do O_3 à nicotina presente na superfície, dissolvê-la ou ainda ocupar os sítios em que a nicotina se ligaria (Petrick e cols., 2010). Em ambiente controlado utilizando uma câmara para simular um ambiente real, a presença de O_3 não acarretou a reemissão de nicotina à fase gasosa, mas sim de produtos de oxidação da nicotina (*N*-metilformamida e miosmina) via reação heterogênea. A taxa de transformação era maior nos materiais feitos de papel cromatográfico seguido por algodão e gesso. Cotinina, o principal produto da oxidação de nicotina via O_3 , foi encontrada apenas no papel. Por outro lado, nas paredes da câmara, foram detectados nicotina, nicotina-1-óxido e dois organofosforados ausentes na fumaça de cigarro, mas comumente utilizados nas formulações de retardantes de chamas (Petrick e cols., 2011).

Sleiman e cols. (2014) sugeriram que os compostos clorados e íons cloretos poderiam reagir e formar clorometano e diclorometano, dois COVs que não estão comumente presentes na PTA. Resíduos de pesticidas presentes no tabaco e branqueadores do papel que envolve o cigarro são as prováveis fontes desses compostos clorados.

Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são contaminantes ubíquos do ar, pois ocorrem naturalmente no ambiente ou podem ser gerados por ação humana. Muitas das substâncias pertencentes a esse grupo são reconhecidas como carcinógenos a humanos ou prováveis carcinógenos (*International Agency for Research on Cancer*, 2010). HAPs podem ser encontrados na fase gasosa e na fase particulada do ar ou em mistura de ambas as fases, já que as diferentes substâncias apresentam diferentes graus de volatilidade (Dybing e cols., 2013). A fumaça de cigarro é uma significativa fonte de produção dos HAPs, pois eles resultam da combustão incompleta ou pirólise de materiais orgânicos (Moir e cols., 2008). Poucos estudos sobre a permanência de HAPs no THS foram conduzidos. Quantidade de HAPs nas mãos de fumantes foi quase três vezes maior do que nas mãos de não fumantes (34 ng/mão versus 13 ng/mão, respectivamente). Comparando com os dados de Moir e cols. (2008) sobre a concentração de HAPs na fumaça secundária emitida por um cigarro, os autores calcularam que 0,1% a 6% dos HAPs emitidos ficam retidos em apenas uma das mãos de fumantes (Fleming e cols., 2012). Além das mãos, essas substâncias ainda podem ficar retidas na pele, cabelos e roupas dos fumantes tornando-os vetores da contaminação que piora a qualidade do ar do ambiente. Outro estudo verificou que a quantidade de HAPs na poeira da sala de 43 casas de fumantes foi maior que nas 89

casas de não fumantes (990 ng/g versus 756 ng/g, respectivamente). Essa diferença foi ainda mais pronunciada quando considerada a área do ambiente (1650 ng/cm^2 versus 796 ng/cm^2 , respectivamente). Além disso, nas casas de fumantes, houve uma correlação positiva entre a quantidade de HAPs na sala (em que o tabagista fumava) e no quarto de um residente não fumante, evidenciando que essas substâncias podem ser transportadas mesmo para ambientes em que não se permite fumar (Hoh e cols., 2012). Estima-se que aproximadamente 60% dos HAPs presentes na fumaça de cigarro depositam-se nas superfícies dos ambientes (Schick e cols., 2014).

COVs e outros poluentes inaláveis também foram estudados quanto à existência e permanência no THS. Diferentes tipos de tecidos impregnados com fumaça de cigarro desorveram muitos COVs durante a permanência por 30 minutos em ambiente livre de fumaça. A concentração dos COVs liberados era inferior aos níveis encontrados tipicamente na fumaça secundária, e compostos com maior volatilidade desorveram dos tecidos mais rapidamente (cerca de 10 minutos). Semelhante ao material particulado (Invernizzi e cols., 2007), benzeno, 2,5-dimetilfurano (2,5-DMF), tolueno e limoneno são encontrados no ar exalado pelos fumantes até dez minutos após parar de fumar (Ueta e cols., 2010). Muitos outros compostos que não são usualmente reportados na PTA foram detectados em estudos laboratoriais utilizando máquina para liberar fumaça de cigarro em câmara, tais como metacroleína, metil-vinil-cetona, 2-metil furano, 1,3-pentadieno, 1-butenos e propanonitrila. A concentração de COVs diminuiu com o tempo e nicotina só foi detectada no ar até 20 minutos após a extinção da chama, sendo inexistente 2 e 18 horas após. Isso mostra a rápida perda dessas substâncias pela deposição em superfícies.

Além disso, os níveis de alguns COVs aumentaram, indicando a reemissão ou reação para formação *de novo* desses compostos. O Quadro 1 apresenta alguns dos COVs analisados nesse estudo em diferentes tempos. Após oito horas do último cigarro ter sido fumado na casa de fumante, alguns COVs foram encontrados exclusiva ou predominantemente no interior da casa. Por causa disso, acetonitrila, 2,5-DMF, 2-metilfurano, p-xileno, acroleína, benzaldeído, metacroleína, heptano, undecano, 1-noneno e isopreno podem ser marcadores úteis para o THS (Sleiman e cols., 2014).

Quadro 1 – Concentração de COVs ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) avaliados 20 minutos, 2 horas e 18 horas após a extinção da chama de seis cigarros fumados mecanicamente (*smoking machine*) em câmara de 18m^3 .

	20 minutos	2 horas	18 horas
Aminas e Nítrilas	3-EP (6,3) Miosmina (1,5) Nicotina (48,9) Acetonitrila (73,0)	3-EP (1,0) -- -- Acetonitrila (278,0)	-- -- -- Acetonitrila (19,5)
Hidrocarbonetos aromáticos	2,5-DMF (95,8) Benzeno (263,5) Naftaleno (3,8) Estireno (129,0) Tolueno (226,7)	2,5-DMF (13,5) Benzeno (77,0) Naftaleno (0,6) Estireno (7,5) Tolueno (125,4)	2,5-DMF (3,8) Benzeno (14,5) Naftaleno (0,3) Estireno (0,2) Tolueno (15,7)
Carbonilas e Clorados	2-butanona (19,3) Acetaldeído (230,0) Metacroleína (90,7) Clorometano (28,1) Diclorometano (32,7)	2-butanona (5,7) Acetaldeído (21,2) Metacroleína (6,4) Clorometano (7,1) Diclorometano (24,3)	2-butanona (3,6) Acetaldeído (3,4) -- Clorometano (0,4) Diclorometano (6,4)
Alcanos e Alcenos	Butano (62,7) 1,3-pentadieno (100,2) Isopreno (273,3)	Butano (180,4) 1,3-pentadieno (13,0) Isopreno (265,5)	Butano (13,7) 1,3-pentadieno (2,5) Isopreno (32,2)

Adaptado de Sleiman e cols. (2014).

3-EP: 3-etinilpiridina, 2,5-DMF: 2,5-dimetilfurano.

Como 3-EP tem sido usado como um marcador do tabagismo passivo, é coerente pensar em seu uso para verificar o THS em diferentes ambientes. Em carros de aluguel em que era permitido fumar, os níveis de 3-EP no ar foram maiores do que em carros em que o fumo era proibido (Matt e cols., 2013).

Igualmente, os níveis de 3-EP no ar em quarto de hotel sem restrição ao fumo foi cerca de sete vezes maior do que em quartos de hotel com restrição total ao fumo. No entanto, os níveis da substância depositada nas superfícies dos móveis não diferiram entre os quartos (Matt e cols., 2014). No estudo de Sleiman e cols. (2014) sobre os COVs presentes no THS, 3-EP foi a única amina semivolátil encontrada na fase gasosa após duas horas da queima do cigarro, no entanto, desapareceu na dosagem posterior (18 horas), provavelmente devido à alta adsorção às superfícies.

Estudos sobre a composição e comportamento das substâncias do THS no decorrer do tempo são importantes para estabelecer marcadores adequados para avaliar o potencial de dano da exposição. Ainda não há um consenso sobre qual substância seria o melhor marcador, visto que os estudos a respeito estão em seus primeiros anos de desenvolvimento. Mas, sempre que possível, os autores sugerem substâncias ou um conjunto de substâncias que poderiam ser úteis.

Como a nitrosamina NNA está ausente na fumaça liberada durante a queima do cigarro, mas é formada pela nitrosação da nicotina, sua presença no ar ou materiais seria um indicador específico do THS, visto que não há outras fontes (Sleiman e cols., 2010a; Acuff e cols., 2015). Apesar disso, nem todos os estudos tiveram sucesso em encontrá-la (Schick e cols., 2014). A dosagem de seu metabólito na urina (4-(methilnitrosamina)-4-(3-piridil)-1-butanol ou *iso*-NNAL) é sugerido como um marcador da exposição ao THS (Sleiman e cols., 2010a). Entretanto, *iso*-NNAL não foi detectada na urina de 79 crianças que conviviam com fumantes, indicando que a formação de *iso*-NNAL a partir de

NNA não ocorre tão prontamente quanto o metabólito de outras nitrosaminas mais comumente associadas ao tabagismo involuntário (Thomas e cols., 2011).

A nicotina desdora mais rapidamente das superfícies que a NNK devido à menor pressão de vapor. Em tecido utilizado em carpete de automóveis, a nicotina não foi detectada 60 dias após exposição por 30 dias à fumaça de cigarro enquanto o nível de NNK foi semelhante tanto imediatamente após a exposição quanto ao final do tempo de envelhecimento no experimento (Bahl e cols., 2015a). Assim, a razão entre a concentração de NNK e a concentração de nicotina poderia servir como um marcador do THS, pois quanto maior o tempo, menor será a concentração de nicotina e maior será a razão, indicando o envelhecimento e, conseqüentemente, persistência do THS (Schick e cols., 2014).

Nicotelina, ou 2,2':6',2''-Terpiridina, é um alcaloide relativamente não volátil presente na fumaça de cigarro e não teve seus níveis diminuídos em estudo sobre o envelhecimento da fumaça de cigarro. Como seus níveis permaneceram constantes em algodão e poliéster até um ano e meio após a exposição à fumaça de cigarro bem como por até 60 dias em tecidos sintéticos utilizados no interior de automóveis, os autores sugeriram seu uso como um marcador do material particulado do THS (Bahl e cols., 2014; Bahl e cols., 2015a).

Acetonitrila, 2,5-DMF e 2-metil furano estão presentes em altas concentrações e podem ser considerados bons marcadores de THS. No entanto, como estão presentes na PTA formada durante a combustão do cigarro, não há um limite para definir acuradamente a transição para THS. A concentração de 3-EP reduz com o tempo e altos valores (acima de 500) da

razão entre acetonitrila ou furanos metilados e 3-EP sugerem a predominância do THS (Sleiman e cols., 2014).

1.3.3. Efeitos do THS na saúde

O risco da exposição das pessoas aos constituintes do THS ainda não está totalmente esclarecido, uma vez que os estudos a respeito dos efeitos são escassos. No entanto, a presença e persistência de compostos tóxicos que possuem efeitos prejudiciais à saúde humana conferem ao THS um potencial dano que não pode ser ignorado. Metade da nicotina depositada nas roupas e dissolvidas pelo suor pode ser absorvida e penetrar o organismo através da pele (Hammer e cols., 2011). Ao estudar os efeitos, algumas características próprias dessa fonte de exposição à fumaça de cigarro devem ser consideradas: diferentes perfis de tempo de exposição (exposição acumulativa a baixos níveis de contaminação ou exposição repetida a altas doses em curto período de tempo), concentração das substâncias em diferentes materiais e duração do contato a estes materiais, novas substâncias formadas a partir de reações químicas e contribuição das diferentes rotas de exposição (Jaakkola e Jaakkola, 1997; Matt e cols., 2011b). Alguns estudos têm apontado que não há uma relação linear entre dose de exposição ao THS e risco para efeitos deletérios (Hang e cols., 2013; Karim e cols., 2015).

As crianças são mais suscetíveis à exposição ao THS, pois passam mais tempo e respiram mais perto do chão, onde acumula-se poeira, além de levar mais a mão ou objetos à boca após tocarem superfícies que podem estar contaminadas (Winickoff e cols., 2009). Além disso, as crianças são mais vulneráveis do que os adultos aos poluentes, pois apresentam maior taxa de

respiração em relação ao tamanho corporal, imaturidade do sistema respiratório e imunológico, menor capacidade metabólica e maior expectativa de vida (Ferrante e cols., 2013). Em estudo na Coreia do Sul com 31.584 crianças com idade entre seis e onze anos, vários sintomas respiratórios foram encontrados naquelas que eram passivamente expostas à fumaça de cigarro, no entanto, aquelas expostas apenas ao THS (isto é, em que o familiar fumava apenas enquanto as crianças não estavam na residência) não estavam livres dos efeitos à saúde. Crianças expostas somente ao THS apresentaram maior chance de sintomas relacionados à tosse, tais como tosse seca, tosse noturna e acesso de tosse, quando comparadas com crianças não expostas nem ao THS nem à corrente secundária da fumaça (Jung, Ju e Kang, 2012). Apesar de fornecer evidência preliminar quanto aos efeitos prejudiciais do THS, esse estudo baseou-se apenas em informações obtidas por meio de questionários tanto quanto ao tipo de exposição quanto à presença dos sintomas respiratórios. Uma significativa fração dos sintomas respiratórios relacionados ao tabagismo passivo pode estar associada com os produtos irritantes gerados por meio da oxidação dos componentes da fase gasosa ou do aerossol secundário produzido a partir da reação da nicotina presente nas superfícies com o O_3 (Petrick e cols., 2011). Além disso, utilizando as nitrosaminas NNA e NNK como substitutos do THS em explantes de pulmão de ratos, a exposição por 24 horas resultou em interrupção da sinalização da homeostase, com alterações nos níveis de proteínas que afetam o desenvolvimento pulmonar, tais como receptor ativado por proliferadores de peroxissoma gama (PPAR- γ), fibronectina e calponina (Rehan, Sakurai e Torday, 2011).

Em modelo bacteriano para mimetizar a ação de N_2 e O_3 sobre superfície composta de celulose impregnada com nicotina, nenhum efeito mutagênico direto foi observado em diferentes cepas de *Salmonella typhimurium* (teste de Ames) (Petrick, Svidovsky e Dubowski, 2011). Já o efeito genotóxico foi observado em células de carcinoma hepatocelular humano (HepG-2). Tiras de papel cromatográfico foram expostos à fumaça de cinco cigarros. Imediatamente à queima dos cigarros, algumas tiras foram retiradas da câmara enquanto outras tiras foram retiradas apenas após transcorridas 15 horas, representando a exposição secundária à fumaça de cigarro e exposição aguda ao THS, respectivamente. Além disso, tiras de papel foram expostas à fumaça de cigarro por 196 dias, representando a exposição crônica ao THS. Essas tiras de papel foram imersas em meio de cultura para liberar os poluentes na solução e verificar a quebra de DNA no teste de células individualizadas em gel de agarose (ensaio Cometa) em células HepG-2. Maior dano ao DNA foi verificado na exposição crônica ao THS, em que a quebra de DNA na cauda correspondeu a 10% em comparação a 4% da exposição aguda ao THS e 3% da exposição secundária à fumaça (Hang e cols., 2013).

A quebra de DNA pelo THS também foi verificada no material coletado do tecido sintético que reveste o banco e o assoalho de automóveis. O material foi exposto à fumaça de cigarro por 30 dias e mantido em câmara de acrílico disposta em ambiente externo para provocar o envelhecimento do THS por dois meses. Duas linhagens celulares (células-tronco neurais de camundongo mNSC e fibroblastos dérmicos humanos hDF) foram expostas a meio de cultivo preparado com o material em que o THS foi coletado e avaliadas pelo ensaio Cometa. As células tratadas com esse material apresentaram maior

porcentagem de células com migração de DNA cromossomal e cauda mais longa. Os efeitos foram similares para as duas linhagens celulares, no entanto, as células mNSC apresentaram maior porcentagem de DNA na cauda, especialmente nas amostras provenientes do tecido de banco de carro. Essa diferença pode ser justificada pela maior concentração de NNK, nicotina e outros alcaloides nessa amostra em relação ao carpete do assoalho bem como a maior vulnerabilidade de células não diferenciadas a xenobióticos (Bahl e cols., 2015a).

A ação individual do NNA sobre a quebra do DNA também foi comprovada: baixa concentração de NNA resultou em dano ao DNA uma hora após a exposição o qual aumentou proporcionalmente no decorrer de 24 horas (Hang e cols., 2013). NNA é implicado quebrar o DNA por induzir dano oxidativo no gene da hipoxantina fosforibosiltransferase 1, que possui um papel crítico no metabolismo de nucleotídeos, e no gene da polimerase β , que é responsável pelo mecanismo de reparo do DNA (Acuff e cols., 2015). A exposição crônica ao THS resultou em dano oxidativo ao DNA nesses dois genes em células de epitélio brônquico humano (BEAS-2B) (Hang e cols., 2013). Além disso, juntamente com NNK, a NNA pode induzir mutação de base no DNA e resultar em crescimento celular descontrolado e, consequentemente, na formação de tumores (Acuff e cols., 2015).

Martins-Green e cols. (2014), Karim e cols. (2015) e Adhami e cols. (2016) procuraram investigar os efeitos atribuídos unicamente ao THS. Camundongos foram mantidos por 24 semanas em caixas (contendo diferentes tipos de tecidos a fim de permitir que a sorção e a dessorção dos poluentes acontecessem da forma mais realística possível) expostas por sete dias à

fumaça de cigarro. Isso seria equivalente a residir com fumantes que fumam somente enquanto os outros moradores não estão na residência. Os animais expostos ao THS apresentaram alterações nos níveis de triglicerídeos, glicose de jejum, lipídeos e gordura nos hepatócitos (esteatose), na produção de colágeno, na espessura e estrutura da parede dos alvéolos incluindo infiltração celular e nos níveis de citocinas pró-inflamatórias (Martins-Green e cols., 2014) bem como aumentada agregação e secreção plaquetária, resultando em tempo de sangramento mais curto e aumentado risco de trombose (Karim e cols., 2015). Além disso, o THS aumentou o estresse oxidativo nas células do músculo esquelético dos animais, ocasionando lipoperoxidação e dano ao DNA e levando a quadros de hiperglicemia e insulinemia (Adhami e cols., 2016). As alterações no metabolismo hepático demonstram risco potencial para diabetes, ataque cardíaco e outras doenças cardiovasculares, sendo que trombose é o principal mecanismo de mortalidade por doença cardiovascular associada ao tabagismo (Burton, 2011). Já o elevado nível de colágeno intersticial, paredes espessas e presença de macrófagos nos alvéolos e níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias inferem um risco elevado de desenvolvimento de fibrose pulmonar após período de prolongada exposição ao THS.

Mesmo em concentração incapaz de provocar efeito citotóxico (50 µg/mL), duas linhagens murinas de células reprodutoras masculinas (GC-2 e TM-4) quando expostas a meio de cultura contendo THS apresentaram distúrbios nos níveis de metabólitos e na expressão gênica de enzimas relacionadas ao metabolismo e estresse oxidativo. Ocorreu aumento nos níveis de glutatona e glicina acompanhado de diminuição dos níveis de glutamato. Além disso, houve aumento nos níveis de RNAm da enzima glutatona-

sintetase e diminuição nos níveis de RNAm de gamaglutamiltransferase, indicando que há maior síntese e menor catabolismo de glutathione (Xu e cols., 2015). Esse estudo alerta para a ação do THS em sistemas que não são o alvo primário da fumaça do cigarro, mas que podem ter seu funcionamento comprometido pela exposição continuada. A exposição ao THS também causou menor comprimento dos dendritos e alteração nos batimentos cardíacos de embriões de *zebrafish* (Hammer e cols., 2011).

Ramírez e cols. (2014) estimaram o risco de câncer da exposição aos carcinógenos do THS. O maior risco calculado foi para crianças de um a seis anos de idade expostas à nicotina e outras substâncias depositadas na poeira das casas de fumantes (9,6 casos adicionais de câncer para cada 100.000 crianças expostas). Para as casas de não fumantes, esse risco foi equivalente a um terço do valor das casas de fumantes. O risco de câncer em decorrência da exposição às nitrosaminas específicas do tabaco excedeu o limite recomendado pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (*Environmental Protection Agency* - EPA) em 77% das casas de fumantes e em 64% das casas de não fumantes. O risco máximo da exposição a todas as nitrosaminas provenientes do THS em casas de fumantes foi correspondente a um caso extra de câncer a cada mil pessoas expostas.

Ainda sobre estimativas do impacto do THS sobre a saúde, $PM_{2,5}$ contribuiu para mais de 90% do dano total causado pelo tabagismo involuntário e pelo THS. Um não fumante convivendo por 50 anos com um fumante pode perder 0,3 a 7 anos de vida em virtude da inalação dos compostos tóxicos do THS. Mesmo que ambos passem maior parte do tempo fora da residência, as pessoas não fumantes podem perder 0,3 a 4,1 anos de vida em função dessa

exposição. Dependendo do tempo que transcorre até a transição para o THS, 5 a 60% dos danos totais causados pela exposição aos poluentes da fumaça de cigarro no ambiente podem ser atribuídos somente ao THS (Sleiman e cols., 2014).

Desordens comportamentais são mais comuns em crianças expostas involuntariamente à fumaça de cigarro (Kabir, Connolly e Alpert, 2011) e o impacto do THS sobre o comportamento é alvo de poucas pesquisas. Animais expostos ao THS mostraram comportamento que se assemelhava a quadros hiperativos percorrendo maior distância e com maior velocidade no teste do campo aberto do que animais não expostos (Martins-Green e cols., 2014). Além disso, crianças expostas ao THS em suas casas e que apresentaram reação positiva ao cheiro de cigarro em objetos ou pessoas, ou seja, crianças que sentiam prazer, euforia ou simplesmente gostavam do cheiro, estavam mais propensos a fumar um cigarro caso um amigo lhe oferecesse. Assim, as reações ao THS e tendência a fumar podem ser influenciadas socialmente e ser um fator de risco para iniciação do tabagismo (Chen e cols., 2015).

1.4. Avaliação da Citotoxicidade

Ensaio *in vitro* de curta duração constitui uma ferramenta valiosa para avaliar a toxicidade da fumaça de cigarro. Os testes mais comumente utilizados diferem quanto ao modo de ação e princípio, sendo possível avaliar efeitos citotóxicos, proliferação, mudanças no ciclo celular, genotoxicidade, efeitos epigenéticos e alterações no metabolismo, entre outros (Andreoli, Gigante e Nunziata, 2003; Johnson e cols., 2009). A avaliação de toxicidade de

xenobióticos segue protocolos bem específicos e delineados e tem recebido destaque em relação a métodos convencionais, pois possibilita investigar as vias pelas quais danos celulares podem ser produzidos mesmo em uma primeira triagem de amostras. Seus resultados correlacionam-se com os efeitos tóxicos agudos observados *in vivo* (Zucco e cols., 2004). Além disso, a realização destes ensaios tem-se mostrado útil para reduzir o uso de animais em pesquisa científica, reduzir o custo financeiro bem como o tempo para obtenção de resultados (Piersma, 2006).

A partir da metade dos anos 1980, metodologias utilizando o cultivo celular passaram a ser extensivamente utilizadas na pesquisa em toxicologia (Zucco e cols., 2004). Testes toxicológicos *in vitro* permitem o contato direto ou indireto de um xenobiótico com o cultivo celular, sendo possível avaliar mudanças em diferentes organelas celulares. Diferentes mecanismos podem ser avaliados dependendo do ensaio e do tipo celular utilizado (Rogero e cols., 2003; Freshney, 2010).

Por meio de ensaios de citotoxicidade, podem ser observados os efeitos adversos resultantes da interferência de substâncias químicas em estruturas ou processos celulares essenciais para a sustentação das funções de manutenção, divisão e proliferação celulares, podendo ser enfocadas funções órgão-específicas conforme o tipo celular utilizado (Andreoli, Gigante e Nunziata, 2003). Assim, os ensaios *in vitro* fornecem informações úteis para o entendimento do mecanismo de ação de substâncias químicas nas células. Como regra geral, as células são expostas a diferentes concentrações de um produto químico por um dado período de tempo, sendo posteriormente mensuradas as funções celulares utilizando diferentes alvos. Como os

resultados desses ensaios devem ser interpretados e quais informações fornecem a respeito da toxicidade em humanos são questões relevantes na escolha e desenvolvimento desses estudos (Johnson e cols., 2009). O significado dos efeitos citotóxicos para situações *in vivo* está relacionado principalmente a quatro áreas: 1) irritação e inflamação; 2) proliferação celular e hiperplasia; 3) estresse oxidativo; e 4) diminuição da função de um órgão. Todas essas injúrias citotóxicas podem levar a uma condição patológica se mantidas cronicamente (Andreoli, Gigante e Nunziata, 2003).

Uma variedade de ensaios *in vitro* tem sido usada para avaliar a toxicidade da fumaça de cigarro ou de seus componentes. Alguns dos ensaios mais utilizados são a Recaptação do Vermelho Neutro (VN) pelos lisossomos e a avaliação da atividade mitocondrial pelo teste de redução do corante MTT (Fotakis e Timbrell, 2006). Eles produzem dados significativos em um curto período de tempo, são relativamente baratos e possuem alta sensibilidade (Rogerio e cols., 2003). Ambos ensaios são considerados testes reprodutíveis para triagem de muitos agentes potencialmente tóxicos (Mosmann, 1983; *National Institutes of Health*, 2006).

O ensaio da redução do MTT é um teste rápido, econômico, sensível e acurado para determinar os efeitos deletérios *in vitro* de muitas substâncias. Ele mostra uma ruptura de uma função bioquímica crítica e indica uma alteração precoce no funcionamento celular (Malich e cols., 1997). O teste é baseado na técnica desenvolvida por Mosmann (1983) em que um sal tetrazólico solúvel em água (3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina – MTT) é reduzido na membrana interna da mitocôndria pela ação da succinato desidrogenase para formar um produto cromogênico de cor

azulada, o cristal de formazan. A produção de formazan indica o estado funcional da cadeia respiratória e da atividade mitocondrial e reflete o número de células viáveis (Triglia e cols., 1991; Butler, 2004; Freshney, 2010; Vanden Berghe e cols., 2013).

Contudo, o formazan é produzido por células ativas mesmo na ausência de proliferação (Mosmann, 1983). Além disso, em células mortas, a mitocôndria pode manter intacta a atividade da enzima succinato desidrogenase, que pode ser erroneamente interpretada como sobrevivência. Citoplasma, compartimento endolisossomal e a membrana plasmática podem estar associados à redução do MTT (Berridge e cols., 2005). Alguns compostos podem aumentar ou diminuir a atividade da succinato desidrogenase sem afetar a sobrevivência ou proliferação celular (Vanden Berghe e cols., 2013) ou ainda interagir *per si* com o sal do MTT (Shoemaker e cols., 2004; Peng e cols., 2005; Lupu e Popescu, 2013). Esse último pode ser particularmente importante se o complexo a ser estudado possuir substâncias com potencial redutivo intrínseco. Além disso, um distúrbio no funcionamento da mitocôndria pode iniciar um processo transitório alterando a permeabilidade da membrana, causando um processo reversível de tumefação mitocondrial sem necessariamente desencadear morte celular (Minamikawa e cols., 1999). Ainda pode ocorrer aumento no número de organelas sem que ocorra proliferação celular (Alberts e cols., 2008). Por causa dos resultados multifacetados, não é recomendado usar apenas o ensaio do MTT para monitorar a viabilidade celular, e é importante interpretar seu resultado como uma informação sobre o *status* mitocondrial.

Em estudos sobre a citotoxicidade do condensado de fumaça de cigarro (CFC) em células provenientes de carcinoma de pulmão humano (A549), foi

constatada uma relação dose-resposta: maior concentração do CFC resultou em menor atividade mitocondrial (Kaushik e cols., 2008; Das, Bhattacharya e Chakrabarti, 2009). Apenas três estudos relataram utilizar o ensaio do MTT para avaliar os efeitos citotóxicos do THS e o fizeram na intenção de avaliar a viabilidade celular. Amostras de tecido sintético utilizado no estofamento de banco e no carpete de automóveis foram expostas por 30 dias à fumaça de cigarro. Após o período de exposição, os tecidos foram mantidos em ambiente 100% livre da fumaça de cigarro por 60 dias e utilizados para preparar o meio de cultivo. Após 48 horas de interação com as células, não houve alteração citotóxica quanto à viabilidade avaliada pelo MTT. Já o tecido de algodão exposto à fumaça de cigarro se mostrou citotóxico às células mNSC, mas não a células hDF (Bahl e cols., 2015a). No entanto, a citotoxicidade não se manteve quando as amostras passaram por um processo de envelhecimento por cinco meses antes de preparar o meio de cultivo para realizar o ensaio (Bahl e cols. 2015b). Baixas concentrações de THS foram incapazes de provocar efeitos citotóxicos significativos em relação à atividade mitocondrial das células GC-2 e TM-4. Diminuição da viabilidade celular só ocorreu quando a concentração do THS (representado pela massa do papel utilizado para coletar o THS gerado experimentalmente) ultrapassou 500 µg/mL (Xu e cols., 2015).

Outro ensaio que provê uma estimativa quanto ao número de células viáveis é o teste de recaptção do VN, primeiramente descrito por Borenfreund e Puerner (1985). O teste é baseado na capacidade de um corante vital solúvel atravessar a membrana plasmática e ser incorporado pelos lisossomos das células viáveis (Borenfreund, Babich e Martin-Alguacil, 1988; Triglia e cols.,

1991). Em condições normais, o lisossomo apresenta pH menor que o do citoplasma. Assim, o corante aprisionado pelo lisossomo recebe um próton e é incapaz de deixar o interior da organela. Em células danificadas, a eficiência da bomba de prótons H^+ -ATPase fica reduzida, aumentando o pH do lisossomo e desprotonizando o corante VN que, conseqüentemente, difunde-se no citoplasma diminuindo sua concentração na organela. Então, a integridade lisossomal é um indicador altamente sensível da viabilidade celular (Repetto e cols., 2008). Este ensaio é tecnicamente rápido, simples, barato, sensível e reprodutível (Zhang e cols., 1990). O lisossomo é a organela terminal da via endocítica, por isso o ensaio de recaptção do VN reflete o estado final da célula após exposição a um agente estressante (*National Institutes of Health*, 2001; Česen e cols., 2012).

Menor viabilidade lisossomal foi encontrada em células 3T3 expostas ao material particulado da fumaça de cigarro (Roemer e cols., 2002; Counts, Hsu e Tewes, 2006; Patskan e cols., 2008) e em células A549 expostas diretamente à fumaça de cigarro (Fukano e cols., 2004). Apesar do ensaio da recaptção do VN ser bastante utilizado para avaliar a toxicidade da fumaça de cigarro (Andreoli, Gigante e Nunziata, 2003; Johnson e cols., 2009), não há estudo que o utilize para avaliar o impacto do THS sobre cultivos celulares.

Ambos ensaios utilizam medidas colorimétricas para estimar o número de células viáveis após exposição a xenobióticos. Contudo, diferentes ensaios de citotoxicidade podem ter diferentes resultados, porque cada ensaio avalia uma diferente função (Borenfreund, Babich e Martin-Alguacil, 1988; Kim e cols., 2009), e a ausência de dano mitocondrial ou lisossomal não implica inexistência de injúria celular. Estudos com diferentes substâncias relatam que

o ensaio do MTT e VN são mais sensíveis para a detecção de toxicidade que outros ensaios que avaliam a perda de integridade da membrana plasmática, como o ensaio da lactato desidrogenase, ou que realizam a quantificação total de proteínas (Arechabala e cols., 1999; Fotakis e Timbrell, 2006). Assim, esses dois *checkpoints* têm sido comumente utilizados com razoável grau de sucesso, pois são testes baseados em eventos celulares que possuem relevância indireta, se não direta, para resultados de testes *in vivo* (National Institutes of Health, 2001). Por outro lado, os efeitos podem sofrer influência do tempo de exposição (Zucco e cols., 2004), assim a falta de evento celular adverso não indica obrigatoriamente ausência de dano, principalmente quando diferentes tempos de exposição e remissão não forem analisados.

Tanto o ensaio de redução do MTT quando da recaptção do VN avaliam o funcionamento de organelas celulares que é interpretado, na maioria dos estudos, como viabilidade celular. No entanto, muitas vezes pode ser útil medir a mudança no número de células para entender se as alterações ocorrem por hipertrofia e atrofia ou hiperplasia e morte celular (Johnson e cols., 2009). O ensaio da exclusão do azul de tripano é uma forma clássica de avaliar a integridade da membrana plasmática e inferir quanto ao número de células viáveis. O azul de tripano é um cromóforo negativamente carregado e só interage com células que sofreram dano. Essa propriedade permite discriminar entre células viáveis e células com dano na membrana: células sem coloração são viáveis enquanto as células inviáveis tornam-se coradas de azul. Esse ensaio é simples e de baixo custo, porém não é rápido e nem passível de ser adaptado para utilizar em larga escala (Altman, Randers e Rao, 1993). Células A549 foram expostas por 24 horas a diferentes concentrações de CFC (2,5 a

200 $\mu\text{g/mL}$) e apresentaram menor número total de células nas concentrações superiores a 100 $\mu\text{g/mL}$ (Fukano e cols., 2006). Apesar de nenhum estudo sobre o THS utilizar o ensaio da exclusão do azul de tripano para avaliar a viabilidade e proliferação celular, no trabalho de Bahl e cols. (2015a) sobre a citotoxicidade de tecidos do interior de automóveis expostos à fumaça de cigarro, foi utilizado estudo de imagem a cada duas horas durante 48 horas de exposição de células mNSC a meio de cultivo contendo THS para avaliar a proliferação e morte celular. Houve uma clara diminuição do número total de células que não foi acompanhada por aumento de células mortas, concluindo-se que a diminuição total de células ocorria exclusivamente por inibição da proliferação celular. Diminuição no crescimento e na motilidade celular além da presença de alterações celulares como vacúolos, fragmentação e perda de citoplasma foram observadas nessas células quando expostas a meio de cultivo contendo substâncias do THS depositadas em tecido de algodão mantido em câmara por onze meses em que fumaça de cigarro foi gerada por 114 horas (Bahl e cols., 2015b).

Apenas mais um estudo utilizou ensaios *in vitro* para avaliar os efeitos do THS. A fumaça total da queima espontânea de um, cinco e dez cigarros, isto é, sem a utilização de bomba para fornecer oxigênio e mimetizar o ato de fumar, impregnada em tecido de algodão foi utilizada para avaliar a viabilidade de células de fibroblastos de camundongo (L929) por meio do método do ácido bicinconínico (BCA), que detecta e quantifica proteínas. As amostras foram extraídas em suor artificial 60 minutos após a impregnação da fumaça, e a solução foi utilizada para expor as células por 72 horas. Observou-se um efeito

dose-dependente e redução de 90% na viabilidade celular com a maior quantidade de cigarro (Hammer e cols., 2011).

Os poucos estudos sobre os efeitos do THS servem para alertar que tecidos e superfícies contaminadas tem o potencial de provocar efeitos adversos à saúde mesmo que o contato não ocorra imediatamente à exposição da fumaça.

1.5. Referências Bibliográficas

Achutti A. Guia Nacional de Prevenção e Tratamento do Tabagismo. Rio de Janeiro: Vitro; 2001.

Acuff L, Fristoe K, Hamblen J, Smith M, Chen J. Third-Hand Smoke: Old Smoke, New Concerns. *J Community Health*. 2015 Oct 29. [Epub ahead of print]

Adhami N, Starck SR, Flores C, Martins-Green M. A health threat to bystanders living in the homes of smokers: how smoke toxins deposited on surfaces can cause insulin resistance. *PLoS One*. 2016 Mar 2;11(3):e0149510.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular biology of the cell*. 5th ed. New York, U.S.: Garland Science; 2008.

Altman SA, Randers L, Rao G. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnol Prog*. 1993 Nov-Dec;9(6):671-4.

Andreoli C, Gigante D, Nunziata A. A review of in vitro methods to assess the biological activity of tobacco smoke with the aim of reducing the toxicity of smoke. *Toxicol In Vitro*. 2003 Oct-Dec;17(5-6):587-94.

Apelberg BJ, Hepp LM, Avila-Tang E, Gundel L, Hammond SK, Hovell MF, et al. Environmental monitoring of secondhand smoke exposure. *Tob Control*. 2013 May;22(3):147-55.

Arechabala B, Coiffard C, Rivalland P, Coiffard LJ, de Roeck-Holtzhauer Y. Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. *J Appl Toxicol*. 1999 May-Jun;19(3):163-5.

Asma S, Mackay J, Song SY, Zhao L, Morton J, Palipudi KM, et al. *The GATS Atlas*. Atlanta: CDC Foundation; 2015.

Bahl V, Jacob P 3rd, Havel C, Schick SF, Talbot P. Thirdhand cigarette smoke: factors affecting exposure and remediation. *PLoS One*. 2014 Oct 6;9(10):e108258.

Bahl V, Shim HJ, Jacob P 3rd, Dias K, Schick SF, Talbot P. Thirdhand smoke: Chemical dynamics, cytotoxicity, and genotoxicity in outdoor and indoor environments. *Toxicol In Vitro*. 2015a Dec 9. pii: S0887-2333(15)30028-X. [Epub ahead of print]

Bahl V, Weng NJ, Schick SF, Sleiman M, Whitehead J, Ibarra A, et al. Cytotoxicity of Thirdhand Smoke and Identification of Acrolein as a Volatile Thirdhand Smoke Chemical That Inhibits Cell Proliferation. *Toxicol Sci*. 2015b Dec 29. pii: kfv327. [Epub ahead of print]

Balbani APS, Mantovani JC. Métodos para abandono do tabagismo e tratamento da dependência de nicotina. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2005 Nov/Dec;71(6):820-7.

Becquemin MH, Bertholon JF, Bentayeb M, Attoui M, Ledur D, Roy F, et al. Third-hand smoking: indoor measurements of concentration and sizes of cigarette smoke particles after resuspension. *Tob Control.* 2010 Aug;19(4):347-8.

Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.* 2005;11:127-52.

Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol In Vitro.* 1988;2(1):1-6.

Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett.* 1985 Feb-Mar;24(2-3):119-24.

Bratan A, Mincea MM, Lupşa IR, Pirtea MG, Ostafe V. Assessment of nicotine for second hand smoke exposure in some public places in Romania by UPLC-MS. *Chem Cent J.* 2014 May 3;8:29.

Burton A. Does the smoke ever really clear? Thirdhand smoke exposure raises new concerns. *Environ Health Perspect.* 2011 Feb;119(2):A70-4.

Butler M. *Animal cell culture and technology.* 2a Ed. London, England: Taylor & Francis; 2004.

Carlini EA, Galduróz JCF, Noto AR. *II Levantamento Domiciliar sobre o Uso de Drogas Psicotrópicas no Brasil: Estudo Envolvendo as 108 Maiores Cidades do País – 2005.* Brasília: Secretaria Nacional Antidrogas; 2007.

Castro HA, Gouveia N, Escamilla-Cejudo JA. Questões metodológicas para a investigação dos efeitos da poluição do ar na saúde. *Rev Bras Epidemiol.* 2003 Jun;6(2):135-49.

Česen MH, Pegan K, Spes A, Turk B. Lysosomal pathways to cell death and their therapeutic applications. *Exp Cell Res.* 2012 Jul 1;318(11):1245-51.

Chen JJ, Ho SY, Wang MP, Lam TH. Reactions to Thirdhand Smoke are Associated with Openness to Smoking in Young Never Smoking Children. *J Community Health.* 2015 Oct 27. [Epub ahead of print]

Counts ME, Hsu FS, Tewes FJ. Development of a commercial cigarette “market map” comparison methodology for evaluating new or non-conventional cigarettes. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2006 Dec;46(3):225–42.

Daisey JM, Mahanama KR, Hodgson AT. Toxic volatile organic compounds in simulated environmental tobacco smoke: emission factors for exposure assessment. *J Expo Anal Environ Epidemiol.* 1998 Jul-Sep;8(3):313-34.

Das A, Bhattacharya A, Chakrabarti G. Cigarette smoke extract induces disruption of structure and function of tubulin-microtubule in lung epithelium cells and in vitro. *Chem Res Toxicol*. 2009 Mar 16;22(3):446-59.

Destailats H, Singer BC, Lee SK, Gundel LA. Effect of ozone on nicotine desorption from model surfaces: evidence for heterogeneous chemistry. *Environ Sci Technol*. 2006 Mar 15;40(6):1799-805.

Dhar P. Measuring tobacco smoke exposure: quantifying nicotine/cotinine concentration in biological samples by colorimetry, chromatography and immunoassay methods. *J Pharm Biomed Anal*. 2004 Apr 1;35(1):155-68.

Dogar OF, Pillai N, Safdar N, Shah SK, Zahid R, Siddiqi K. Second-hand smoke and the risk of tuberculosis: a systematic review and a meta-analysis. *Epidemiol Infect*. 2015 Nov;143(15):3158-72.

Doll R, Hill AB. Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. *Br Med J*. 1950 Sep 30;2(4682):739-48.

Drehmer JE, Ossip DJ, Rigotti NA, Nabi-Burza E, Woo H, Wasserman RC, et al. Pediatrician interventions and thirdhand smoke beliefs of parents. *Am J Prev Med*. 2012 Nov;43(5):533-6.

Dreyfuss JH. Thirdhand smoke identified as potent, enduring carcinogen. *CA Cancer J Clin*. 2010 Jul-Aug;60(4):203-4.

Dybing E, Schwarze PE, Nafstad P, Victorin K, Penning TM. Chapter 7. Polycyclic aromatic hydrocarbons in ambient air and cancer. In: Straif K, Cohen A, Samet J. IARC Scientific Publication No. 161: Air Pollution and Cancer. Geneva: International Agency for Research on Cancer; 2013. P. 75-94.

Escoffery C, Bundy L, Carvalho M, Yembra D, Haardörfer R, Berg C, Kegler MC. Third-hand smoke as a potential intervention message for promoting smoke-free homes in low-income communities. *Health Educ Res*. 2013 Oct;28(5):923-30.

Eze IC, Schaffner E, Zemp E, Von Eckardstein A, Turk A, Bettschart R, et al. Environmental tobacco smoke exposure and diabetes in adult never-smokers. *Environ Health*. 2014 Sep 25;13:74.

Ferrante G, Simoni M, Cibella F, Ferrara F, Liotta G, Malizia V, et al. Third-hand smoke exposure and health hazards in children. *Monaldi Arch Chest Dis*. 2013 Mar;79(1):38-43.

Fleming T, Anderson C, Amin S, Ashley J. Third-hand tobacco smoke: Significant vector for PAH exposure or non-issue? *Integr Environ Assess Manag*. 2012 Oct;8(4):763-4.

Florescu A, Ferrence R, Einarson T, Selby P, Soldin O, Koren G. Methods for quantification of exposure to cigarette smoking and environmental tobacco smoke: focus on developmental toxicology. *Ther Drug Monit*. 2009 Feb;31(1):14-30.

Fortmann AL, Romero RA, Sklar M, Pham V, Zakarian J, Quintana PJ, et al. Residual tobacco smoke in used cars: futile efforts and persistent pollutants. *Nicotine Tob Res.* 2010 Oct;12(10):1029-36.

Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett.* 2006 Jan 5;160(2):171-7.

Freshney RI. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique.* 6th Ed. Hoboken: y John Wiley & Sons, Inc.; 2010.

Fukano Y, Ogura M, Eguchi K, Shibagaki M, Suzuki M. Modified procedure of a direct in vitro exposure system for mammalian cells to whole cigarette smoke. *Exp Toxicol Pathol.* 2004 Mar;55(5):317-23.

Fukano Y, Oishi M, Chibana F, Numazawa S, Yoshida T. Analysis of the expression of heme oxygenase-1 gene in human alveolar epithelial cells exposed to cigarette smoke condensate. *J Toxicol Sci.* 2006 May;31(2):99-109.

Ganjre AP, Sarode GS. Third hand smoke - A hidden demon. *Oral Oncol.* 2016 Mar;54:e3-4.

Geiss O, Kotzias D. Tobacco, cigarettes and cigarette smoke – an overview. Luxemburgo: European Commission, Institute for Health and Consumer Protection; 2007.

Goniewicz ML, Lee L. Electronic cigarettes are a source of thirdhand exposure to nicotine. *Nicotine Tob Res.* 2015 Feb;17(2):256-8.

Guerra MP. A abstenção Tabágica: reflexões sobre a recaída. *Aná Psicológica.* 2004 Set;22(3):507-18.

Hammer TR, Fischer K, Mueller M, Hoefer D. Effects of cigarette smoke residues from textiles on fibroblasts, neurocytes and zebrafish embryos and nicotine permeation through human skin. *Int J Hyg Environ Health.* 2011 Sep;214(5):384-91.

Hammond EC. The association between smoking habits and death rates. *Am J Public Health Nations Health.* 1958 Nov;48(11 Pt 1):1460-8.

Hang B, Sarker AH, Havel C, Saha S, Hazra TK, Schick S, et al. Thirdhand smoke causes DNA damage in human cells. *Mutagenesis.* 2013 Jul;28(4):381-91.

He J, Vupputuri S, Allen K, Prerost Mr, Hughes J, Whelton Pk. Passive smoking and the risk of coronary heart disease--a meta-analysis of epidemiologic studies. *N Engl J Med.* 1999 Mar 25;340(12):920-6.

Hecht SS, Carmella SG, Foiles PG, Murphy SE. Biomarkers for human uptake and metabolic activation of tobacco-specific nitrosamines. *Cancer Res.* 1994 Apr 1;54(7 Suppl):1912s-1917s.

Hecht SS. Progress and Challenges in Selected Areas of Tobacco Carcinogenesis. *Chem Res Toxicol*. 2008 Jan;21(1):160-71.

Hein HO, Suadican P, Skov P, Gyntelberg F. Indoor dust exposure: an unnoticed aspect of involuntary smoking. *Arch Environ Health*. 1991 Mar-Apr;46(2):98-101.

Hoh E, Hunt RN, Quintana PJ, Zakarian JM, Chatfield DA, Wittry BC, et al. Environmental tobacco smoke as a source of polycyclic aromatic hydrocarbons in settled household dust. *Environ Sci Technol*. 2012 Apr 3;46(7):4174-83.

Homa DM, Neff LJ, King BA, Caraballo RS, Bunnell RE, Babb SD, et al. Vital signs: disparities in nonsmokers' exposure to secondhand smoke--United States, 1999-2012. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2015 Feb 6;64(4):103-8.

Hur K, Liang J, Lin SY. The role of secondhand smoke in sinusitis: a systematic review. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2014 Jan;4(1):22-8.

Institute of Medicine. Secondhand Smoke Exposure and Cardiovascular Effects: Making Sense of the Evidence. Washington (DC): National Academies Press (US); 2010.

Instituto Nacional do Câncer. A situação do tabagismo no Brasil: dados dos inquéritos do Sistema Internacional de Vigilância, da Organização Mundial da Saúde, realizado no Brasil entre 2002 e 2009. Rio de Janeiro: Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva; 2011.

International Agency for Research on Cancer - IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2010;92:1-853.

International Agency for Research on Cancer - IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2004;83:1-1438.

International Agency for Research on Cancer. Smoking Tobacco. In: IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Personal habits and indoor combustions. Volume 100 E. A review of human carcinogens. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*. 2012;100(Pt E):1-538.

International Agency for Research on Cancer. Tobacco Habits other than Smoking; Betel-Quid and Areca-Nut Chewing; and some Related Nitrosamines. *IARC Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum*. 1985 Sep;37:1-268.

Invernizzi G, Ruprecht A, De Marco C, Paredi P, Boffi R. Residual tobacco smoke: measurement of its washout time in the lung and of its contribution to environmental tobacco smoke. *Tob Control*. 2007 Feb;16(1):29-33.

Invernizzi G, Ruprecht A, Mazza R, Rossetti E, Sasco A, Nardini S, et al. Particulate matter from tobacco versus diesel car exhaust: an educational perspective. *Tob Control*. 2004 Sep;13(3):219-21.

Jaakkola MS, Jaakkola JJK. Assessment of exposure to environmental tobacco smoke. *Eur Respir J*. 1997 Oct;10(10):2384–97.

Jenkins RA, Guerin MR, Tomkins B. The chemistry of environmental tobacco smoke: composition and measurement. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press; 2000.

Johnson KC, Glantz SA. Evidence secondhand smoke causes breast cancer in 2005 stronger than for lung cancer in 1986. *Prev Med*. 2008 Jun;46(6):492-6.

Johnson MD, Schilz J, Djordjevic MV, Rice JR, Shields PG. Evaluation of in vitro assays for assessing the toxicity of cigarette smoke and smokeless tobacco. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Dec;18(12):3263-304.

Jung JW, Ju YS, Kang HR. Association between parental smoking behavior and children's respiratory morbidity: 5-year study in an urban city of South Korea. *Pediatr Pulmonol*. 2012 Apr;47(4):338-45.

Kabir Z, Connolly GN, Alpert HR. Secondhand smoke exposure and neurobehavioral disorders among children in the United States. *Pediatrics*. 2011 Aug;128(2):263-70.

Karim ZA, Alshbool FZ, Vemana HP, Adhami N, Dhall S, Espinosa EV, Martins-Green M, Khasawneh FT. Third-hand Smoke: Impact on Hemostasis and Thrombogenesis. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2015 Aug;66(2):177-82.

Kassem NO, Daffa RM, Liles S, Jackson SR, Kassem NO, Younis MA, et al. Children's exposure to secondhand and thirdhand smoke carcinogens and toxicants in homes of hookah smokers. *Nicotine Tob Res*. 2014 Jul;16(7):961-75.

Kaushik G, Kaushik T, Khanduja S, Pathak CM, Khanduja KL. Cigarette smoke condensate promotes cell proliferation through disturbance in cellular redox homeostasis of transformed lung epithelial type-II cells. *Cancer Lett*. 2008 Oct 18;270(1):120-31.

Kawachi I, Colditz GA, Speizer FE, Manson JE, Stampfer MJ, Willett WC, et al. A prospective study of passive smoking and coronary heart disease. *Circulation*. 1997 May 20;95(10):2374-9.

Kim H, Yoon SC, Lee TY, Jeong D. Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. *Toxicol Lett*. 2009 Jan 10;184(1):13-7.

Kuschner WG, Reddy S, Mehrotra N, Paintal HS. Electronic cigarettes and thirdhand tobacco smoke: two emerging health care challenges for the primary care provider. *Int J Gen Med*. 2011 Feb 1;4:115-20.

Law MR, Morris JK, Wald NJ. Environmental tobacco smoke exposure and ischaemic heart disease: an evaluation of the evidence. *BMJ*. 1997 Oct 18;315(7114):973-80.

Lioy PJ. Employing dynamical and chemical processes for contaminant mixtures outdoors to the indoor environment: the implications for total human

exposure analysis and prevention. *J Expo Sci Environ Epidemiol*. 2006 May;16(3):207-24.

López MJ, Nebot M. Nicotine measurement as an airborne marker of environmental tobacco smoke. *Gac Sanit*. 2003;17(Suppl 3):15-22.

Lupu AR, Popescu T. The noncellular reduction of MTT tetrazolium salt by TiO₂ nanoparticles and its implications for cytotoxicity assays. *Toxicol In Vitro*. 2013 Aug;27(5):1445-50.

Malich G, Markovic B, Winder C. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology*. 1997 Dec 31;124(3):179-92.

Martins-Green M, Adhami N, Frankos M, Valdez M, Goodwin B, Lyubovitsky J, et al. Cigarette smoke toxins deposited on surfaces: implications for human health. *PLoS One*. 2014 Jan 29;9(1):e86391.

Matt GE, Fortmann AL, Quintana PJ, Zakarian JM, Romero RA, Chatfield DA, et al. Towards smoke-free rental cars: an evaluation of voluntary smoking restrictions in California. *Tob Control*. 2013 May;22(3):201-7.

Matt GE, Quintana PJ, Destailats H, Gundel LA, Sleiman M, Singer BC, et al. Thirdhand tobacco smoke: emerging evidence and arguments for a multidisciplinary research agenda. *Environ Health Perspect*. 2011b Sep;119(9):1218-26.

Matt GE, Quintana PJ, Fortmann AL, Zakarian JM, Galaviz VE, Chatfield DA, et al. Thirdhand smoke and exposure in California hotels: non-smoking rooms fail to protect non-smoking hotel guests from tobacco smoke exposure. *Tob Control*. 2014 May;23(3):264-72.

Matt GE, Quintana PJ, Hovell MF, Bernert JT, Song S, Novianti N, et al. Households contaminated by environmental tobacco smoke: sources of infant exposures. *Tob Control*. 2004 Mar;13(1):29-37.

Matt GE, Quintana PJ, Hovell MF, Chatfield D, Ma DS, Romero R, et al. Residual tobacco smoke pollution in used cars for sale: air, dust, and surfaces. *Nicotine Tob Res*. 2008b Sep;10(9):1467-75.

Matt GE, Quintana PJ, Zakarian JM, Fortmann AL, Chatfield DA, Hoh E, et al. When smokers move out and non-smokers move in: residential thirdhand smoke pollution and exposure. *Tob Control*. 2011a Jan;20(1):e1.

Matt GE, Romero R, Ma DS, Quintana PJ, Hovell MF, Donohue M, et al. Tobacco use and asking prices of used cars: prevalence, costs, and new opportunities for changing smoking behavior. *Tob Induc Dis*. 2008a Jul 31;4:2.

Minamikawa T, Williams DA, Bowser DN, Nagley P. Mitochondrial permeability transition and swelling can occur reversibly without inducing cell death in intact human cells. *Exp Cell Res*. 1999 Jan 10;246(1):26-37.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Diretoria de Prevenção e Vigilância (DPV). Programa Nacional de Controle do Tabagismo e Outros Fatores de Risco de Câncer. INCA; 2003.

Moir D, Rickert WS, Levasseur G, Larose Y, Maertens R, White P, et al. A comparison of mainstream and sidestream marijuana and tobacco cigarette smoke produced under two machine smoking conditions. *Chem Res Toxicol*. 2008 Feb;21(2):494-502.

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.

Musk AW, de Klerk NH. History of tobacco and health. *Respirology*. 2003 Sep;8(3):286-90.

National Institutes of Health. Background Review Document (BRD): Validation of Neutral Red Uptake Test Methods NIH/In Vitro Cytotoxicity Test Methods for Estimating Acute Oral Systemic Toxicity. Publication No. 07-4518, November 2006. Available at: http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/acutetox_docs/BRD_TMER/BRDvol1_Nov2006.pdf Accessed on 16 April 2014.

National Institutes of Health. Report of the International Workshop on In Vitro Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity. NIH Publication No. 01-4499. 2001. National Institute for Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC. Available at: <http://www.epa.gov/hpv/pubs/general/nih2001a.pdf> Accessed on 16 April 2014.

Navas-Acien A, Peruga A, Breysse P, Zavaleta A, Blanco-Marquizo A, Pitarque R, et al. Secondhand Tobacco Smoke in Public Places in Latin America, 2002-2003. *JAMA*. 2004 Jun;291(22):2741-5.

Nebot M, López MJ, Gorini G, Neuberger M, Axelsson S, Pilali M, et al. Environmental tobacco smoke exposure in public places of European cities. *Tob Control*. 2005 Feb;14(1):60-3.

Nelson, PR, Conrad FW, Kelly SP, Maiolo KC, Richardson JD, Ogden MW. Composition of environmental tobacco smoke (ETS) from international cigarettes part II: Nine country follow-up. *Environ Int*. 1998 Apr;24(3):251-7.

Northrup TF, Matt GE, Hovell MF, Khan AM, Stotts AL. Thirdhand Smoke in the Homes of Medically Fragile Children: Assessing the Impact of Indoor Smoking Levels and Smoking Bans. *Nicotine Tob Res*. 2015a Aug 26. pii: ntv174. [Epub ahead of print]

Northrup TF, Khan AM, Jacob P 3rd, Benowitz NL, Hoh E, Hovell MF, et al. Thirdhand smoke contamination in hospital settings: assessing exposure risk for vulnerable paediatric patients. *Tob Control*. 2015b Dec 3. pii: tobaccocontrol-2015-052506.

Okoli CTC, Kelly T, Hahn EJ. Secondhand smoke and nicotine exposure: A

brief review. *Addict Behav.* 2007 Oct;32(10):1977-88.

Oliveira MJ, Franco I, Gonçalves A, Pascoal I. O Tabagismo em Terceira Mão: Um Conceito a (Re) Lembrar! *Acta Med Port.* 2015 Sep-Oct;28(5):676-677.

Panagiotakos DB, Chrysoshoou C, Pitsavos C, Papaioannou I, Skoumas J, Stefanadis C, et al. The association between secondhand smoke and the risk of developing acute coronary syndromes, among non-smokers, under the presence of several cardiovascular risk factors: The CARDIO2000 case-control study. *BMC Public Health.* 2002 May 24;2:9.

Passos VMA, Giatti L, Barreto SM. Passive smoking in Brazil: results from the 2008 Special Survey on Smoking. *Cien Saude Colet.* 2011 Sep;16(9):3671-8.

Patskan GJ, Podraza KF, Meurrens K, Coggins CR, Friedrichs B, Gerstenberg B, et al. Toxicological comparisons of three styles of a commercial U.S. cigarette (Marlboro with the 1R4F reference cigarette. *Inhal Toxicol.* 2008 May;20(7):695–721.

Peng L, Wang B, Ren P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2005 Oct 10;45(2):108-11.

Petrick L, Destailats H, Zouev I, Sabach S, Dubowski Y. Sorption, desorption, and surface oxidative fate of nicotine. *Phys Chem Chem Phys.* 2010 Sep 21;12(35):10356-64.

Petrick L, Sleiman M, Dubowski Y, Gundel LA, Destailats H. Tobacco smoke aging in the presence of ozone: A room-sized chamber study. *Atmos Environ.* 2011 Sep;45(28):4959-65.

Petrick LM, Svidovsky A, Dubowsky Y. Thirdhand Smoke: Heterogeneous Oxidation of Nicotine and Secondary Aerosol Formation in the Indoor Environment. *Environ Sci Technol* 2011; 45(1):328-33.

Piersma AH. Alternative methods for developmental toxicity testing. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2006 May;98(5):427-31.

Protano C, Vitali M. The new danger of thirdhand smoke: why passive smoking does not stop at secondhand smoke. *Environ Health Perspect.* 2011 Oct;119(10):A422.

Quintana PJ, Matt GE, Chatfield D, Zakarian JM, Fortmann AL, Hoh E. Wipe sampling for nicotine as a marker of thirdhand tobacco smoke contamination on surfaces in homes, cars, and hotels. *Nicotine Tob Res.* 2013 Sep;15(9):1555-63.

Ramírez N, Ozel MZ, Lewis AC, Marcé RM, Borrull F, Hamilton JF. Exposure to nitrosamines in thirdhand tobacco smoke increases cancer risk in non-smokers. *Environ Int.* 2014;71:139-47.

Ramírez N, Vallecillos L, Lewis AC, Borrull F, Marcé RM, Hamilton JF. Comparative study of comprehensive gas chromatography-nitrogen

chemiluminescence detection and gas chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry for determining nicotine and carcinogen organic nitrogen compounds in thirdhand tobacco smoke. *J Chromatogr A*. 2015 Dec 24;1426:191-200.

Rehan VK, Sakurai R, Torday JS. Thirdhand smoke: a new dimension to the effects of cigarette smoke on the developing lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2011 Jul;301(1):L1-8.

Rendón AD, Unger JB, Cruz T, Soto DW, Baezconde-Garbanati L. Perceptions of Secondhand and Thirdhand Smoke Among Hispanic Residents of Multiunit Housing. *J Immigr Minor Health*. 2015 Nov 6. [Epub ahead of print]

Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc*. 2008;3(7):1125-31.

Rickert WS. Background paper: Environmental tobacco smoke: properties, measurement techniques and applications. International Consultation on Environmental Tobacco Smoke and Child Health. World Health Organization, 1999. Documento disponível em: <http://www.who.int/toh/TFI/consult.htm>. Acesso em 24 set. 2015.

Roemer E, Tewes FJ, Meisgen TJ, Veltel DJ, Carmines EL. Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 3: in vitro genotoxicity and cytotoxicity. *Food Chem Toxicol*. 2002 Jan;40(1):105-11.

Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Mat Res*. 2003 Jun;6(3):317-320.

Rosemberg J. Nicotina. Droga Universal. São Paulo: SES/CVE; 2003.

Samet JM, Chanson D, Wipfli H. The Challenges of Limiting Exposure to THS in Vulnerable Populations. *Current Environmental Health Reports*. 2015 Sep;2(3):215-25.

Schick S, Glantz S. Philip Morris toxicological experiments with fresh sidestream smoke: more toxic than mainstream smoke. *Tob Control*. 2005 Dec;14(6):396-404.

Schick SF, Farraro KF, Perrino C, Sleiman M, van de Vossenberg G, Trinh MP, et al. Thirdhand cigarette smoke in an experimental chamber: evidence of surface deposition of nicotine, nitrosamines and polycyclic aromatic hydrocarbons and de novo formation of NNK. *Tob Control*. 2014 Mar;23(2):152-9.

Schick SF, Glantz SA. Sidestream cigarette smoke toxicity increases with aging and exposure duration. *Tob Control*. 2006 Dec;15(6):424-9.

Schick SF. Thirdhand smoke: here to stay. *Tob Control*. 2011 Jan;20(1):1-3.

Shoemaker M, Cohen I, Campbell M. Reduction of MTT by aqueous herbal extracts in the absence of cells. *J Ethnopharmacol*. 2004 Aug;93(2-3):381-4.

Silva CAR. Composição Química da Fumaça do Cigarro. In: Viegas CAA. Diretrizes para a Cessação do Tabagismo. J Bras Pneumol. 2004;30(Supl 2):8-10.

Singer BC, Hodgson AT, Nazaroff WW. Gas-phase organics in environmental tobacco smoke: 2. Exposure-relevant emission factors and indirect exposure from habitual smoking. Atmos Environ. 2003;37(39-40):5551-61.

Sleiman M, Destailats H, Smith JD, Liu C, Ahmed M, Wilson KR, et al. Secondary organic aerosol formation from ozone-initiated reactions with nicotine and secondhand tobacco smoke. Atmos Environ. 2010b;44(34):4191-8.

Sleiman M, Gundel LA, Pankow JF, Jacob P 3rd, Singer BC, Destailats H. Formation of carcinogens indoors by surface-mediated reactions of nicotine with nitrous acid, leading to potential thirdhand smoke hazards. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010a;107(15):6576-81.

Sleiman M, Logue JM, Luo W, Pankow JF, Gundel LA, Destailats H. Inhalable constituents of thirdhand tobacco smoke: chemical characterization and health impact considerations. Environ Sci Technol. 2014 Nov 18;48(22):13093-101.

Sureda X, Fernández E, López MJ, Nebot M. Secondhand tobacco smoke exposure in open and semi-open settings: a systematic review. Environ Health Perspect. 2013 Jul;121(7):766-73.

Thomas JL, Guo H, Carmella SG, Balbo S, Han S, Davis A, et al. Metabolites of a tobacco-specific lung carcinogen in children exposed to secondhand or thirdhand tobacco smoke in their homes. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2011 Jun;20(6):1213-21.

Thomas JL, Hecht SS, Luo X, Ming X, Ahluwalia JS, Carmella SG. Thirdhand tobacco smoke: a tobacco-specific lung carcinogen on surfaces in smokers' homes. Nicotine Tob Res. 2014 Jan;16(1):26-32.

Tillett T. Thirdhand smoke in review: research needs and recommendations. Environ Health Perspect. 2011 Sep;119(9):a399.

Triglia D, Sherard Braa S, Yonan C, Naughton GK. Cytotoxicity testing using neutral red and MTT assays on a three-dimensional human skin substrate. Toxicol In Vitro. 1991;5(5-6):573-8.

Tuma RS. Thirdhand smoke: studies multiply, catchy name raises awareness. J Natl Cancer Inst. 2010 Jul 21;102(14):1004-5.

U.S. Department of Health and Human Services. The Health Consequences of Smoking: Nicotine Addiction. A Report of the Surgeon General. Atlanta (GA): U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, 1988. DHHS Publication No. (CDC) 88-8406.

U.S. Department of Health and Human Services. The Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke: A Report of the Surgeon General. Washington, DC: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Coordinating Center for Health Promotion, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health; 2006.

U.S. Department of Health and Human Services. *The Health Consequences of smoking-50 years of progress: A Report of the Surgeon General*. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health; 2014.

U.S. Department of Health and Human Services. The Health Consequences of Involuntary Smoking. A Report of the Surgeon General. Rockville (MD): U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control, Center for Health Promotion and Education, Office on Smoking and Health; 1986. DHHS Publication No. (CDC) 87-8398.

U.S. Environmental Protection Agency. Respiratory health effects of passive smoking: lung cancer and other disorders., Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, Office of Health and Environmental Assessment; 1992.

Ueta I, Saito Y, Teraoka K, Miura T, Jinno K. Determination of volatile organic compounds for a systematic evaluation of third-hand smoking. *Anal Sci*. 2010;26(5):569-74.

Van Deusen A, Hyland A, Travers MJ, Wang C, Higbee C, King BA, et al. Secondhand smoke and particulate matter exposure in the home. *Nicotine Tob Res*. 2009 Jun;11(6):635-41.

Vanden Berghe T, Grootjans S, Goossens V, Dondelinger Y, Krysko DV, Takahashi N, et al. Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods*. 2013 Jun 1;61(2):117-29.

Winickoff JP, Friebely J, Tanski SE, Sherrod C, Matt GE, Hovell MF, et al. Beliefs about the health effects of "thirdhand" smoke and home smoking bans. *Pediatrics*. 2009 Jan;123(1):e74-9.

Woodward A, al-Delaimy W. Measures of exposure to environmental tobacco smoke. Validity, precision, and relevance. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;895:156-72.

World Health Organization. Air quality guidelines for Europe. 2nd Edition. Copenhagen: WHO Regional Publications, European Series, No. 91; 2000.

World Health Organization. Framework Convention on Tobacco Control. Geneva, Switzerland. 2003. Documento disponível em: <http://www.who.int/fctc/text_download/en/index.html>. Acesso em 25 jun. 2008.

World Health Organization. Health aspects related to indoor air quality. WHO Regional Office for Europe. Reports and Studies. Nº 21. 1979.

World Health Organization. Regional Office for Europe, and World Health Organization. Air quality guidelines: global update 2005: particulate matter, ozone, nitrogen dioxide, and sulfur dioxide. World Health Organization, 2006.

World Health Organization. Selected pollutants: WHO guideline for indoor air quality. Geneva: World Health Organization; 2010. Documento disponível em: <http://www.who.int/indoorair/publications/9789289002134/en/>. Acesso em 24 set. 2015.

World Health Organization. WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2008: The MPOWER Package. 2008. Documento disponível em: <<http://www.who.int/tobacco/mpower>>. Acesso em 25 jun. 2008.

World Health Organization. WHO Report on the Global Tobacco Epidemic, 2011: Warning about the dangers of tobacco. 2011. Documento disponível em: <http://www.who.int/tobacco/global_report/2011/en/>. Acesso em 21 set. 2015.

World Health Organization. World health statistics 2015. 2015. Documento disponível em: http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/en/. Acesso em 18 set. 2015.

Xu B, Chen M, Yao M, Ji X, Mao Z, Tang W, et al. Metabolomics reveals metabolic changes in male reproductive cells exposed to thirdhand smoke. Sci Rep. 2015 Oct 22;5:15512.

Zhang SZ, Lipsky MM, Trump BF, Hsu IC. Neutral red (NR) assay for cell viability and xenobiotic-induced cytotoxicity in primary cultures of human and rat hepatocytes. Cell Biol Toxicol. 1990 Apr;6(2):219-34.

Zucco F, De Angelis I, Testai E, Stamatii A. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. Toxicol In Vitro. 2004 Apr;18(2):153-63.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Avaliar a toxicidade do THS *in vitro*.

Objetivos Específicos:

- Detectar e mensurar os níveis de nicotina em superfícies expostas à fumaça de cigarro;
- Avaliar diferentes materiais e tempos de exposição para modelo de coleta do THS;
- Estabelecer um protocolo para a recuperação de nicotina proveniente do THS;
- Detectar e mensurar os níveis de nicotina no THS;
- Comparar os níveis de nicotina em residências de fumantes e não fumantes;
- Avaliar os efeitos do THS sobre o número de células, a atividade mitocondrial e viabilidade lisossomal em três linhagens celulares.

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1. Artigo Científico 1

Cellular effects of thirdhand tobacco smoke from smokers' homes

(submetido para *Human & Experimental Toxicology* como Original Research)

Luciana Rizzieri Figueiró, MSc.

Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA)

Rua Sarmento Leite 245

CEP 90050-170 Porto Alegre / RS - Brasil

Rafael Linden, PhD.

Toxicology Laboratory, Institute of Health Sciences, Feevale University

RS-239, nº 2755, Subsolo do Prédio Vermelho

CEP 93352-000 Novo Hamburgo / RS – Brasil

Ana Luiza Ziulkoski, PhD.

Cytotoxicity Laboratory, Institute of Health Sciences, Feevale University

RS-239, nº 2755, Prédio Vermelho – Sala 204, 2º andar

CEP 93352-000 Novo Hamburgo / RS – Brasil

Denise Conceição Mesquita Dantas, PhD.

Cellular Biology Laboratory, UFCSPA

Rua Sarmento Leite 245, sala 314

CEP 90050-170 Porto Alegre / RS – Brasil

*Corresponding author

Luciana Rizzieri Figueiró, MSc.

Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA)

Rua Sarmento Leite 245 CEP 90050-170 Porto Alegre / RS – Brasil

rizzieri@ufcspa.edu.br / lucianarizzieri@gmail.com

SUMMARY

After the cigarette is extinguished, many toxic compounds remain in the environment and accumulate in the air or on surfaces. This exposure is termed Thirdhand Smoke (THS) and its risks are poorly known. The aim of the study was to evaluate the cellular effects of THS from smokers' homes. Papers were placed in nine smoker's home and three nonsmoker's homes. An area equivalent to the paper size was cleaned with cotton wipe. A549, Hep-2 and 3T3 cells were exposed to THS for 24 hours and cellular functions were assessed by MTT, Neutral Red reuptake (NR) and Trypan blue exclusion assays. High levels of nicotine were found in samples from smokers' homes. Cellular proliferation was similar in almost all samples after THS exposure. Changes in the cellular functions were observed, mainly higher mitochondrial activity, in paper samples. THS was able to cause changes in important cellular functions. The results demonstrated MTT, NR and Trypan assays may be performed in A549, Hep-2 and 3T3 cells to evaluate biological effects at the cellular level of THS exposure. This is the first study to evaluate the cellular effects of THS samples collected from smokers' homes.

Keywords: thirdhand tobacco smoke; environmental tobacco smoke; cytotoxicity; nicotine.

INTRODUCTION

Involuntary smoking is harmful to nonsmokers and environmental tobacco smoke (ETS) exposure is associated with diseases and premature death.¹ ETS increases the risks of worsening lung function, respiratory infections, cardiovascular diseases and lung cancer.² Because of strong scientific evidence of smoking damage, many federal and local laws banned smoking in public spaces worldwide.

Over the past few years, permanence of many compounds in tobacco smoke has been the focus of investigation. Various toxic compounds stay in the environment after the cigarette is extinguished and accumulate in the air or on surfaces and can remain in dust.^{3,4} Moreover, they can be re-emitted back into the gas phase or react with oxidants and other compounds in the environment to yield secondary pollutants.⁵ This exposure is termed Thirdhand Smoke (THS) also known as residual or aged tobacco smoke. ETS and THS co-exist during the early period of THS formation and in contaminated environments in which smoking takes place episodically.⁶ Whereas there is a public awareness about the harms of secondhand smoke (SHS), the knowledge about the dangers of THS is scarce.

Nicotine, which is the main marker of tobacco smoke, can stay days to a few months even if smoking does not become the environment.⁶ Nicotine persists in homes formerly occupied by smokers after they remain vacant for two months,⁷ therefore new residents are exposed to THS present in dust and on surfaces. The persistence of nicotine or biological exposure to THS pollutants was also found in hotel rooms, passenger compartment of pickup

truck and rental cars.⁸⁻¹⁰ THS chemicals can be retained on natural fibers for over 1.5 years after the last exposure to smoke.¹¹ THS in air, dust and on surfaces degrades slowly indoor and leads to multiple exposure routes such as inhalation, dermal absorption and involuntary ingestion.¹²

Volatile organic compounds (VOCs), polycyclic aromatic hydrocarbons and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), a tobacco-specific lung carcinogen, remain in the environment after the cigarette is extinguished.¹³⁻¹⁵ Substances absent in fresh smoke are formed by nitrosation and oxidation reactions. This is the case of 4-(N-methyl-N-nitrosamino)-4-(3-pyridyl)butanal (NNA) and de novo formation of NNK, two nitrosamines with mutagenic or carcinogenic activity.^{9,16} THS is a major exposure pathway of tobacco-specific nitrosamines – TSNAs.¹⁷

Despite THS is seen with skepticism by some people,⁶ the risks posed by substances found in it cannot be ignored. Children exposed to THS, but not SHS, revealed increased chance in cough-related symptoms compared with non-exposed children.¹⁸ THS extract was genotoxic to human hepatocellular carcinoma cells even in acute exposure.¹⁹ A study with mice exposed for 24 weeks to THS found alterations in lipid level and fat in hepatocytes (steatosis), collagen production and inflammatory cytokines level as well as enhanced platelet aggregation and secretion, shortened bleeding time and increased risk of thrombosis.^{20,21} Low concentrations of THS, which are unable to cause significant cytotoxic effect, caused metabolic changes in two male reproductive murine cell lines.²² Ramírez et al. (2014) estimated the risk of developing cancer after exposure to carcinogens present in THS.¹⁷ The highest calculated risk was for children from 1 to 6 years exposed to settled house dust from

smokers' homes (9.6 additional cancer cases per 100,000 children exposed). In nonsmokers' homes, this estimation dropped for a third.

The data aforementioned provide preliminary evidence suggesting THS exposure can induce health effects. The risks of THS are still poorly known, and more biological evidence of THS toxicity is needed and whether it has any detrimental effects in human health. *In vitro* cytotoxicity assays can provide useful information for understanding the action of substances on cells and assess the toxicological impact of tobacco products. There were several *in vitro* studies about tobacco smoke.^{23,24} Neutral red (NR) uptake by lysosomes, MTT assay for mitochondrial viability and trypan blue exclusion test for cell viability not only produce significant data in a short period of time but they are also sensible and reproducible.²⁵ In addition, they have been used to assess the risks of SHS or their specific compounds.²⁶

In vitro assays based on smokers' homes measurements can provide biological evidence of THS toxicity to raise awareness of the risks of this exposure and encourage the protection of vulnerable populations. To date, no studies have been identified on real-world environmental to show the negative biological effects of THS. Studies confirming the detrimental effects of THS have yet to yield compelling evidence. Thus the purpose of this study was to assess, for the first time, the cellular effects of THS from smokers' homes in three mammalian cell lines.

METHODS

Field sample collection

A total of twelve houses samples were collected from private homes between August 2014 and September 2015 in urban area of Porto Alegre, Brazil. Residents were eligible to participate if they were 18 years old or older and they have lived in their current home for at least six months. Smoker homes (n=9) were those in which at least one resident have smoked indoor during at least five of the past six months, including the current and most recent month and week, and have smoked a minimum of five cigarettes per day inside the home during the week prior and current to collection of samples. Samples were taken from the room where the majority of indoor smoking was reported. Nonsmoker homes (n=3) were those where no smoker have lived and no visitors have smoked indoor during the past six months. A questionnaire was designed to collect information concerning the house and activities that might affect the outcome. A summary of the collected information is presented on Table 1. All the inhabitants stated to open the windows of the room daily.

THS samples were collected by exposing the cellulose chromatography papers (10 cm x 2.5 cm x 0.34 mm, Whatman 3MM 3030-861) to indoor air for one, three and seven days. The cellulose paper was secured in a frame made from clean aluminum foil and fixed in the wall or mobile wood to at least one meter from the floor and with no direct exposure sunlight. In the first day, cotton wipes (cosmetic 100% cotton facial wipes) were wetted with 1 - 2 mL water and wiped over a 28 cm² area. The samples were placed in a 50 mL conical centrifuge tubes and stored at -20°C. Surface wipe nicotine levels has reliably

distinguished indoor environments with smoke cigarette exposure and cellulose chromatography papers have also been used as an adsorption model of nicotine on surfaces.^{9,19,27} Due to the chemical properties of materials, both made of cellulose, the polar groups of nicotine and its derivatives form hydrogen bonds with hydroxyl groups of the materials and significant amounts of nicotine are retained and can be extracted with the use of aqueous or organic solvents.¹¹

Ascorbic acid in wipe sampling has been used to stabilize nicotine,^{12,27} however the formation of salts interferes in cellular assays. Moreover, in wood surfaces, distilled water is equivalent to the use of ascorbic acid solution for wiping,²⁷ therefore, preparation of samples without any preservative was preferred.

Written informed consent was obtained from all participants. All procedures were approved by the Ethics Committee of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (nº 1591/12).

Sample extraction

Each material was cut in small pieces and 25 mL Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) or 5 mL of methanol in twice were added (2 x 2.5 mL). Flasks were stirred and stored overnight at 4°C. Then, flasks were stirred again and the supernatant was recovered by a syringe. Paper and cotton wipes without smoke exposure were processed likewise and used as reference. The organic extract spiked with quinoline (320 ng/mL) as internal standard was used to quantify nicotine by gas chromatography–mass spectrometry (GC/MS) and

the aqueous extract to perform the cytotoxicity assays. The recovered medium was filtered by a 0.22 µm membrane and pH was adjusted if necessary.

GC/MS

Analyses were conducted by a Focus gas chromatograph coupled to a Thermo ISQ chromatograph (GC/MS) system, from Thermo Scientific (San Jose, USA). Chromatographic separation was performed in a 30 m DB-5 column with 0.25 mm internal diameter and 0.25 µm thick internal coating, at a constant helium flow rate of 1.2 ml/min. The column temperature was held at 100°C for 2 min and then increased at a rate of 15°C/min until reaching 180°C, which was maintained for further 4 min. The temperature was increased at a rate of 20°C/min until reaching 240°C for 0.5 min. The transfer line temperature was 280°C and the ion source temperature was 300°C. The ions monitored for nicotine were 84 (quantifying ion), 133 and 162 (qualifying ions). The ions monitored for the IS were 129 (quantifying ion), 76 and 102 (qualifying ions). Retention time was 6.94 min for nicotine and 5.92 min for IS.

Calibration curve was performed by spiking nicotine solution to chromatography papers at the final concentrations 50, 100, 200, 500, 1000, 1500 and 2000 ng/mL. Extraction of the papers was performed equally to samples. The determination coefficient of calibration curve range from $R^2=0.9943$ to $R^2=0.9979$.

Cell treatment

A549 cell line was kindly provided by PhD. Célia RM Bernardi, Federal University of Santa Catarina, Brazil. This human lung epithelial type-II cells line

was initiated in 1972 through explant culture of lung carcinomatous tissue from a 58-year-old Caucasian male.²⁸ Hep-2 cells were obtained from Rio de Janeiro Cell Bank, Brazil. These cells were isolated from tumors formed in rats that had received injections of epidermoid carcinoma tissue isolated from the larynx of a 56 years old male. This cell line is widely used in toxicity studies and it has good sensitivity to several xenobiotic agents.²⁹ Moreover, both the Hep-2 cells as the A549 cells were selected because the respiratory tract is an organ directly targeted by smoke cigarettes. The murine cell line NIH 3T3 were also obtained from Rio de Janeiro Cell Bank, Brazil. This cell line was established from *Mus musculus f. domestica* ("Swiss mouse") embryo fibroblasts and is one of the most commonly used fibroblast cell lines for *in vitro* assays.³⁰ This cell line is also employed to assess the toxicity of cigarette.²⁴

Cells were grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Cultures were maintained at 37°C in a humid atmosphere at 5% of CO₂ in a half-open system, and trypsinization was used for cell maintenance.

For THS exposure, A549, Hep-2 and 3T3 cells were seeded at a density of 1 to 2 x 10⁴ cells/well in a 96-well (MTT and NR assays) or 7 to 10 x 10⁴ cells/well in a 24-well polystyrene microplate (Trypan blue assay). After cultures reached semiconfluence, culture medium was replaced with DMEM + THS or DMEM + reference, and cells were exposed for 24 hours.

In a separate experiment, unexposed cells grown in standard culture medium were used as a control and they presented no difference in relation to DMEM with THS-free paper or cotton (data not shown).

Cytotoxicity assays

In order to evaluate cytotoxicity by the mitochondrial viability parameter, a 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay was performed as described by Mosmann (1983).³¹ Briefly, 20 μ L of MTT 1.67 mg/mL was added in each well and plates were incubated for two hours. After incubation, the medium was removed by inversion and 200 μ L of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to each well for solubilization. All samples were transferred to a 96-well plate and absorbance was measured at 570 nm with a microplate spectrophotometer.³² Reduction of the yellow tetrazole water soluble salt MTT to purple formazan salt by the action of succinate dehydrogenase in the inner mitochondrial membrane indicates mitochondrial viability status and reflects the number of viable cells.^{33,34}

Neutral red (NR) incorporation method, described by Borenfreund and Puerner (1985), was conducted to evaluate cytotoxicity through the lysosome viability.³⁵ Briefly, culture medium was removed and 200 μ L of DMEM without serum and containing 50 μ g/mL of NR was added to each well. After three hours of incubation at 37° C in humid atmosphere at 5% of CO₂, medium was removed and cells were washed successively with a buffered saline solution (PBS), fixative solution (1% CaCl₂ in 0.5% formaldehyde) and solution of 1% acetic acid in 50% ethanol for the solubilization of the dye. Samples were gently shaken for 10 minutes and transferred to a 96-well plate. Absorbance was measured at 540 nm with a microplate spectrophotometer.³² The dye trapped by the lysosome becomes charged, because of the low pH of the organelle, and it is unable to leave its interior. Damaged lysosomes lose this ability and lysosomal integrity is a highly sensitive indicator of cell viability.³⁶

The classic technique to assess plasma membrane integrity is via trypan blue exclusion assay: a negatively charged chromophore that only interacts with damaged cells. This feature allows discriminating between viable cells and cells with damaged membrane: unstained cells are viable and unviable cells turn blue.³⁷ After exposure, the effect of THS on cells was evaluated by 0.2% trypan blue dye exclusion analysis. The cell number was determined by counting the viable and nonviable cells via a hemocytometer. Percentage of viable cells from each well was calculated. The proliferation rate was calculated dividing the number of cells after the THS exposure by the initial plating number.

Data analysis

Based on nicotine concentration, samples of smokers' homes were stratified in Low THS (less than 10 ng/cm²), Moderate THS (between 10 to 50 ng/cm²) and High THS (above 50 ng/cm²). Cytotoxicity experiments were performed more than once in quintuplicate to confirm the validity of the observation. Results of the reference (unexposed paper or cotton) were normalized to 100% in each experiment, and the values of the groups were expressed as percentage of the reference. Pearson or Spearman's correlations were performed. The significance of differences within groups was determined by one-way ANOVA with Duncan post hoc test using IBM SPSS Statistics 19.0. The null hypothesis was rejected when $p < 0.05$ was obtained.

RESULTS

A summary of nicotine concentration in samples collected in smokers' and nonsmokers' homes is shown on Table 1. As expected, nicotine concentration was higher in smokers' homes than in nonsmokers' homes. Nicotine was detected only in one sample of the nonsmoker's home. There was no correlation between nicotine concentration and exposure time of the samples, since 1-day and 3-day samples exhibited similar levels (Spearman's $\rho=0.182$ and $\rho=0.285$, respectively). Cotton wipe samples presented higher variability in the values among the houses.

The correlation between nicotine concentration and the number of cigarettes smoked per day inside the home was investigated to determine the influence of tobacco smoke in THS composition. However, only trends of correlation were observed to one and three-day samples ($p=0.059$ and $p=0.054$, respectively). There was no correlation between nicotine concentrations with room size and years living in the house. Nicotine concentration was not altered by incense use ($p=0.859$).

Using the observed concentration of nicotine in smoker's and nonsmokers' homes samples, MTT, NR and Trypan blue assays were performed to assess the cytotoxicity of THS. In paper samples (Figure 1), THS affected the mitochondrial activity and lysosomal viability in A549 cells ($F_{4,197}=8.79$, $p<0.001$; $F_{4,210}=7.06$, $p<0.001$, respectively), in Hep-2 cells ($F_{4,198}=5.20$, $p=0.001$; $F_{4,209}=4.06$, $p=0.003$, respectively) and 3T3 cells ($F_{4,198}=11.22$, $p<0.001$; $F_{4,199}=5.03$, $p=0.001$, respectively). In summary, mitochondrial viability was higher in the group of Moderate or High THS and

lysosomal viability of High THS group was increased in A549 and Hep-2 cells but lower in 3T3 cells. In A549 and 3T3 cells, there was also change in the proliferation rate ($F_{4,81}=2.57$, $p=0.044$; $F_{4,81}=5.44$, $p=0.001$, respectively). Proliferation rate was higher in low THS of the A549 cells and lower in nonsmoker samples of 3T3 cells.

Figure 2 shows the cellular functions in cotton samples. There were also changes in MTT and NR assay in A549 cells ($F_{4,81}=4.92$, $p<0.001$; $F_{4,89}=4.18$, $p=0.004$, respectively) and Hep-2 cells ($F_{4,89}=4.71$, $p=0.002$; $F_{4,90}=14.16$, $p<0.001$, respectively). In 3T3 cells, there was difference in the MTT assay ($F_{4,88}=3.24$, $p=0.016$), which was increased in high THS group. Low THS presented higher mitochondrial activity in A549 cells and lower in Hep-2 cells in relation to reference. Only nonsmoker group had lysosomal viability equal to reference in A549 cells. Low THS group showed higher lysosomal viability in Hep-2 cells. Furthermore, percentage of viable cells was only lower in nonsmoker samples in 3T3 cells (89.4% vs about 97% of the other groups; $F_{4,33}=4.02$, $p=0.009$).

There was positive correlation between nicotine concentration and mitochondrial viability of Hep-2 cells to both paper (Pearson's $r=0.267$; $p=0.006$) and cotton samples ($r=0.641$; $p<0.001$). In 3T3 cells, there was a negative correlation between nicotine concentration and lysosomal viability to paper samples ($r=-0.381$; $p<0.001$) and a positive correlation between nicotine concentration and mitochondrial viability to cotton samples ($r=0.336$; $p=0.048$).

DISCUSSION

This is the first study to evaluate the cellular effects of THS based in real-world environments, i.e. THS samples collected in smokers' homes. Addressing the lack of knowledge about health impacts of THS exposure is relevant. Some changes in cellular functions were found in cells exposed to THS, mainly a higher relative activity in MTT assay.

As expected, compared to nonsmoker households, average contamination levels in smokers' homes were considerably higher, since only a sample of nonsmoker presented nicotine level above the quantification limit. Unexpectedly, it was not possible to detect nicotine in most of the samples from two smokers' homes. This may be due to different consumption than previously reported or the position of samples, which were arranged near the window and, consequently, with greater removal of compounds by ventilation. Moreover, due to sample position and climatic conditions, nicotine may have been degraded by heat and humidity.

Because airborne THS is more rapidly transported outside the home through passive air exchange and active ventilation, dust and surface are the main reservoirs of THS compounds.⁷ Plan a representative collection of samples is important. Surface wipe sampling has been successfully employed to assess THS contamination in various semiprivate environments such as cars, homes and hotels.^{7,8,10,27} However, papers worked as surrogates for indoor surfaces and exposed to cigarette smoke were used to provide samples to cellular assays.^{19,22} In our case, cotton wipe adsorbed the higher nicotine

concentrations. One-day THS exposure in smokers' homes was enough to determine nicotine at quantifiable levels and suitable for analysis.

The nicotine concentrations in our samples were equivalent magnitude of the results from Sleiman's study group;^{9,38} however, after proper conversion to the unit of measurement ($\mu\text{g}/\text{m}^2$), they were higher than the results from Matt's research lab.²⁷ There was no correlation between the exposure time of the samples and the nicotine level. This may be explained by the nature of THS, which is a dynamic mixture of chemical compounds liable to chemical transformations to substances not scrutinized in this study.⁶ These substances may change with the aging of the smoke and their stability and reactivity may alter the concentration.

THS compounds cling to skin, hair, clothes, furniture, walls, drapes, bedding, carpets and other surfaces but they may be removed by water-based (aqueous) remediation.¹¹ This property is important to understand many of the compounds of THS adsorbed on paper and cotton are transferred to the solution used to expose the cells. How each material (paper and cotton wipe, both made of cellulose) incorporates and releases substances is still an issue that must be enlightened. On the other hand, not all toxic compounds may be deposited in cellulose. For example, some volatile organic compounds, such as benzene, toluene and pyrrole are better adsorbed in acetate fabric.¹³ Therefore, the type of material for THS sampling has a direct impact on cellular outcomes due the substances which are adsorbed.

Recent research has shown THS can cause significant cellular changes.¹⁹ Study in reproductive murine cell lines showed cytotoxic effects by MTT assay only at higher concentrations.²² In these two studies, THS was

generated in laboratory with a chamber, and we were the first to investigate the cellular effects of THS in smokers' homes. Although the nicotine levels in our study are higher than nicotine surface in other studies, the procedure to prepare samples resulted in low concentration for cell exposure (in ng/mL units). This may have directly affected the results of the assays. Usually, a dose-dependent response in cytotoxicity tests with cigarette smoke condensate or whole smoke is noted.³⁹⁻⁴¹ In these studies, cytotoxic effects were seen as decreased mitochondrial and lysosomal viability. Nevertheless, we obtained increased mitochondrial activity not always accompanied by increased lysosomal viability, except in Hep-2 cells for cotton samples that showed lower mitochondrial functionality, but without reaching the threshold for toxicity, often standardized as viability below 70%.⁴² Toxicity is not always proportional to quantity. Synthetic car seat cover and carpet fabric exposed to smoke cigarette and aged for 60 days were not cytotoxic in the MTT cell assay. Yet terrycloth fabric exposed to smoke cigarette remained cytotoxic to mouse neural stem cells (mNSC), even after three months of exposure,⁴³ but not after five months of aging.⁴⁴

In our study, MTT and NR assays showed some cellular effects of the THS. These two checkpoints have been commonly used with a reasonable degree of success since they are based on cellular events that have direct or indirect relevance to cellular responses to chemicals *in vivo*.⁴⁵ Since the proliferation rate was equal in almost all samples of the smokers' homes, the changes found in MTT e NR assays reflect changes in cellular functions. Each of these assays assesses different functions^{46,47} and absence of damage does not indicate nonexistence of cellular injury, especially because only one time-

point was analyzed. Further researches should be performed to address the effects of the chronic exposure to THS.

Increased mitochondrial activity was found in all paper samples. Formazan can be produced even in the absence of proliferation: mitochondria may remain with intact succinate dehydrogenase activity even in dead cells;³¹ MTT reduction may occur by cytoplasm, endosome/lysosome compartment and the plasma membrane;⁴⁸ or the salt MTT may interact with some substance in the medium.^{49,50} Then, MTT assay measures metabolic activity rather viability. The results of the MTT reduction assay may reflect on antioxidant status. Nicotine has been implied in free radical generation in rodent and human cells as well as in the DNA damage by reactive oxygen species – ROS.⁵¹ Signs of oxidative stress caused by THS were found by Hang et al. (2013) and Xu et al. (2015).^{19,22} In the former study, oxidative damage caused stress-induced DNA lesions in normal human lung epithelial cells. The later noted oxidants in THS caused an adaptive response in murine spermatogonia cells. In our results, the increased mitochondrial activity may be due to an adaptive response to the THS effect before a permanent injury in an attempt to counteract the detrimental effects of ROS and oxidative stress caused by nicotine and other toxic compounds.

Neutral red assay is probably the most commonly used test for the assessment of cytotoxicity in tobacco products.²⁴ Lysosome is the terminal organelle of the endocytic pathway,⁴⁵ and decreased lysosomal viability was seen in 3T3 cells exposed to total particulate matter in tobacco smoke and in A549 cells exposed to whole smoke.^{41,52-54} There is no other study about the THS effects assessing the viability by NR assay. In our case, high THS caused

lower lysosomal viability only in 3T3 cells and paper samples and there was a slight increase in the other cells.

Studies on the cellular effects of nicotine have used a variety of functional endpoints in many different cell lines. Nicotine or other tobacco-related chemicals bind to multiple receptors, activate several highly signal transduction pathways and exert diverse cell-type specific effects.⁵¹ Other studies show stem cells were more sensitive than differentiated cells to electronic cigarette refill fluid and THS, by exhibiting less cell growth and motility and other cell morphological alterations.^{43,44,55} A549 cell were less sensitive than mNSC and human dermal fibroblast (hDF) to cytotoxic VOCs found in THS.⁴⁴ The differences in the responses to THS exposure in these cells lines may reflect distinct molecular mechanisms underlying function of these different cells.

Paper sample of the nonsmoker group showed proliferation rate and cellular viability decreased in 3T3 cells. Similarly, Bahl et al. (2015a) also found unexposed synthetic car carpet fabric (smoke and THS-free) caused a significant decrease in cell proliferation of mNSC cells.⁴³ This decrease may be due to other indoor pollutants which have not been investigated.

Bahl et al. (2015b) concluded VOCs in THS, predominantly acrolein, were mainly responsible for toxicity observed in mNSC cells as there was loss of cytotoxic effects in samples stored for months or with larger headspace in the flask.⁴⁴ Due to our procedure to prepare THS extracts, most VOCs may have been lost from paper and cotton samples, then the cellular changes in our study are caused by non-volatile substances in THS.

As there is no safe level of tobacco smoke and 5 to 60% of the increased mortality risk associated with living with a smoker can be attributed to THS,^{1,38} studies that assess how THS biologically affects humans by comparing exposed to unexposed individuals (indirectly performed in this study) are of essential importance. If it is plausible to have a population that is actually unexposed to smoke, is an issue that requires attention. *In vitro* assays are important as a first step for the determination of damage of chemicals; and preliminary studies, including mechanistic ones, better direct the design of potential clinical studies.

THS exposure occur by inhalation, ingestion or dermal absorption,⁶ while usual cytotoxicity testing is carried by adding the extracts of smoke into the medium above cells seeded on plastic wells, which is not a physiological condition. The mode of action or metabolic conditions in the cell culture may be different than in humans and the effects in cell cultures occur at different levels of exposure than in humans.²⁴ Moreover, there is lack of interaction among different regulatory mechanisms which occurs in *in vivo* systems.⁵⁶ However, these assays are useful to achieve preliminary data and to help the understanding of the potential health effects attributable to THS.

One of the strengths of the present study is that it was designed to evaluate nicotine concentration in more than once in homes where smoking was occurring. Moreover, this study aimed to measure the cellular effects in three different cell lines. Limitations to consider are small sample size, low concentration of THS for cell exposure due to sample preparation procedure, and acute exposure to assess the outcomes.

Surface cotton wipe and cellulose paper sampling for nicotine is a simple collection method to assess THS contamination and distinguish between nonsmoking and smoking environments. Even showing no cytotoxic effect, the THS was able to cause changes in important functions for suitable cell survival, for instance, increased mitochondrial activity was not always accompanied by increased lysosomal viability. Because of different sensibility of cells to THS, it is important to assess the effects on different cell types.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to acknowledge Amanda Ferreira Becker (Feevale University) for assistance with *in vitro* assays.

This work was supported by Feevale University and Support Program Graduate (PROAP) of Federal University of Health Sciences of Porto Alegre.

DECLARATION OF INTERESTS

The Author declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

1. US Department of Health and Human Services. *The Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke: A Report of the Surgeon General*. Washington, DC: U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Coordinating Center for Health Promotion, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health; 2006.
2. International Agency for Research on Cancer. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 2004; 83: 1-1438.
3. Winickoff JP, Friebely J, Tanski SE, Sherrod C, Matt GE, Hovell MF, et al. Beliefs about the health effects of "thirdhand" smoke and home smoking bans. *Pediatrics* 2009; 123: e74-e79.
4. Becquemin MH, Bertholon JF, Bentayeb M, Attoui M, Ledur D, Roy F, et al. Third-hand smoking: indoor measurements of concentration and sizes of cigarette smoke particles after resuspension. *Tob Control* 2010; 19: 347-348.
5. Burton A. Does the smoke ever really clear? Thirdhand smoke exposure raises new concerns. *Environ Health Perspect* 2011;119: A70-A74.
6. Matt GE, Quintana PJ, Destailats H, Gundel LA, Sleiman M, Singer BC, et al. Thirdhand tobacco smoke: emerging evidence and arguments for a multidisciplinary research agenda. *Environ Health Perspect* 2011a; 119: 1218-1226.
7. Matt GE, Quintana PJ, Zakarian JM, Fortmann AL, Chatfield DA, Hoh E, et al. When smokers move out and non-smokers move in: residential thirdhand smoke pollution and exposure. *Tob Control* 2011b; 20: e1.

8. Matt GE, Quintana PJ, Fortmann AL, Zakarian JM, Galaviz VE, Chatfield DA, et al. Thirdhand smoke and exposure in California hotels: non-smoking rooms fail to protect non-smoking hotel guests from tobacco smoke exposure. *Tob Control* 2014; 23: 264-272.
9. Sleiman M, Gundel LA, Pankow JF, Jacob P 3rd, Singer BC, Destailats H. Formation of carcinogens indoors by surface-mediated reactions of nicotine with nitrous acid, leading to potential thirdhand smoke hazards. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107: 6576-6581.
10. Matt GE, Fortmann AL, Quintana PJ, Zakarian JM, Romero RA, Chatfield DA, et al. Towards smoke-free rental cars: an evaluation of voluntary smoking restrictions in California. *Tob Control* 2013; 22: 201-207.
11. Bahl V, Jacob P 3rd, Havel C, Schick SF, Talbot P. Thirdhand cigarette smoke: factors affecting exposure and remediation. *PLoS One* 2014; 9: e108258.
12. Matt GE, Quintana PJ, Hovell MF, Bernert JT, Song S, Novianti N, et al. Households contaminated by environmental tobacco smoke: sources of infant exposures. *Tob Control* 2004; 13: 29-37.
13. Ueta I, Saito Y, Teraoka K, Miura T, Jinno K. Determination of volatile organic compounds for a systematic evaluation of third-hand smoking. *Anal Sci* 2010; 26: 569-574.
14. Hoh E, Hunt RN, Quintana PJ, Zakarian JM, Chatfield DA, Wittry BC, et al. Environmental tobacco smoke as a source of polycyclic aromatic hydrocarbons in settled household dust. *Environ Sci Technol* 2012; 46: 4174-4183.

15. Thomas JL, Hecht SS, Luo X, Ming X, Ahluwalia JS, Carmella SG. Thirdhand tobacco smoke: a tobacco-specific lung carcinogen on surfaces in smokers' homes. *Nicotine Tob Res* 2014; 16: 26-32.
16. Schick SF, Farraro KF, Perrino C, Sleiman M, van de Vossenberg G, Trinh MP, et al. Thirdhand cigarette smoke in an experimental chamber: evidence of surface deposition of nicotine, nitrosamines and polycyclic aromatic hydrocarbons and de novo formation of NNK. *Tob Control* 2014; 23: 152-159.
17. Ramírez N, Ozel MZ, Lewis AC, Marcé RM, Borrull F, Hamilton JF. Exposure to nitrosamines in thirdhand tobacco smoke increases cancer risk in non-smokers. *Environ Int* 2014; 71: 139-147.
18. Jung JW, Ju YS, Kang HR. Association between parental smoking behavior and children's respiratory morbidity: 5-year study in an urban city of South Korea. *Pediatr Pulmonol* 2012; 47: 338-345.
19. Hang B, Sarker AH, Havel C, Saha S, Hazra TK, Schick S, et al. Thirdhand smoke causes DNA damage in human cells. *Mutagenesis* 2013; 28: 381-391.
20. Martins-Green M, Adhami N, Frankos M, Valdez M, Goodwin B, Lyubovitsky J, et al. Cigarette smoke toxins deposited on surfaces: implications for human health. *PLoS One* 2014; 9: e86391.
21. Karim ZA, Alshbool FZ, Vemana HP, Adhami N, Dhall S, Espinosa EV, Martins-Green M, Khasawneh FT. Third-hand Smoke: Impact on Hemostasis and Thrombogenesis. *J Cardiovasc Pharmacol* 2015; 66: 177-182.
22. Xu B, Chen M, Yao M, Ji X, Mao Z, Tang W, et al. Metabolomics reveals metabolic changes in male reproductive cells exposed to thirdhand smoke. *Sci Rep* 2015; 5: 15512.

23. Andreoli C, Gigante D, Nunziata A. A review of in vitro methods to assess the biological activity of tobacco smoke with the aim of reducing the toxicity of smoke. *Toxicol In Vitro* 2003;17: 587-594.

24. Johnson MD, Schilz J, Djordjevic MV, Rice JR, Shields PG. Evaluation of in vitro assays for assessing the toxicity of cigarette smoke and smokeless tobacco. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18: 3263-3304.

25. Fotakis G, Timbrell JA. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett* 2006; 160: 171-177.

26. Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Mat Res* 2003; 6: 317-320.

27. Quintana PJ, Matt GE, Chatfield D, Zakarian JM, Fortmann AL, Hoh E. Wipe sampling for nicotine as a marker of thirdhand tobacco smoke contamination on surfaces in homes, cars, and hotels. *Nicotine Tob Res* 2013; 15: 1555-1563.

28. Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik, H, et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst* 1973; 51: 1417-1423.

29. Amaro MI, Monasterios M, Avendaño M, Charris J. Preliminary evaluation of the toxicity of some synthetic furan derivatives in two cell lines and *Artemia salina*. *J Appl Toxicol* 2009; 29: 36-41.

30. Todaro GJ, Green H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol* 1963; 17: 299-313.

31. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
32. Trintinaglia L, Bianchi E, Silva LB, Nascimento CA, Spilki FR, Ziulkoski AL. Cytotoxicity assays as tools to assess water quality in the Sinos River basin. *Braz J Biol* 2015; 75: 75-80.
33. Triglia D, Sherard Braa S, Yonan C, Naughton GK. Cytotoxicity testing using neutral red and MTT assays on a three-dimensional human skin substrate. *Toxicol In Vitro* 1991; 5: 573-578.
34. Vanden Berghe T, Grootjans S, Goossens V, Dondelinger Y, Krysko DV, Takahashi N, et al. Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods* 2013; 61: 117-129.
35. Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett* 1985; 24: 119-124.
36. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc* 2008; 3: 1125-1131.
37. Altman SA, Randers L, Rao G. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnol Prog* 1993; 9: 671-674.
38. Sleiman M, Logue JM, Luo W, Pankow JF, Gundel LA, Destailats H. Inhalable constituents of thirdhand tobacco smoke: chemical characterization and health impact considerations. *Environ Sci Technol* 2014; 48: 13093-13101.

39. Das A, Bhattacharya A, Chakrabarti G. Cigarette smoke extract induces disruption of structure and function of tubulin-microtubule in lung epithelium cells and in vitro. *Chem Res Toxicol* 2009; 22: 446-459.

40. Kaushik G, Kaushik T, Khanduja S, Pathak CM, Khanduja KL. Cigarette smoke condensate promotes cell proliferation through disturbance in cellular redox homeostasis of transformed lung epithelial type-II cells. *Cancer Lett* 2008; 270: 120-131.

41. Fukano Y, Ogura M, Eguchi K, Shibagaki M, Suzuki M. Modified procedure of a direct in vitro exposure system for mammalian cells to whole cigarette smoke. *Exp Toxicol Pathol* 2004; 55: 317-323.

42. Hammer TR, Fischer K, Mueller M, Hoefer D. Effects of cigarette smoke residues from textiles on fibroblasts, neurocytes and zebrafish embryos and nicotine permeation through human skin. *Int J Hyg Environ Health* 2011; 214: 384-391.

43. Bahl V, Shim HJ, Jacob P 3rd, Dias K, Schick SF, Talbot P. Thirdhand smoke: Chemical dynamics, cytotoxicity, and genotoxicity in outdoor and indoor environments. *Toxicol In Vitro* 2015a; pii: S0887-2333(15)30028-X. [Epub ahead of print]

44. Bahl V, Weng NJ, Schick SF, Sleiman M, Whitehead J, Ibarra A, et al. Cytotoxicity of Thirdhand Smoke and Identification of Acrolein as a Volatile Thirdhand Smoke Chemical That Inhibits Cell Proliferation. *Toxicol Sci* 2015b; pii: kfv327. [Epub ahead of print]

45. National Institutes of Health. Report of the International Workshop on In Vitro Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity. NIH Publication No. 01-4499. 2001. National Institute for Environmental Health Sciences, Research

Triangle Park, NC. Available at:
<http://www.epa.gov/hpv/pubs/general/nih2001a.pdf> Accessed on 10 Jan 2016.

46. Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol In Vitro* 1988; 2: 1-6.

47. Kim H, Yoon SC, Lee TY, Jeong D. Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. *Toxicol Lett* 2009; 184: 13-17.

48. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu.* 2005; 11: 127-152.

49. Peng L, Wang B, Ren P. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2005; 45: 108-111.

50. Lupu AR, Popescu T. The noncellular reduction of MTT tetrazolium salt by TiO₂ nanoparticles and its implications for cytotoxicity assays. *Toxicol In Vitro* 2013; 27: 1445-1450.

51. Campain JA. Nicotine: potentially a multifunctional carcinogen? *Toxicol Sci* 2004; 79: 1-3.

52. Counts ME, Hsu FS, Tewes FJ. Development of a commercial cigarette “market map” comparison methodology for evaluating new or non-conventional cigarettes. *Regul Toxicol Pharmacol* 2006; 46: 225–242.

53. Patskan GJ, Podraza KF, Meurrens K, Coggins CR, Friedrichs B, Gerstenberg B, et al. Toxicological comparisons of three styles of a commercial U.S. cigarette (Marlboro with the 1R4F reference cigarette. *Inhal Toxicol* 2008; 20: 695–721.

54. Roemer E, Tewes FJ, Meisgen TJ, Veltel DJ, Carmines EL. Evaluation of the potential effects of ingredients added to cigarettes. Part 3: in vitro genotoxicity and cytotoxicity. *Food Chem Toxicol* 2002; 40: 105-111.

55. Bahl V, Lin S, Xu N, Davis B, Wang YH, Talbot P. Comparison of electronic cigarette refill fluid cytotoxicity using embryonic and adult models. *Reprod Toxicol* 2012; 34: 529-537.

56. Piersma AH. Alternative methods for developmental toxicity testing. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2006; 98: 427-431.

Table 1: Characteristics of the nonsmokers' and smokers' homes and nicotine concentration of the samples collected in cotton wipe and paper samples (1 day, 3 days and 7 days).

Smoking status	Size room (m ²)	Characteristics						CPD	Surface nicotine (ng/cm ²)			
		Gender	Age	Years in house ^a	Collection room ^b	Site ^c	Other smoke ^d		Cotton	Paper 1 day	Paper 3 days	Paper 7 days
Nonsmoker #1	12	female	31	8	bedroom	furniture			BLOQ	BLOQ	BLOQ	1.2
Nonsmoker #2	15	female	34	7	living room	furniture			BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ
Nonsmoker #3	12	female	69	10	bedroom	furniture	garage		BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ
Mean (sd)	13 (1.7)		44.7 (21.1)	8.3 (1.5)								
Smoker #1	3.1	female	56	18	pantry	wall	incense	15	127.1	53.5	85.2	131.5
Smoker #2	16.5	female	26	8	living room	wall		10	BLOQ	BLOQ	BLOQ	23.5
Smoker #3	13.4	female	34	5	living room	wall	incense	6	BLOQ	BLOQ	BLOQ	BLOQ
Smoker #4	12	female	52	10	living room	wall		20	9.3	14.9	39.8	36.5
Smoker #5	18.5	male	25	2	living room	furniture		20	121.3	60.0	107.7	132.7
Smoker #6	16.5	female	28	8	living room	furniture		10	759.9	35.0	29.2	148.2
Smoker #7	15	female	54	4	living room	furniture		20	14.7	27.8	45.3	56.5
Smoker #8	13.7	female	40	2	living room	furniture	incense	5	421.2	5.4	4.2	20.5
Smoker #9	10	female	34	4	living room	wall	incense	20	4.3	47.5	29.7	61.1
Mean or Median (sd) (p25-p75)	12.3 (2.5)		38.8 (12.3)	6.8 (5.0)				14 (6.3)	14.7 (4.3 - 127.1)	27.8 (5.4 - 47.5)	29.7 (4.3 - 43.5)	56.5 (23.5 - 131.5)

Characteristic: ^ayears living in the house, ^broom where the majority of indoor smoking was reported, ^csite where the samples were collected, ^dother sources of smoke.

CPD: cigarettes smoked inside the home per day

BLOQ: Bellow the limit of detection

p25: 25th percentile; p75: 75th percentile

Hep-2

3T3

Relative cell function (%)

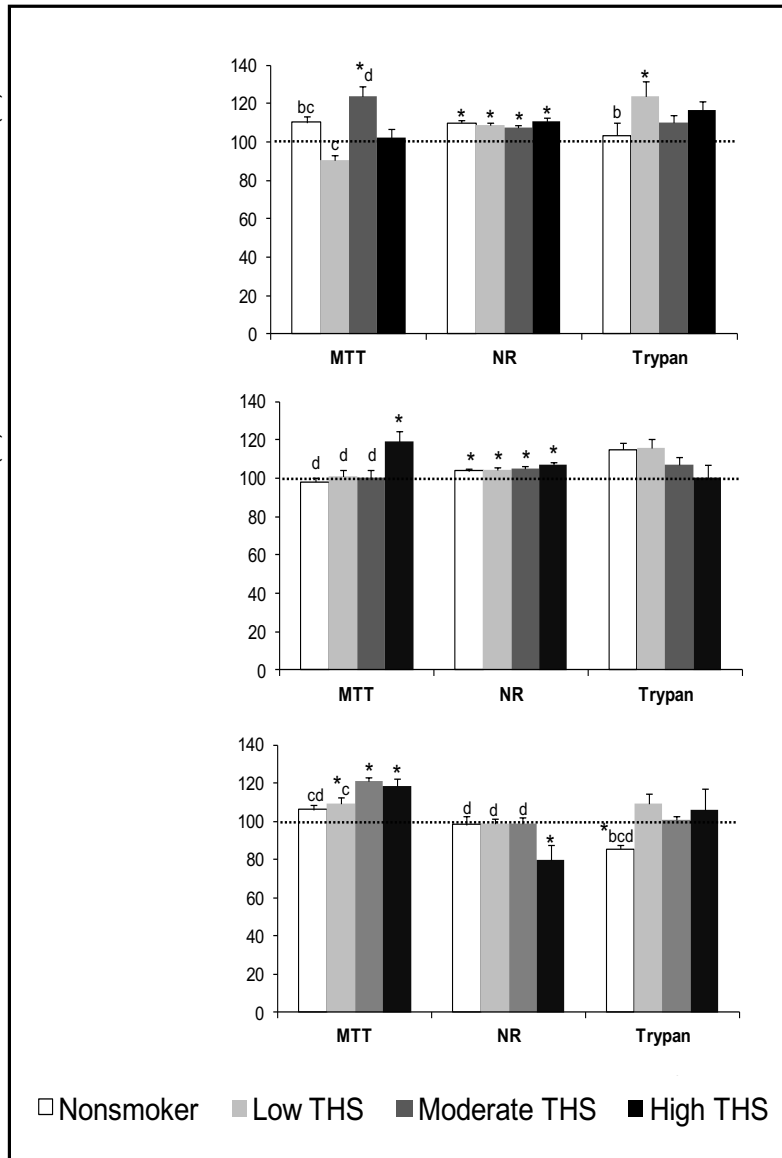


Figure 1: Cellular functions in A549 (*upper*), Hep-2 (*middle*) and 3T3 cells (*bottom*) of papers exposed to THS in smokers and nonsmokers' homes. Data are expressed as mean + SEM. The dashed line represents the reference (paper THS-free = cellular function 100%). Each assay was conducted at least twice in independent experiments, with five replicates for each concentration and independent assay.

Nonsmoker (9 samples), Low THS (less than 10 ng/cm², 7 samples), Moderate THS (between 10 to 50 ng/cm², 11 samples) and High THS (above 50 ng/cm², 9 samples).

*p<0.05 (One-way ANOVA) in relation to reference. Letters are used to indicate differences between groups and they are shown only once in the same assay: a) p<0.05 compared to nonsmoker, b) p<0.05 compared to Low THS, c) p<0.05 compared to Moderate THS, and d) p<0.05 compared to High THS.

A549

Relative cell induction (%)

Hep-2

3T3

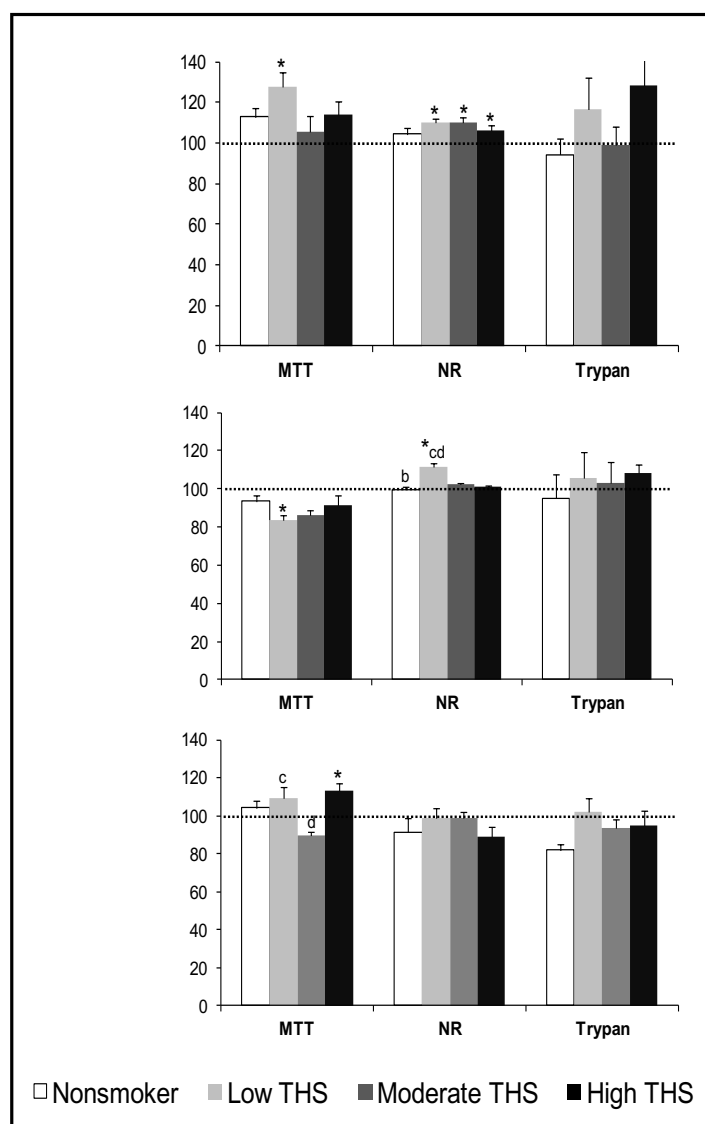


Figure 2: Cellular functions in A549 (*upper*), Hep-2 (*middle*) and 3T3 cells (*bottom*) of cotton wipes exposed to THS in smokers and nonsmokers' homes. The data are expressed as mean + SEM. The dashed line represents the reference (cotton smoke-free = cellular function 100%). Each assay was conducted on at least two independent experiments, and there were five replicates for each concentration for each independent assay.

Nonsmoker (3 samples), Low THS (less than 10 ng/cm², 4 samples), Moderate THS (between 10 to 50 ng/cm², 1 samples) and High THS (above 50 ng/cm², 4 samples).

*p<0.05 (One-way ANOVA) in relation to reference. The letters are used to indicate differences between groups and they are shown only once in the same assay: a) p<0.05 compared to nonsmoker, b) p<0.05 compared to Low THS, c) p<0.05 compared to Moderate THS, and d) p<0.05 compared to High THS.

3.2. Artigo Científico 2

Effects of residual tobacco smoke in A549, Hep-2 and 3T3 cells

(submetido para *Toxicology International* como *Short Communication*)

Short title: residual tobacco smoke

Luciana Rizzieri Figueiró, M.Sc.

Graduate Program in Pathology

Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA)

rizzieri@ufcspa.edu.br

Amanda Ferreira Becker

Undergraduate of Biomedicine

Feevale University

amandaf@feevale.br

Ana Luiza Ziulkoski, Ph.D.

Cytotoxicity Laboratory, Institute of Health Sciences

Feevale University

analuiza@feevale.br

Denise Conceição Mesquita Dantas, Ph.D.

Cellular Biology Laboratory

UFCSPA

ddantas@ufcspa.edu.br

*Corresponding author

Luciana Rizzieri Figueiró, MSc.

Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA)

Rua Sarmento Leite 245

CEP 90050-170 Porto Alegre / RS – Brasil

rizzieri@ufcspa.edu.br / lucianarizzieri@gmail.com

Abstract

Thirdhand Smoke (THS) is the toxic compounds of cigarette smoke that remain in indoor environments after the cigarette is extinguished. THS contains several toxic compounds that can damage exposed persons. The aim of this study was to assess the effects of residual tobacco smoke in the A549, Hep-2 and 3T3 cell lines. Cellulose papers were exposed in a chamber to the smoke of 1, 3, 5 and 8 cigarettes by spontaneous combustion. Cotton wipes were used to clean the chamber walls after extinction of the smoke. The exposed paper and cotton were immersed in Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) to transfer the compounds of the material to the solvent. DMEM + THS was used to expose A549, Hep-2 and 3T3 cells for 24 hours and MTT, Neutral Red Uptake (NRU) and Trypan blue exclusion assays were performed. No significantly changes were found in the A549 cells. In Hep-2 cells, there was difference only in NRU assay. In 3T3 cells, changes in mitochondrial activity and proliferation rate were observed. Laboratory chamber experiment was performed to generate THS samples using chromatography paper as a model surface and cotton to clean the surface. Thus, it was possible to assess the cellular effects of THS deposited on surfaces in environments where smoke occurs. Effects found in cells exposed to THS relied on the cell type. Because of different sensibility of cells to THS, it is important to screen multiple cell types for the purpose of better assess cytotoxicity.

Keywords: thirdhand tobacco smoke, environmental tobacco smoke, MTT assay, Neutral Red Uptake assay, Trypan blue exclusion assay

Abbreviations:

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Media; mNSC: mouse neural stem cells;
MTT: 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NNA: 4-(methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl) butanal; NNK: 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone; NRU: neutral red uptake; THS: thirdhand smoke.

Introduction

Thirdhand Smoke (THS) is the toxic compounds of cigarette smoke that remain in indoor environments after the cigarette is extinguished.¹ These compounds can accumulate in the air or on surfaces^{1,2} or are re-emitted back into the gas phase or react with oxidants and other compounds in the environment to yield secondary pollutants.³ THS in air, dust and on surfaces leads to multiple exposure routes such as inhalation, dermal absorption and involuntary ingestion.⁴

It has been proven THS contain several volatile organic compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons, tobacco-specific lung carcinogen (4-methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) and 4-(methylnitrosamino)-4-(3-pyridyl) butanal (NNA), a nitrosamine absent in fresh smoke.⁵⁻⁹ Many of these pollutants remain in the environments for months or years even if smoking does not become the environment.¹⁰⁻¹²

The risks of THS have only recently started to be recognized. This exposure caused alterations in lipid level and fat in hepatocytes (steatosis), collagen production and inflammatory cytokines level, enhanced platelet aggregation and secretion, shortened bleeding time and increased risk of thrombosis in mice.¹³⁻¹⁴ Moreover, THS showed genotoxicity to human hepatocellular carcinoma cells even in acute exposure and it was sufficient to cause metabolic changes in two male reproductive murine cell lines and cancer in humans.¹⁵⁻¹⁷

Nonetheless, more biological evidence of THS toxicity is needed. *In vitro* cytotoxicity assay can be useful to understand the mechanisms involved in the detrimental effects of THS. As each assay may assess different functions^{18,19} and different cells may have distinct sensitivity to xenobiotics, it is interesting to

perform experiments with different outcomes in different targets. The aim of this study was to assess the effects of residual tobacco smoke in the A549, Hep-2 and 3T3 cell lines.

Materials and Methods

Experimental sample collection

THS samples were generated by exposing the cellulose chromatography papers (25 cm²) to the smoke of 1, 3, 5 and 8 cigarettes (1 cigarette = 0,9mg nicotine in mainstream smoke as reported by the manufacturer) in a 27.6L acrylic chamber. The tobacco combustion took place spontaneously and the box had an inlet where enough air had been provided. One hour after the combustion, the paper was removed and an area of equal size limited by a frame was cleaned with moistened cotton wipes (28 cm² cosmetic 100% cotton facial wipes). Samples were kept in a 100% smoke-free box for six hours and placed in a 50mL conical centrifuge tubes and then stored at -20°C.

Sample extraction

Each material was cut in small pieces and 25 mL Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM) were added. Flasks were stirred and stored overnight at 4°C. Afterwards, flasks were stirred and the supernatant was recovered by a syringe. Paper and cotton wipes without smoke exposure were processed accordingly and used as reference. The recovered medium was passed through a 0.22 µm filter and pH was adjusted at 7.4, if necessary.

Cell culture and treatment

Human lung epithelial type-II cells line (A549 cells), human epithelioma cells from laryngeal carcinoma (Hep-2 cells) and mouse embryonic fibroblast cell line (3T3 cells) were grown in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Culture was maintained at 37°C in a humid atmosphere at 5% of CO₂ and a half-open system.

For THS exposure, cells were seeded at a rate of 1 to 2 x 10⁴ cells/well in a 96-well (MTT and NRU assays) or 7 to 10 x 10⁴ cells/well in a 24-well polystyrene microplate (Trypan blue assay). After the cultures reached semiconfluence, culture medium was replaced with DMEM + THS obtained from different number of cigarette combustion, and cells were exposed for 24 hours to assays.

Cytotoxicity assay

Mitochondrial activity was assessed by 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay,²⁰ which reflects the number of viable cells.^{21,22} The assay was performed as Trintinaglia et al. (2015).²³

The neutral red uptake (NRU) method was used to evaluate cytotoxicity through the lysosome viability.²⁴ Damaged lysosomes lose the ability of incorporate the dye and lysosomal integrity is a highly sensitive indicator of cell viability.²⁵ The assay was performed as Trintinaglia et al. (2015).²³

The trypan blue exclusion assay assesses cells with intact plasma membrane²⁶ and it was used to count the viable and nonviable cells in a Neubauer chamber and calculating the proliferation rate (number of cells after the THS exposure / the initial plating number).

Statistical analysis

Cytotoxicity experiments were performed in quintuplicate and repeated at least once to confirm the validity of the observation. All results are presented relative to reference (100% cellular function). The significance of differences within groups was determined by one-way ANOVA with Duncan post hoc test using IBM SPSS Statistics 19.0. Statistical significance was set at $p < 0.05$.

Results

The cellular effects of residual tobacco smoke are presented in Figure 1. No significantly changes were found in the A549 cells.

In Hep-2 cells, there was difference only in NRU assays. Lysosomal viability was lower when cells were exposed to eight cigarettes and higher with one cigarette in paper samples, but the latter was not different from the reference ($p < 0.001$). In cotton samples, lysosomal viability with five cigarettes was higher than three, eight cigarettes and reference ($p = 0.048$).

In 3T3 cells, changes in mitochondrial activity were observed. This value was increased in about 80% and 40% in the eight-cigarette exposure, both in the paper and cotton samples ($p < 0.001$ and $p = 0.002$, respectively). Proliferation rate was lower in both paper and cotton samples. In paper samples, the proliferation rate of the exposure to one, five and eight cigarettes was about 30% lower than the value of the reference ($p = 0.017$). In cotton samples, this value with five and eight cigarettes was approximately 35% lower than the value of the reference ($p = 0.038$).

Discussion

Laboratory chamber experiment was performed to generate THS samples using chromatography paper as a model surface and cotton to clean the surface. Thus, it was possible to assess the cellular effects of THS deposited on surfaces in environments where smoke occurs. Some changes in cellular functions were found in cells exposed to THS, as alterations in lysosomal viability in Hep-2 cells and increased mitochondrial viability in 3T3 cells.

As the main resource of the environmental tobacco smoke is sidestream smoke, to generate smoke by spontaneous combustion is a realistic practical approach rather than using pump to smoke and an artificial source of oxygen.²⁷⁻

²⁹ Tobacco smoke toxins linger on furniture, clothes, drapes, carpets and surfaces and the collecting material may adsorb different compounds of cigarette smoke. Both chromatography papers and cotton wipes are made of cellulose and then the polar groups of nicotine form hydrogen bonds with hydroxyl groups of these materials. This chemical interaction promotes the sorption of polar compounds to polar material.^{10,30} Significant amounts of nicotine are retained and can be extracted with the use of aqueous or organic solvents.¹⁰ How each of these materials incorporate and release substances is still unexplored. This may have influenced the results of the assays, since lysosomal viability and proliferation rate were different according to the collection material.

Hep-2 and A549 cells were selected because the respiratory tract is an organ directly targeted by smoke cigarettes. However, they showed different sensitivity to THS and A549 cells are not affected. Hep-2 cell line is widely used in toxicity studies and it exhibits good sensitivity to xenobiotics.³¹ Even though

both cells have tumor origin, Hep-2 cells exhibited more sensitive than A549 cells. Generally, differentiated cells are less sensible to residual tobacco smoke.^{11,32,33} More changes are found in 3T3 cells, which is the only non-malignant cell line in our study and one of the most commonly used fibroblast cell lines for *in vitro* assays. These cells behave differently because distinct molecular mechanisms are activated and the effects of the cigarette smoke on cancer cell survival and response to cytotoxic agents are poorly delved.³⁴

Although NRU assay is considered the most sensitive assay for assessing the cytotoxic potential of cigarette smoke condensates,³⁵ it has not been used to evaluate the THS effects. We only saw changes in Hep-2 cells, which was different depending on the sample. In 3T3 cells, increased mitochondrial activity and lower proliferation rate were seen in both paper and cotton samples, stressing there is not always association of cell viability biomarkers with the cell number.³⁶ Many studies interpret the MTT results as cellular viability; however, it best indicates change in metabolic activity, specially the rate of glycolytic NADH production.^{37,38} The increased mitochondrial activity may be a repercussion of an adaptive response in an attempt to handle the detrimental effects of THS. As the metabolic condition in cells is linked closely with the ability of a cell to replicate, an increased cellular function, especially in cancer cells, should turn on a warning sign.³⁹

In another study, cytotoxicity of THS by MTT assay in mouse neural stem cells (mNSC) was only seen when the sample extraction was made by culture medium containing serum. The proteins present in serum, such as albumins, may have provided the extraction of water insoluble or semi-soluble harmful THS constituents.¹¹ As our extraction procedure was performed with serum free

medium, these harmful substances may not be present in the sample and our findings in MTT assay may be underestimating the cytotoxicity of THS.

Some changes in cellular functions were found in the cells exposed to THS, however, these effects relied on the cell type. No cellular differences were found in the A549 cells. In Hep-2 cells, there was change only in lysosomal viability and 3T3 cells showed more alterations, both in mitochondrial activity and proliferation rate. Because of different sensibility of cells to THS, it is important to screen multiple cell types in order to better assess cytotoxicity.

Funding

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, private, or not-for-profit sectors.

Declaration of interest

The authors declare that there is not conflict of interest.

Author contributions

LRF, ALZ and DCMD have made substantial contributions to the conception and design of the study and analysis and interpretation of data. LRF and AFB led to acquisition of data. LRF drafted the article and all authors revised it critically for important intellectual content and they have approved the final article.

References

1. Winickoff JP, Friebely J, Tanski SE, Sherrod C, Matt GE, Hovell MF, et al. Beliefs about the health effects of "thirdhand" smoke and home smoking bans. *Pediatrics*. 2009;123(1):e74-9.
2. Becquemin MH, Bertholon JF, Bentayeb M, Attoui M, Ledur D, Roy F, et al. Third-hand smoking: indoor measurements of concentration and sizes of cigarette smoke particles after resuspension. *Tob Control*. 2010;19(4):347-8.
3. Burton A. Does the smoke ever really clear? Thirdhand smoke exposure raises new concerns. *Environ Health Perspect*. 2011;119(2):A70-4.
4. Matt GE, Quintana PJ, Hovell MF, Bernert JT, Song S, Novianti N, et al. Households contaminated by environmental tobacco smoke: sources of infant exposures. *Tob Control*. 2004;13(1):29-37.
5. Hoh E, Hunt RN, Quintana PJ, Zakarian JM, Chatfield DA, Wittry BC, et al. Environmental tobacco smoke as a source of polycyclic aromatic hydrocarbons in settled household dust. *Environ Sci Technol*. 2012;46(7):4174-83.
6. Schick SF, Farraro KF, Perrino C, Sleiman M, van de Vossenberg G, Trinh MP, et al. Thirdhand cigarette smoke in an experimental chamber: evidence of surface deposition of nicotine, nitrosamines and polycyclic aromatic hydrocarbons and de novo formation of NNK. *Tob Control*. 2014;23(2):152-9.
7. Sleiman M, Gundel LA, Pankow JF, Jacob P 3rd, Singer BC, Destailats H. Formation of carcinogens indoors by surface-mediated reactions of nicotine with nitrous acid, leading to potential thirdhand smoke hazards. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(15):6576-81.

8. Thomas JL, Hecht SS, Luo X, Ming X, Ahluwalia JS, Carmella SG. Thirdhand tobacco smoke: a tobacco-specific lung carcinogen on surfaces in smokers' homes. *Nicotine Tob Res.* 2014;16(1):26-32.
9. Ueta I, Saito Y, Teraoka K, Miura T, Jinno K. Determination of volatile organic compounds for a systematic evaluation of third-hand smoking. *Anal Sci.* 2010;26(5):569-74.
10. Bahl V, Jacob P 3rd, Havel C, Schick SF, Talbot P. Thirdhand cigarette smoke: factors affecting exposure and remediation. *PLoS One.* 2014;9(10):e108258.
11. Bahl V, Shim HJ, Jacob P 3rd, Dias K, Schick SF, Talbot P. Thirdhand smoke: Chemical dynamics, cytotoxicity, and genotoxicity in outdoor and indoor environments. *Toxicol In Vitro.* 2015a;pii: S0887-2333(15)30028-X. [Epub ahead of print]
12. Matt GE, Quintana PJ, Zakarian JM, Fortmann AL, Chatfield DA, Hoh E, et al. When smokers move out and non-smokers move in: residential thirdhand smoke pollution and exposure. *Tob Control.* 2011;20(1):e1.
13. Karim ZA, Alshbool FZ, Vemana HP, Adhami N, Dhall S, Espinosa EV, Martins-Green M, Khasawneh FT. Third-hand Smoke: Impact on Hemostasis and Thrombogenesis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2015;66(2):177-82.
14. Martins-Green M, Adhami N, Frankos M, Valdez M, Goodwin B, Lyubovitsky J, et al. Cigarette smoke toxins deposited on surfaces: implications for human health. *PLoS One.* 2014;9(1):e86391.
15. Hang B, Sarker AH, Havel C, Saha S, Hazra TK, Schick S, et al. Thirdhand smoke causes DNA damage in human cells. *Mutagenesis.* 2013;28(4):381-91.

16. Ramírez N, Ozel MZ, Lewis AC, Marcé RM, Borrull F, Hamilton JF. Exposure to nitrosamines in thirdhand tobacco smoke increases cancer risk in non-smokers. *Environ Int.* 2014;71:139-47.
17. Xu B, Chen M, Yao M, Ji X, Mao Z, Tang W, et al. Metabolomics reveals metabolic changes in male reproductive cells exposed to thirdhand smoke. *Sci Rep.* 2015;5:15512.
18. Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. *Toxicol In Vitro.* 1988;2(1):1-6.
19. Kim H, Yoon SC, Lee TY, Jeong D. Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. *Toxicol Lett.* 2009;184(1):13-7.
20. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63.
21. Triglia D, Sherard Braa S, Yonan C, Naughton GK. Cytotoxicity testing using neutral red and MTT assays on a three-dimensional human skin substrate. *Toxicol In Vitro.* 1991;5(5-6):573-8.
22. Vanden Berghe T, Grootjans S, Goossens V, Dondelinger Y, Krysko DV, Takahashi N, et al. Determination of apoptotic and necrotic cell death in vitro and in vivo. *Methods.* 2013;61(2):117-29.
23. Trintinaglia L, Bianchi E, Silva LB, Nascimento CA, Spilki FR, Ziulkoski AL. Cytotoxicity assays as tools to assess water quality in the Sinus River basin. *Braz J Biol.* 2015;75:75-80.
24. Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett.* 1985;24(2-3):119-24.

25. Repetto G, del Peso A, Zurita JL. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc.* 2008;3(7):1125-31.
26. Altman SA, Randers L, Rao G. Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnol Prog.* 1993;9(6):671-4.
27. International Agency for Research on Cancer. Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum.* 2004;83:1-1438.
28. Woodward A, al-Delaimy W. Measures of exposure to environmental tobacco smoke. Validity, precision, and relevance. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;895:156-72
29. Hammer TR, Fischer K, Mueller M, Hoefer D. Effects of cigarette smoke residues from textiles on fibroblasts, neurocytes and zebrafish embryos and nicotine permeation through human skin. *Int J Hyg Environ Health.* 2011;214(5):384-91.
30. Petrick L, Destailats H, Zouev I, Sabach S, Dubowski Y. Sorption, desorption, and surface oxidative fate of nicotine. *Phys Chem Chem Phys.* 2010;2(35):10356-64.
31. Amaro MI, Monasterios M, Avendaño M, Charris J. Preliminary evaluation of the toxicity of some synthetic furan derivatives in two cell lines and *Artemia salina*. *J Appl Toxicol.* 2009;29:36-41.
32. Bahl V, Lin S, Xu N, Davis B, Wang YH, Talbot P. Comparison of electronic cigarette refill fluid cytotoxicity using embryonic and adult models. *Reprod Toxicol.* 2012;34:529-37.
33. Bahl V, Weng NJ, Schick SF, Sleiman M, Whitehead J, Ibarra A, et al. Cytotoxicity of Thirdhand Smoke and Identification of Acrolein as a Volatile

Thirdhand Smoke Chemical That Inhibits Cell Proliferation. *Toxicol Sci*.

2015b;pii: kfv327. [Epub ahead of print]

34. Sobus SL, Warren GW. The biologic effects of cigarette smoke on cancer cells. *Cancer*. 2014;120(23):3617-26.

35. Putnam KP1, Bombick DW, Doolittle DJ. Evaluation of eight in vitro assays for assessing the cytotoxicity of cigarette smoke condensate. *Toxicol In Vitro*. 2002;16(5):599-607.

36. Wang H, Word B, Lyn-Cook L Jr, Yang M, Hammons G, Lyn-Cook B. Cytotoxicity of chronic exposure to 4 cigarette smoke condensates in 2 cell lines. *Int J Toxicol*. 2015;34(2):182-94.

37. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*. 2005;11:127-52.

38. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, Benink HA, Worzella TJ, Minor L. *Cell Viability Assays*. In: Sittampalam GS, Coussens NP, Nelson H, et al., editors. Assay Guidance Manual [Internet]. Bethesda, MD: Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004. Retrieved: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>. Accessed: Jan 28, 2016.

39. Fukano Y, Ogura M, Eguchi K, Shibagaki M, Suzuki M. Modified procedure of a direct in vitro exposure system for mammalian cells to whole cigarette smoke. *Exp Toxicol Pathol*. 2004;55(5):317-23.

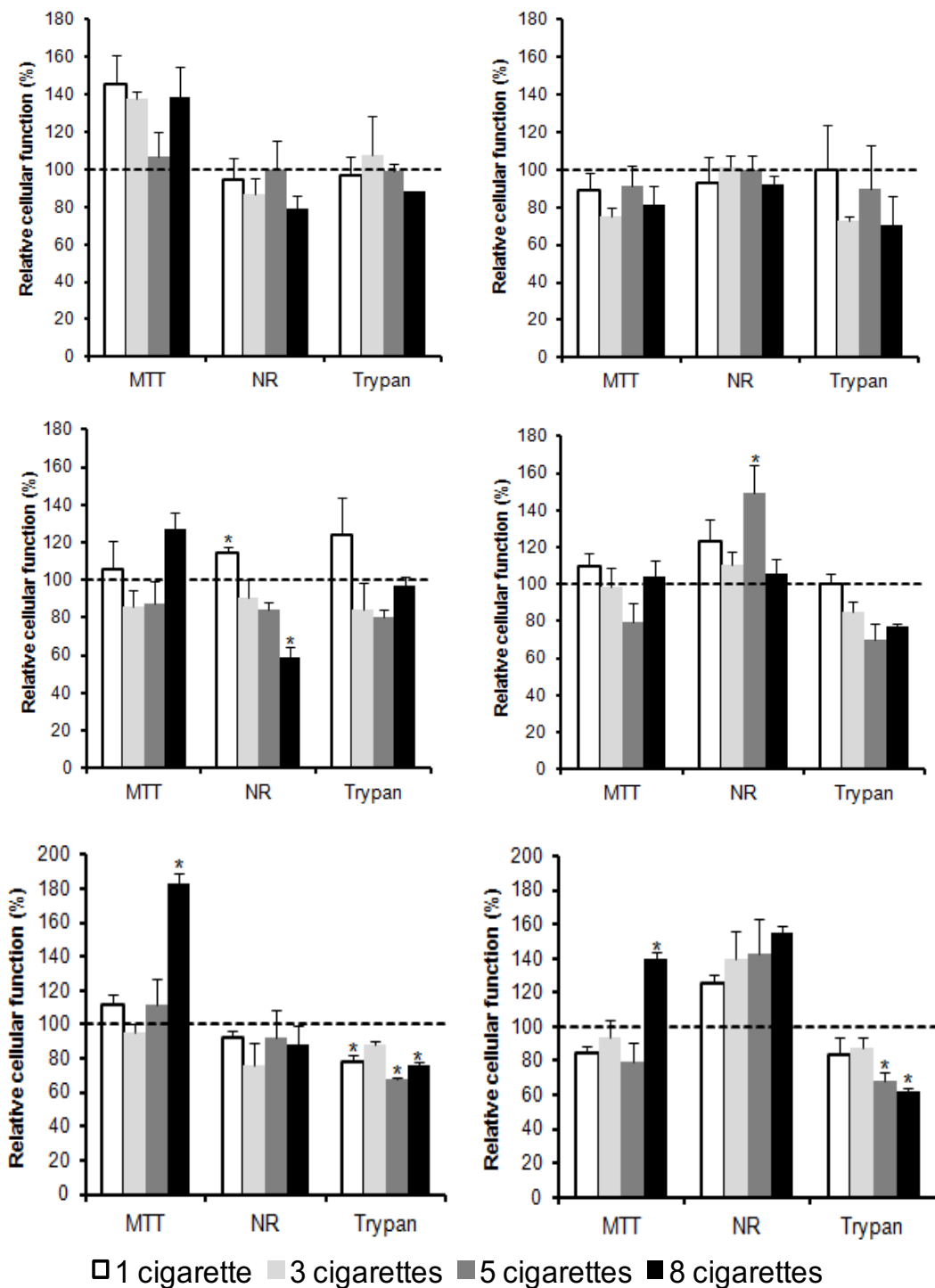


Figure 1: Cellular functions in A549 (upper), Hep-2 (middle) and 3T3 cells (bottom) of cellulose papers and cotton exposed to smoke cigarette in laboratory chamber. Data are expressed as mean ± SEM. The dashed line represents the reference (paper or cotton smoke-free = cellular function 100%). Each assay was conducted at least twice in independent experiments, with five replicates for each concentration and independent assay.

*p < 0.05 (One-way ANOVA)

3.3. Artigo Científico 3

Thirdhand tobacco smoke: procedures to evaluate cytotoxicity in cell cultures

(aceito para publicação em *Toxicology Mechanisms and Methods* como *Original Paper*)

Luciana Rizzieri Figueiró*

Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA)
Rua Sarmento Leite 245
CEP 90050-170 Porto Alegre / RS - Brasil

Denise Conceição Mesquita Dantas

Pharmacoscience Department, UFCSPA
Rua Sarmento Leite 245, sala 314
CEP 90050-170 Porto Alegre / RS – Brasil

Rafael Linden

Toxicology Laboratory, Institute of Health Sciences, Feevale University
RS-239, nº 2755, Subsolo do Prédio Vermelho
CEP 93352-000 Novo Hamburgo / RS – Brasil

Ana Luiza Ziulkoski

Cytotoxicity Laboratory, Institute of Health Sciences, Feevale University
RS-239, nº 2755, Prédio Vermelho – Sala 204, 2º andar
CEP 93352-000 Novo Hamburgo / RS – Brasil

*Corresponding author

Luciana Rizzieri Figueiró

Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (UFCSPA)
Rua Sarmento Leite 245
CEP 90050-170 Porto Alegre / RS – Brasil
rizzieri@ufcspa.edu.br / lucianarizzieri@gmail.com

Keywords: environmental tobacco smoke; nicotine; MTT assay; Neutral red uptake assay; Trypan blue assay.

Abstract

The risks associated to tobacco smoking are not ceased with smoke extinction. Many toxic compounds remain in the environment after the cigarette is extinguished and accumulate in the air or on surfaces. However, little is known about the risks of this exposure. The aim of this study was to evaluate procedures to collect THS and prepare the samples to perform three *in vitro* toxicity tests. Cellulose papers and cotton wipes were used to impregnate with nicotine solution and smoke cigarette in a chamber or in smoker's home. Samples were immersed in methanol or Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) to expose Hep-2 cells. MTT, Neutral Red Uptake (NRU) and Trypan blue assays were performed. The concentration of nicotine in DMEM extract of THS in paper and cotton was similar to those in methanol extract ($p>0.05$). Alterations in the mitochondrial and lysosomal functions were found in both paper and cotton samples; however, the cytotoxic effect was not always observed. There was a decrease of 21 to 31% in MTT assay and 38 to 56% in NRU assay ($p<0.003$). There was a dose-response relationship between amount of cigarettes and lysosomal viability; the correlation was stronger for cotton samples ($r=-0.843$ for cotton samples, $p<0.001$). As a dose-response relationship was only found in NRU assay, this test may be a more suitable choice rather than the MTT assay. Paper and wipe sampling can be reliable marker of tobacco smoke contamination. Moreover, these materials, if properly prepared, may be a substrate provider to perform cellular assays.

Introduction

There is undeniable evidence that involuntary smoking is harmful to nonsmokers (U.S. Department of Health and Human Services, 2006). Environmental tobacco smoke (ETS) exposure is associated with diseases and premature death in children, a vulnerable population since they cannot voluntarily avoid ETS exposure. Among the diseases, there is higher prevalence of asthma and other respiratory symptoms as caught and mucus, worse pulmonary capacity and ear infection. Adults also are susceptible to the effects of the ETS exposure, having a higher risk of developing respiratory and cardiovascular diseases and lung cancer (International Agency for Research on Cancer, 2004).

The risks associated to tobacco smoking are not ceased with smoke extinction. Thirdhand smoke (THS) consists of residual tobacco smoke pollutants. ETS refers to exposure to tobacco smoke while THS is the exposure to cigarette smoke residues (Matt et al., 2011a). Recent studies have proven that many toxic compounds remain in the environment after the cigarette is extinguished and accumulate in the air or on surfaces (Winickoff et al., 2009; Becquemin et al., 2010). Such is the case of the volatile organic compounds (VOCs), polycyclic aromatic hydrocarbons and 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK), a tobacco-specific lung carcinogen (Hoh et al., 2012; Ueta et al., 2010; Thomas et al., 2014). Nicotine can stay days to a few months even if smoking does not become the environment (Matt et al., 2011b; Matt et al., 2013). There is also the formation of substances absent in fresh smoke by nitrosation and oxidation reactions (Sleiman et al., 2010). Passive smoking is now also the involuntary inhalation, ingestion, or dermal uptake of

THS pollutants that remain or are formed in the air, in dust, and on surfaces (Matt et al., 2011a).

ETS is the precursor of THS and is mainly composed by sidestream smoke (~85%), i.e. smoke which drifts from the burning end of a cigarette (International Agency for Research on Cancer, 2004; Hang et al., 2013). Then, to generate smoke by spontaneous combustion is a realistic practical approach and used in other studies (Hammer et al., 2016; Hang et al., 2013). Although many substances have been identified in THS, its persistence in real-world settings has been confirmed principally based on nicotine measure (Matt et al., 2011a; Quintana et al., 2013).

The health risks of THS are sparingly known. Children exposed to THS revealed increased chance in cough-related symptoms, as nocturnal cough and dry cough, compared with non-exposed children (Jung, Ju and Kang, 2012). *In vitro* study showed that THS extract was genotoxic to human hepatocellular carcinoma cells even in acute exposure (Hang et al., 2013). A recent study in mice exposed for 24 weeks to experimentally generated THS found alterations in lipid level, collagen production and inflammatory cytokines level (Martins-Green et al., 2014). These conditions are associated with cirrhosis, cancer, cardiovascular disease, asthma and chronic obstructive pulmonary disease.

More biological evidence of THS toxicity is needed. Both for ethical as well as economic issues, alternative methodologies in biomedical research have been the focus of discussion in the past years (Piersma, 2006; U.S. Congress, 1986). As an alternative tool, *in vitro* assays began to be extensively used in toxicological research (Zucco et al., 2004). *In vitro* toxicological tests allow the direct or indirect contact of a xenobiotic with the cell culture and different

mechanisms may be evaluated depending on the assay and the cell type used (Rogero et al., 2003; Khatibisepehr et al., 2011). Neutral red uptake (NRU) by lysosomes, the mitochondrial activity test using MTT and trypan blue exclusion test for cellular viability and counting the number of cells are some of the most used assays (Fotakis and Timbrell, 2006). They not only produce significant data in a short period of time but they are also inexpensive, highly sensitive and reproducible methods (Rogero et al., 2003). Many of these tests have been used to assess the risks of cigarette smoke or their specific compounds (Johnson et al., 2009). This suggests that cytotoxicity assays in cell cultures may be used to assess the toxicological potential of THS samples.

In vitro assays can serve as alternatives to evaluate the toxicity of THS and provide the biological evidence to enhance awareness on the risks of this exposure and encourage home smoking bans. Since all these previous studies used different methods to collect and evaluate the risks of THS, the aim of this study was to evaluate procedures to collect THS and prepare the samples to perform three *in vitro* toxicity tests.

Methods

Sample extraction

In order to investigate the possibility of transferring the compounds of THS from the collecting material to a solvent, cellulose chromatography papers (10 cm x 2 cm x 0.34 mm, Whatman 3MM 3030-861) and cotton wipes (28 cm² cosmetic 100% cotton facial wipes) were impregnated with 111 µg nicotine (Fluka) in methanol solution. The materials remained in the smoke-free bench for 4 hours and placed in a 50 mL conical centrifuge tubes and stored overnight

at -20°C in the absence of light until analysis. Each material was cut in small pieces and 18.5 mL of methanol (Merck) or Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM, Sigma Aldrich) were added. Flasks were stirred and stored overnight at 4°C . Afterwards, flasks were stirred and centrifuged for 10 min at 3000 rpm to separate the supernatant from suspended paper particles. Paper and cotton wipes without nicotine solution were processed accordingly and used as reference. For semiquantitative analysis, 1.5 mL of supernatant were removed and immediately analyzed for nicotine by colorimetry.

Generation of THS and sample collection

THS samples were generated by exposing the cellulose paper (25 cm^2) to the smoke of 1, 3, 5, 10, 15 or 20 cigarettes in a 27.6 L acrylic chamber (1 cigarette = 0.9 mg nicotine in mainstream smoke, as reported by the manufacturer). The tobacco combustion took place spontaneously and the box had an inlet where enough air had been provided. One hour after the combustion, the paper was removed and an area of equal size limited by a frame was cleaned with moistened cotton wipes. Samples were kept in a 100% smoke-free box for six hours and placed in 50 mL tubes and stored overnight at -20°C . The procedure of extraction in methanol and DMEM was performed as previously described. Also, smoke-free paper and cotton wipes were processed equally and used as reference. The supernatant was taken out and analyzed for nicotine by colorimetry.

THS collection in smoker's house

To assess the applicability of using paper and cotton to collect THS in indoor environments, a pilot study was conducted at the home of one smoker. Cellulose papers (25 cm²) were disposed in the furnishing surface in the kitchen with no direct exposure to sunlight of a smoker's house. The cellulose substrate was secured in a frame made from clean aluminum foil. The smoker was female, 51 years old, smoked 20 cigarettes per day and reported smoking more in the kitchen. The material collection remained three days in the house and 60 cigarettes were smoked. Eight hours after the last cigarette was extinguished, the papers were removed and an area of equivalent size was cleaned with cotton roll wetted with 1 ml of 1% ascorbic acid. Samples were maintained in a 100% smoke-free box for six hours and placed in a 50 mL tube. The procedure of extraction in DMEM was performed as previously described. The recovered medium was filtered by a 0.22 µm membrane and pH was adjusted if necessary.

Written informed consent to the inclusion of material pertaining to herself was given by the participant who had the guaranteed anonymity. All procedures were approved by the the Institutional Review Board and Ethics Committee of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre (n° 1591/12).

Colorimetric method for determination of nicotine in the samples

An aliquot of sample (0.5 mL) was mixed with 0.2 mL of 4 M acetate buffer (pH 4.7), 0.1 mL of 10% KCN, 0.1 mL of 10% chloramin T and then 0.5 mL of 1% barbituric acid, sequentially. Methanol or DMEM (0.5 mL) was used

as reference. Optical density was measured at 506 nm after 20 min at room temperature. The test was performed in triplicate.

A calibration curve was performed adding nicotine solution to methanol or DMEM at 0.5 to 8 µg/mL.

GC/MS method for identification of nicotine in paper samples

Cellulose chromatography papers were impregnated with nicotine in methanol solution to provide calibration curve points 50, 500, 1000, 1500 and 2000 ng/mL. The solvent extraction was performed as described above. To examine the effect of sample concentration, the supernatant was 1) reduced in automatic concentrator; 2) dried in water bath at 50°C; or 3) reduced by nitrogen evaporation. The extract was recovered in 1 mL methanol. Quinoline (320 ng/mL, Sigma Aldrich) was added as internal standard.

Analyses were conducted using a Focus gas chromatograph coupled to a Thermo ISQ chromatograph (GC/MS) system, from Thermo Scientific (San Jose, USA). Chromatographic separation was performed in a 30 m DB-5 column with 0.25 mm internal diameter and 0.25 µm thick internal coating, at a constant helium flow rate of 1.2 ml / min. The column temperature was held at 100°C for 2 min and then increased at a rate of 15°C / min until reaching 180°C, which was maintained for a further 4 min. The temperature was increased at a rate of 20°C / min until reaching 240°C for 0.5 min. The transfer line temperature was 280°C and the ion source temperature was 300°C. The ions monitored for nicotine were 84 (quantifying ion), 133 and 162 (qualifying ions). The ions monitored for the IS were 129 (quantifying ion), 76 and 102 (qualifying ions). Retention time was 6.94 min for nicotine and 5.92 min for IS.

Cell culture and treatment

Hep-2 cells were obtained from Rio de Janeiro Cell Bank (BCRJ), Brazil. These cells were isolated from tumors grew in rats that had received injections of epidermoid carcinoma tissue isolated from the larynx of a 56-year-old male. This cell line is widely used in toxicity studies and it has good sensitivity to several xenobiotic agents (Amaro, 2008). Moreover, the respiratory tract is an organ directly targeted by smoke cigarettes.

Cells were grown in DMEM in standard conditions. The culture was maintained at 37°C in a humid atmosphere at 5% of CO₂ and a half-open system, and trypsinization was used for cell maintenance.

For THS exposure, cells were seeded at a rate of 2×10^4 cells/well in a 96-well polystyrene microplate. After the cultures reached semiconfluence, culture medium was replaced with DMEM + THS, and cells were exposed for 24 hours for MTT and NRU assays. Samples from smoker's house were exposed to Hep-2 cells for 24, 48, or 72 hours. Paper and cotton without cigarette smoke were used to prepare the negative control.

Cytotoxicity assay by MTT reduction

In order to evaluate cytotoxicity by the mitochondrial activity parameter, a 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma Aldrich) assay described by Mosmann (1983) was used after 24 hours of exposure. The assay was performed as previously described (Trintinaglia et al., 2015). Briefly, 20 µL of MTT 1.67 mg/mL was added to each well and plates were incubated for two hours. After incubation, medium was removed by

inversion, and 200 μ L of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to each well for solubilization. All samples were transferred to a 96-well plate and absorbance was measured at 570 nm with a microplate spectrophotometer.

Cytotoxicity assay by neutral red uptake

The neutral red uptake (NRU) method, described by Borenfreund and Puerner (1985), was used to evaluate cytotoxicity through the lysosome viability. After exposure for 24 hours, the assay was performed as previously described by Trintinaglia et al. (2015). Briefly, culture medium was removed and 200 μ L of DMEM without serum and containing 50 μ g/mL of dye neutral red (Sigma Aldrich) was added to each well. After three hours of incubation at 37° C in humid atmosphere at 5% of CO₂, medium was removed and cells were washed with a buffered saline solution (PBS) followed by another wash with a fixative solution (1% CaCl₂ in 0.5% formaldehyde). After discarding by inversion, 200 μ L of 1% acetic acid in 50% ethanol was added for the solubilization of the dye. Samples were gently shaken for 10 minutes for full dissolution. All samples were transferred to a 96-well plate and absorbance was measured at 540 nm with a microplate spectrophotometer.

Cellular viability by trypan blue exclusion

Cell number was determined by counting the viable and nonviable cells by trypan blue exclusion assay (0.2% dye, Sigma Aldrich) (Strober, 2001). The number of cells was counted and the proliferation rate was calculated (number of cells after the THS exposure / the initial plating number).

Statistical analysis

Data obtained from *in vitro* cytotoxicity assays were expressed as mean $\pm$ standard deviation. One-way ANOVA and the Duncan post-test were used for statistical analysis in IBM SPSS Statistics 19.0 for Windows. The level of significance was set at $p < 0.05$.

Results

Considering a full recovery from nicotine impregnated on paper or cotton wipe, a concentration of 6 μg nicotine in 1 mL methanol or DMEM was expected. However, both samples presented around 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (no significant difference). It was visible that both materials used retained the solvent, which could explain the increase concentration found in the supernatant. Data values for nicotine in paper and cotton samples without nicotine were below the quantitation limit (LOQ = 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Table 1 shows the nicotine concentration quantified in methanol and DMEM by colorimetry of the samples exposed to the cigarette smoke. In order to increase the recovered volume, a syringe was used to remove the solvent. Amount of nicotine in the sample was probably diluted by the increase of solvent volume.

The best calibration curve was obtained when no concentration step was made (coefficient of determination $R^2 = 0.9943$). The worst performances occurred when samples were reduced in automatic concentrator and by nitrogen evaporation ($R^2 = 0.237$ and 0.273 , respectively). The curve of the samples submitted to water bath showed $R^2 = 0.606$.

The cellular effects of experimentally generated THS are shown in Figure 1. Alterations in the cellular functions were found in both samples; however, the cytotoxic effect was not always observed. In MTT assay, a decrease of mitochondrial activity in paper (10 cigarettes, 21.2% less compared to reference; $p=0.003$) and cotton wipe was presented, except for the 20-cigarette sample (31.4% less than reference with 10 cigarettes and 27% with 15 cigarettes; $p<0.001$). Curiously, there was a 17% increase in mitochondrial function with the cotton wipe sample and 20 cigarettes, including activity levels above the control ($p<0.001$). In NRU assay, there was a significant decrease in lysosomal viability (38 to 56%) in samples exposed to the greatest amount of cigarette smoke ($p<0.001$). There was a dose-response relationship between the amount of cigarettes and lysosomal viability, which was stronger for cotton samples ($r=-0.704$ for paper and $r=-0.843$ for cotton samples, $p<0.001$ for both). The proliferation rate was similar among the THS samples and control (Table 2).

Samples collected from smoker's house are presented in Figure 2. There was a significant decline in cellular functions in cotton sample, reaching only 40% of mitochondrial activity and 5% of lysosomal viability in the greatest period of exposure ($p<0.001$, for both). In paper sample, alteration in cellular function occurred only in the lysosomal viability, decreasing 18 to 27% when compared to the negative control ($p=0.003$). Figure 3 shows the formation of salts that caused damage to the cell culture.

Discussion

We have used samples obtained in laboratory and in smoker's home to assess the biological effects of THS exposure. This is one of the first studies on *in vitro* assays to evaluate THS exposure and the first to do it from smoker's home sample. Our data demonstrate that paper and wipe sampling can be reliable markers of tobacco smoke contamination. Moreover, these materials, if properly prepared, may be used to provide substrate for performing cellular assays.

The concentration of nicotine in DMEM extract of THS in paper and cotton was similar to those in methanol extract. This is consistent with the findings of Bahl et al. (2014). The use of ascorbic acid in wipe sampling is made to stabilize nicotine (Quintana et al., 2013; Matt et al., 2004), however the formation of salts interferes in cellular assays and an alternative must be found.

In this study, the MTT and NRU assays were able to show cellular effects of THS. These two assays have been commonly used with a reasonable degree of success since they are based on cellular events that have indirect or direct relevance to cellular responses to chemicals *in vivo* (National Institutes of Health, 2001).

MTT assay is a simple method that shows the disruption of a critical biochemical function and it is used to determine deleterious effects *in vitro* of the several substances (Malich et al., 1997). Functional mitochondria is able to convert the yellow tetrazole water soluble salt MTT to a purple formazan salt by the action of succinate dehydrogenase (Mosmann, 1983). This reduction indicates metabolic status and reflects the number of viable cells (Triglia et al., 1991; Vanden Berghe et al., 2013). However, dead cells may remain with intact

activity of the succinate dehydrogenase or the MTT salt may be reduced by other structures besides the mitochondria. Moreover, some chemical compounds may interact per se with the salt MTT and all this can be mistakenly seen as survival (Berridge et al., 2005; Vanden Berghe et al., 2013; Peng et al., 2005; Lupu and Popescu, 2013). Because of multifaceted results of the mitochondrial function, it is recommended to use another assay together with MTT to monitor cell viability.

NRU assay provides a quantitative estimation of the number of viable cells (Borenfreund and Puerner, 1985), since their lysosomes incorporate vital soluble dye (Borenfreund, Babich and Martin-Alguacil, 1988; Triglia et al., 1991). The dye trapped by the lysosome becomes charged due to the low pH of the organelle, and is unable to leave its interior. Damaged lysosomes lose this ability and its integrity is a highly sensitive indicator of cell viability (Repetto et al., 2008). Lysosome is the terminal compartment of the endocytic pathway, thus the NRU assay is considered as the measurement endpoint (National Institutes of Health, 2001; Česen et al., 2012). This assay is considered technically fast, simple, cheap, sensitive and reproducible (Zhang et al., 1990). While there was a significant decrease in NRU assay at 20 cigarettes sample, in contrast there was an elevated mitochondrial activity. This rise cannot be explained entirely, but a serious disturbance in mitochondrial function may initiate a transient process of mitochondrial permeability, causing a reversible swelling of mitochondria without necessarily trigger cell death (Minamikawa et al., 1999). This increase may be a repercussion of an adaptive response in an attempt to handle the detrimental effects of THS. This reinforces that MTT results may not be interpreted in a simplistic way. Moreover, a dose-response

relationship was only found in NRU assay, indicating that this test may be a more suitable choice rather than the MTT assay.

The trypan blue exclusion assay is the classic way to assess plasma membrane integrity. This assay is simple and inexpensive, but it has limitations, relatively time consuming and it is not readily adapted for large-scale use (Altman, Randers and Rao, 1993). If the number of cells remains unaffected, the alterations found in the other assays can reflect changes in cellular function.

MTT, NRU and trypan blue assays assess different functions and absence of damage in these assays does not indicate nonexistent cellular injury. Moreover, the effects may be different depending on the exposure time. One of the problems in evaluating toxicity is the exposure time chosen, which influences the targets to be monitored (Zucco et al., 2004). Lack of adverse cellular event does not indicate absence of toxicity, since only one timepoint was analyzed and the kinetics of the cell death process has not been performed. The aim of this work was to evaluate whether the sample preparation procedures are suitable for cytotoxicity assays rather to investigate the toxicity of THS.

The concentration of nicotine was considerable higher in the paper samples; however, the worst levels of cell functions were observed on cotton samples. There are other substances in THS, such as VOCs and tobacco-specific nitrosamines, which may be cytotoxic (Ueta et al., 2010; Bahl et al., 2014; Bahl et al., 2015a; Bahl et al., 2015b). These substances may have been more retained in cotton. This hypothesis needs to be tested in future experiments.

Conclusions

This study focused on the applicability of cellular assays to assess the effects of THS as well as sample preparation. Our study demonstrated that paper and cotton are well suited media for THS collection that can be utilized for *in vitro* cell culture models without requirement of cytotoxic preservatives. MTT, NRU and trypan blue assays can be valuable tools for determining the cytotoxicity of THS under controlled *in vitro* conditions. Studies are in progress to assess if levels of THS in smokers' home produce injury.

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge Amanda Ferreira Becker (Feevale University) for assistance with *in vitro* assays.

Declaration of Interest

The authors report no declarations of interest.

References

Altman SA, Randers L, Rao G. (1993). Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnol Prog*, 9,671-4.

Amaro MI, Monasterios M, Avendaño M, Charris J. (2008). Preliminary evaluation of the toxicity of some synthetic furan derivatives in two cell lines. *Artemia salina*. *J Appl Toxicol*, 29, 36-41. doi: 10.1002/jat.1379.

Bahl V, Jacob P 3rd, Havel C, Schick Sf, Talbot P. (2014). Thirdhand cigarette smoke: factors affecting exposure and remediation. *PLoS One*, 9, e108258. doi: 10.1371/journal.pone.0108258.

Bahl V, Shim HJ, Jacob P 3rd, Dias K, Schick SF, Talbot P. (2015a). Thirdhand smoke: Chemical dynamics, cytotoxicity, and genotoxicity in outdoor and indoor environments. *Toxicol In Vitro*, 32, 220-31. doi: 10.1016/j.tiv.2015.12.007.

Bahl V, Weng NJ, Schick SF, Sleiman M, Whitehead J, Ibarra A, Talbot P. (2015b). Cytotoxicity of Thirdhand Smoke and Identification of Acrolein as a Volatile Thirdhand Smoke Chemical That Inhibits Cell Proliferation. *Toxicol Sci*, 150, 234-46. doi: 10.1093/toxsci/kfv327.

Becquemin MH, Bertholon JF, Bentayeb M, Attoui M, Ledur D, Roy F, Roy M, Annesi-Maesano I, Dautzenberg B. (2010). Third-hand smoking: indoor measurements of concentration and sizes of cigarette smoke particles after resuspension. *Tob Control*, 19, 347-8. doi: 10.1136/tc.2009.034694.

Berridge MV, Herst PM, Tan AS. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev*, 11, 127-52.

Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N. (1988). Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays-the neutral red . (nr). and tetrazolium mtt tests. *Toxicol in Vitro*, 2, 1-6.

Borenfreund E, Puerner J. (1985). Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett*, 24, 119-24.

Česen MH, Pegan K, Spes A, Turk B. (2012). Lysosomal pathways to cell death and their therapeutic applications. *Exp Cell Res*, 318, 1245-51. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.03.005.

Fotakis G, Timbrell JA. (2006). *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol Lett*, 160, 171-7.

Hammer TR, Fischer K, Mueller M, Hoefer D. (2011). Effects of cigarette smoke residues from textiles on fibroblasts, neurocytes and zebrafish embryos and nicotine permeation through human skin. *Int J Hyg Environ Health*, 214, 384-91. doi: 10.1016/j.ijheh.2011.04.007.

Hang B, Sarker AH, Havel C, Saha S, Hazra TK, Schick S, Jacob P 3rd, Rehan VK, Chenna A, Sharan D, Sleiman M, Destailats H, Gundel L. (2013). Thirdhand smoke causes DNA damage in human cells. *Mutagenesis*, 28, 381-91. doi: 10.1093/mutage/get013.

Hoh E, Hunt RN, Quintana PJ, Zakarian JM, Chatfield DA, Wittry BC, Rodriguez E, Matt G. (2012). Environmental tobacco smoke as a source of

polycyclic aromatic hydrocarbons in settled household dust. *Environ Sci Technol*, 46, 4174-83. doi: 10.1021/es300267g.

International Agency for Research on Cancer. (2004). Tobacco Smoke and Involuntary Smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 83, 1-1438.

ISO 10993:5. (2009). Standard. Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: Tests for in vitro Cytotoxicity. International Organization for Standardization (ISO): Geneva, Switzerland. Available online: http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=36406. Accessed on 14 January 2016.

Johnson MD, Schilz J, Djordjevic MV, Rice JR, Shields P. (2009). Evaluation of in vitro assays for assessing the toxicity of cigarette smoke and smokeless tobacco. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18, 3263-304. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-09-0965.

Jung JW, Ju YS, Kang HR. (2012). Association between parental smoking behavior and children's respiratory morbidity: 5-year study in an urban city of South Korea. *Pediatr Pulmonol*, 47, 338-45. doi: 10.1002/ppul.21556.

Khatibisepehr S, Huang B, Ibrahim F, Xing JZ, Roa W. (2011). Data-based modeling and prediction of cytotoxicity induced by contaminants in water resources. *Comput Biol Chem*, 35, 69-80. doi: 10.1016/j.compbiolchem.2011.02.001.

Lupu AR, Popescu T. (2013). The noncellular reduction of MTT tetrazolium salt by TiO₂ nanoparticles and its implications for cytotoxicity assays. *Toxicol in Vitro*, 27, 1445–50. doi: 10.1016/j.tiv.2013.03.006.

Malich G, Markovic B, Winder C. (1997). The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the *in vitro* cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. *Toxicology*, 124, 179-92.

Martins-Green M, Adhami N, Frankos M, Valdez M, Goodwin B, Lyubovitsky J, Dhall S, Garcia M, Egiebor I, Martinez B, Green HW, Havel C, Yu L, Liles S, Matt G, Destailats H, Sleiman M, Gundel LA, Benowitz N, Jacob P 3rd, Hovell M, Winickoff JP, Curras-Collazo M. (2014). Cigarette smoke toxins deposited on surfaces: implications for human health. *PLoS One*, 9, e86391. doi: 10.1371/journal.pone.0086391.

Matt GE, Quintana PJ, Destailats H, Gundel LA, Sleiman M, Singer BC, Jacob P, Benowitz N, Winickoff JP, Rehan V, Talbot P, Schick S, Samet J, Wang Y, Hang B, Martins-Green M, Pankow JF, Hovell MF. (2011a). Thirdhand tobacco smoke: emerging evidence and arguments for a multidisciplinary research agenda. *Environ Health Perspect*, 119, 1218-26.

Matt GE, Quintana PJ, Hovell MF, Bernert JT, Song S, Novianti N, Juarez T, Floro J, Gehrman C, Garcia M, Larson S. (2004). Households contaminated by environmental tobacco smoke: sources of infant exposures. *Tob Control*, 13, 29-37.

Matt GE, Fortmann AL, Quintana PJ, Zakarian JM, Romero RA, Chatfield DA, Hoh E, Hovell MF. (2013). Towards smoke-free rental cars: an evaluation of voluntary smoking restrictions in California. *Tob Control*, 22, 201-7. doi: 10.1136/tobaccocontrol-2011-050231.

Matt GE, Quintana PJ, Zakarian JM, Fortmann AL, Chatfield DA, Hoh E, Uribe AM, Hovell MF. (2011b). When smokers move out and non-smokers

move in: residential thirdhand smoke pollution and exposure. *Tob Control*, 20, e1. doi: 10.1136/tc.2010.037382.

Minamikawa T, Williams DA, Bowser DN, Nagley P. (1999). Mitochondrial permeability transition and swelling can occur reversibly without inducing cell death in intact human cells. *Exp Cell Res*, 246, 26-37.

Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assays for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63.

National Institutes of Health. (2001). Report of the International Workshop on *In Vitro* Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity. NIH Publication No. 01-4499. National Institute for Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC. <http://www.epa.gov/hpv/pubs/general/nih2001a.pdf> Accessed 16 April 2014.

Peng L, Wang B, Ren P. (2005). Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 45, 108–11.

Piersma AH. (2006). Alternative Methods for Developmental Toxicity Testing. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 98, 427–31.

Quintana PJ, Matt GE, Chatfield D, Zakarian JM, Fortmann AL, Hoh E. (2013). Wipe sampling for nicotine as a marker of thirdhand tobacco smoke contamination on surfaces in homes, cars, and hotels. *Nicotine Tob Res*, 15, 1555-63. doi: 10.1093/ntr/ntt014

Repetto G, Del Peso A, Zurita JL. (2008). Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. *Nat Protoc*, 3, 1125-31. doi: 10.1038/nprot.2008.75.

Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS. (2003). Teste *in vitro* de cytotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Mat Res*, 6, 317-20. doi: 10.1590/S1516-14392003000300003.

Sleiman M, Gundel LA, Pankow JF, Jacob P 3rd, Singer BC, Destailats H. (2010). Formation of carcinogens indoors by surface-mediated reactions of nicotine with nitrous acid, leading to potential thirdhand smoke hazards. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 6576-81. doi: 10.1073/pnas.0912820107.

Strober W. (2001). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*, 111, A3.B.1-A3.B.3. doi: 10.1002/0471142735.ima03bs21.

Thomas JL, Hecht SS, Luo X, Ming X, Ahluwalia JS, Carmella SG. (2014). Thirdhand tobacco smoke: a tobacco-specific lung carcinogen on surfaces in smokers' homes. *Nicotine Tob Res*, 16, 26-32. doi: 10.1093/ntr/ntt110.

Triglia D, Sherard Braa S, Yonan C, Naughton GK. (1991). Cytotoxicity testing using neutral red and mtt assays on a three- dimensional human skin substrate. *Toxicol in Vitro*, 5, 573-8.

Trintinaglia L, Bianchi E, Silva LB, Nascimento CA, Spilki FR, Ziulkoski AL. (2015). Cytotoxicity assays as tools to assess water quality in the Sinos river basin. *Braz J Biol*, 75, 75-80. doi: 10.1590/1519-6984.0113.

U.S. Congress. Office of Technology Assessment. (1986). *Alternatives to Animal Use in Research, Testing, and Education*. Government Printing Office, Washington, DC.

Ueta I, Saito Y, Teraoka K, Miura T, Jinno K. (2010). Determination of volatile organic compounds for a systematic evaluation of third-hand smoking. *Anal Sci*, 26, 569-74. doi: 10.2116/analsci.26.569.

US Department of Health and Human Services. (2006). The Health Consequences of Involuntary Exposure to Tobacco Smoke: A Report of the Surgeon General. US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, Coordinating Center for Health Promotion, National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion, Office on Smoking and Health, Washington, DC.

Vanden Berghe T, Grootjans S, Goossens V, Dondelinger Y, Krysko DV, Takahashi N, Vandenabeele P. (2013). Determination of apoptotic and necrotic cell death *in vitro* and *in vivo*. *Methods*, 61, 117-29. doi: 10.1016/j.ymeth.2013.02.011.

Winickoff JP, Friebely J, Tanski SE, Sherrod C, Matt GE, Hovell MF, McMillen RC. (2009). Beliefs about the health effects of "thirdhand" smoke and home smoking bans. *Pediatrics*, 123, e74-79. doi: 10.1542/peds.2008-2184.

Zhang SZ, Lipsky MM, Trump BF, Hsu IC. (1990). Neutral red . (NR). assay for cell viability and xenobiotic-induced cytotoxicity in primary cultures of human and rat hepatocytes. *Cell Biol Toxicol*, 6, 219-34.

Zucco F, De Angelis I, Testai E, Stamatii A. (2004). Toxicology investigations with cell culture systems: 20 years after. *Toxicol In Vitro*, 18, 153-163. doi: 10.1016/S0887-2333. (03).00147-4.

Table 1: Nicotine concentration ($\mu\text{g/mL}$) of cigarette smoke collected in paper and cotton wipe recovered in Methanol and DMEM (colorimetric method).

	Methanol				DMEM			
	5 cig	10 cig	15 cig	20 cig	5 cig	10 cig	15 cig	20 cig
Paper	3.6	7.0	>ULOQ	>ULOQ	5.4	>ULOQ	>ULOQ	>ULOQ
Cotton wipe	1.4	2.0	1.8	2.4	0.94	1.53	1.70	2.31

ULOQ: upper limit of quantitation

Table 2: Proliferation rate in Hep-2 cells exposed for 24 hours to THS generated by burning cigarettes in laboratory chamber (paper samples).

Sample	Proliferation rate
Control	1.31 ± 0.33
1 cigarette	1.87 ± 0.15
3 cigarettes	1.31 ± 0.27
5 cigarettes	1.52 ± 0.23
10 cigarettes	$0.77 \pm 0.08^*$

* $p < 0.05$ (in relation to 1 and 5 cigarettes, but not to control; One-way ANOVA)

Proliferation rate = $\frac{\text{number of cells after 24h}}{\text{initial number of cells}}$

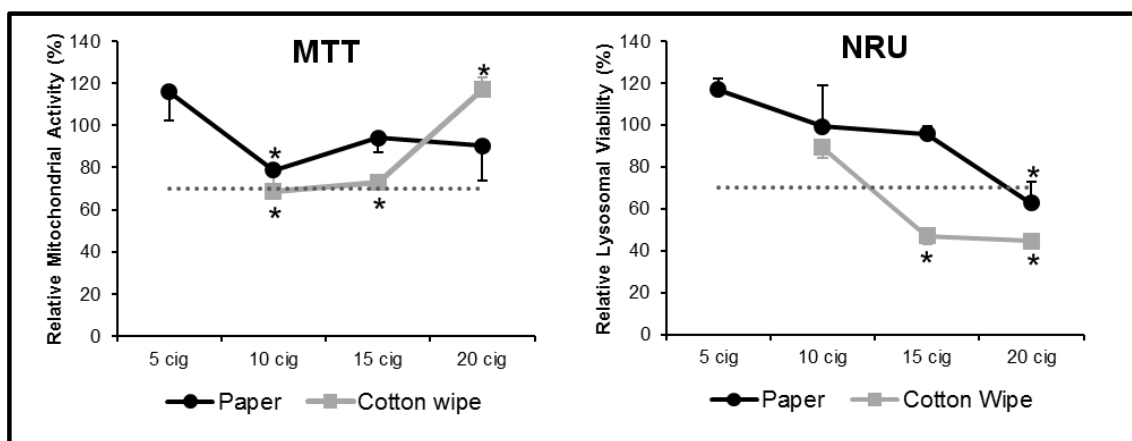


Figure 1: Cytotoxicity assays in Hep-2 cells of experimentally generated THS. Left: MTT assay (mitochondrial activity). Right: Neutral red uptake assay (lysosomal viability). Values are presented relative to the negative control. The dashed line represents 70% of the control value. Values below are considered cytotoxic (ISO 10993:5).

* $p < 0.05$ (in relation to negative control; One-way ANOVA).

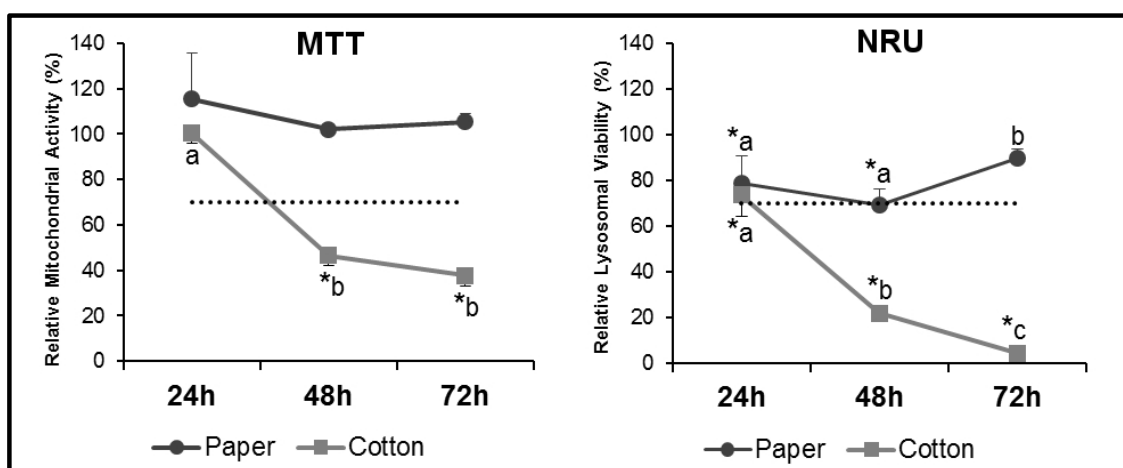


Figure 2: Cytotoxicity assays in Hep-2 cells of THS in smoker's house. Left: MTT assay (mitochondrial activity). Right: Neutral red uptake assay (lysosomal viability). Values are presented relative to the negative control. The dashed line represents 70% of the control value. Values below are considered cytotoxic (ISO 10993:5).

* $p < 0.05$ (in relation to negative control). The letters show significance statistic in the same line: means with different letters are significantly different ($p < 0.05$), whereas means with similar letters are not different from each other (One-way ANOVA, Duncan post hoc test).

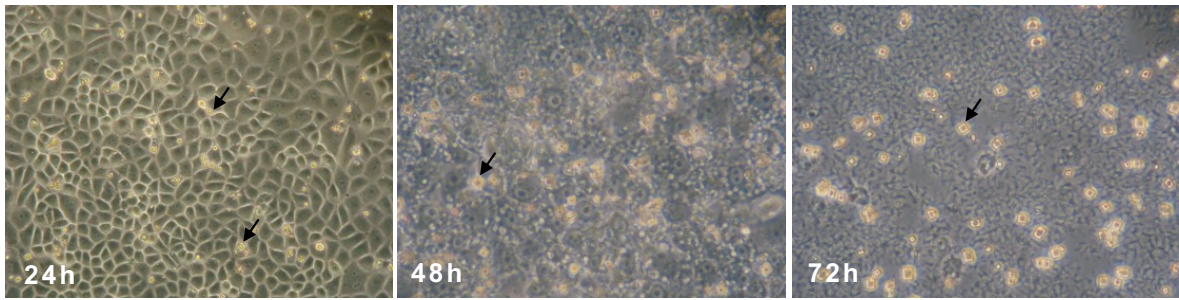


Figure 3: Micrographs of Hep-2 cells exposed to THS for 24, 48 and 72 hours. The arrows indicate salt crystals. (Magnification 100x for 24h and 400x for 48h and 72h).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso estudo demonstrou que papel e algodão representaram bons modelos para simular a deposição de nicotina em superfícies de casas de fumantes e que foi possível extrair para um solvente aquoso ou orgânico a nicotina presente nos materiais utilizados na coleta. Algodão apresentou maior variabilidade e maiores níveis da substância entre as casas de fumantes. A exposição de tiras de papel por somente um dia nas casas de fumantes foi satisfatória para fornecer amostras para os testes. Como esperado, as amostras de casas de fumantes apresentaram níveis de nicotina mais elevados do que aquelas obtidas das casas de não fumantes. O ensaio MTT, avaliado nos diferentes tipos celulares, demonstrou alterações significativas utilizando material exposto ao ambiente real das casas de fumantes.

Apesar dos crescentes trabalhos sobre o THS, este foi o primeiro a coletar amostras em casas de fumantes a fim de avaliar efeitos celulares que podem ser clinicamente relevantes. Mesmo que nossos resultados não tenham mostrado efeito citotóxico clássico, como morte celular ou diminuição crítica da viabilidade e função, alterações celulares com impacto biológico foram detectadas. Nossa abordagem utilizou diferentes tipos celulares permitindo, dessa maneira, ampliar a avaliação de efeitos por meio de ensaios de citotoxicidade distintos. Devido à diferente sensibilidade das células ao THS, é importante delinear projetos que contemplem mais de um tipo celular sob diversas metodologias.

Distinguir ambientes limpos daqueles que possuem resíduos tabágicos por meio de um método simples de coleta, empregando materiais compostos

de celulose, pode direcionar para o desenvolvimento de um dispositivo que permita a monitorização da exposição à fumaça de cigarro e ao THS nos ambientes internos.

Os efeitos associados ao tabagismo ocorrem, principalmente, devido à exposição a longo prazo. O tabagismo passivo é caracterizado pela exposição a pequenas quantidades das muitas substâncias presentes na fumaça de cigarro por um longo período de tempo. Nosso procedimento utilizou exposição às células por 24 horas, mimetizando os efeitos da exposição aguda. Delinear um estudo que preveja tempos de exposição maiores pode fornecer informações importantes e mais representativas do que acontece aos não fumantes expostos ao THS.

Os riscos do THS ainda são desconhecidos pela população. Coloca-se em discussão a necessidade de trazê-lo à luz e incluí-lo nas discussões científicas e com a sociedade, assim como foi feito com o tabagismo passivo alguns anos atrás, até mesmo porque o THS se caracteriza como uma forma de tabagismo passivo junto à exposição secundária ou involuntária da fumaça de cigarro. Como nem mesmo a ventilação e sistemas de limpeza do ar são eficazes para impedir a exposição aos componentes presentes na fumaça de cigarro, a única medida efetiva para eliminar a exposição ao tabagismo passivo em não fumantes é impedir totalmente o tabagismo ativo em espaços internos. Cria-se então a necessidade de ambientes 100% livres do tabaco 100% do tempo adotando-se práticas restritivas ao fumo para proteger não fumantes em residências e ambientes particulares. Por outro lado, o transporte dos muitos constituintes do THS pelo próprio fumante pode não garantir a ausência de exposição a não fumantes, assim o esclarecimento sobre os danos provocados

pelo THS poderia ser usado clinicamente para encorajar a cessação do tabagismo.

5. ANEXOS

5.1. Parecer do Comitê de Ética



COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
UFSCPA

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFSCPA, registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob o nº 075/05 em 23/07/04, analisou o Projeto:

Projeto: 11-894

Versão do Projeto:

Versão do TCLE:

Pesquisadores:

DENISE MESQUITA DANTAS

LUCIANA RIZZIERI FIGUEIRÓ

ANA LUIZ ZIULKOSKI

Título: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS CONSTITUINTES DO THIRDHAND SMOKE

Esse projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos conforme as Resoluções 196/09 e demais Resoluções complementares. Toda e qualquer alteração do projeto, assim como eventos adversos graves, deverão ser comunicados a este CEP. Os TCLE, quando necessários, somente poderão ser utilizados após prévia e explícita aprovação (carimbo) de sua redação por este CEP".

Porto Alegre, 20 de março de 2012

José Geraldo Vernet Taborda
Coordenador do CEP/UFSCPA

5.2. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Avaliação da Toxicidade dos Constituintes do *Thirdhand Smoke*

O estudo acima referido é realizado como projeto de doutorado do Programa de Pós Graduação em Patologia da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. Antes de concordar em participar, é importante que você leia e entenda todas as explicações a seguir. Leia atentamente as informações e pergunte qualquer dúvida que você tenha. Se você escolher assinar e participar, uma cópia deste documento será entregue a você.

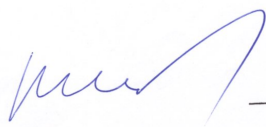
Recentemente, passou a ser discutida mais uma forma de exposição ao tabaco - *Thirdhand Smoke* (THS) – que consiste nos poluentes residuais da fumaça de cigarro. A principal preocupação com o THS é embasado na presença e longa persistência de muitos compostos tóxicos. No entanto, pouco é conhecido sobre os efeitos dessa forma de exposição aos indivíduos. O trabalho tem como objetivo avaliar a toxicidade por meio de estudos em laboratório dos constituintes do THS. Para isso, faz-se necessário a coleta de material em ambientes que fumantes habitualmente permanecem fumando e em ambientes não frequentados por fumantes.

A coleta será realizada em um dos ambientes da casa por um membro da equipe de pesquisa. Para isso, um pedaço de papel e/ou de tecido será colocado na superfície de algum móvel. Ainda será realizada a limpeza da superfície com algodão. O procedimento de coleta não acarretará dano ao móvel escolhido. O material será coletado 1, 3 e 7 dias após a sua colocação. Durante esse período, é importante que você realize suas atividades normalmente. Após o período combinado, o material será retirado por um membro da equipe e encaminhado para as análises laboratoriais.

Criaremos um código para cada amostra para que não haja associação da amostra com dados pessoais do fumante ou que identifiquem a casa da coleta. Os dados provenientes do estudo só serão utilizados para o fim descrito nesse termo e serão mantidos em sigilo, sendo que a publicação se dará de forma coletiva. O resultado dos testes não será conhecido por qualquer pessoa não relacionada ao estudo.

Sua participação nesta pesquisa é inteiramente voluntária e não acarretará custos a você nem algum tipo de pagamento. Você pode recusar-se a participar nesta pesquisa ou poderá desistir de sua participação em qualquer momento.

Se você tiver qualquer dúvida sobre o estudo, precisar de quaisquer informações adicionais, situações de emergência ou ainda achar que sofreu algum dano relacionado à pesquisa, por favor, entre em contato a qualquer momento com a pesquisadora Dra. Denise Dantas (Rua Sarmento Leite nº 245 / telefone 3303-8755). Para qualquer pergunta sobre os meus direitos como participante deste estudo ou se penso que fui prejudicado pela minha participação, posso chamar Ms. Tais Moreira (3303-8764) e Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA (Rua Sarmento Leite nº 245 / telefone 3303-8804).


CEP/UFCSPA
TC LE
APROVADO
15/03/12 26
JOSÉ G. V. TABORDA
COORDENADOR

CONSENTIMENTO

Eu, _____

li as informações acima e entendi o objetivo do estudo, assim como os riscos e benefícios esperados com minha participação nesta pesquisa clínica. Eu tive a oportunidade de esclarecer todas as minhas dúvidas, e todas as minhas perguntas foram respondidas. Assinando este termo, eu forneço meu consentimento informado em participar neste estudo e não abro mão de nenhum dos meus direitos como voluntário. Autorizo que os dados coletivos sejam utilizados para publicação. Eu receberei uma cópia datada e assinada deste termo de consentimento antes de iniciar qualquer avaliação ou procedimento de estudo.

Assinatura

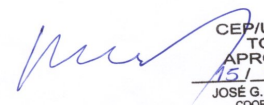
Data

Eu, abaixo assinado, explico todos os detalhes deste estudo para o voluntário acima identificado.

Nome Pesquisador ou Co-Pesquisador

Assinatura

Data


CEP/UFCSPA
TC LE
APROVADO
15/03/12 27
JOSÉ G. V. TABORDA
COORDENADOR

5.3. Divulgação dos resultados

1) Figueiró LR, Ziulkoski AL, Dantas DCM. *Thirdhand smoke*: avaliação de procedimento para coleta e extração (apresentação oral). IX Jornada do Programa de Pós-Graduação em Patologia, UFCSPA, 2013.

2) Figueiró LR, Ziulkoski AL, Dantas DCM. *Thirdhand smoke*: avaliação de procedimento para coleta e extração (resumo em anais de evento). XVIII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2013.

3) Becker AF, Figueiró LR, Dantas DCM, Ziulkoski AL. Avaliação dos danos da fumaça residual do cigarro em cultivos celulares: efeitos tóxicos do *thirdhand smoke* (resumo em anais de evento). Inovamundi - Feira de Iniciação Científica, Universidade Feevale, 2014. Destaque da Feira de Iniciação Científica – Biomedicina.

4) Becker AF, Figueiró LR, Ziulkoski AL, Dantas DCM. Avaliação dos danos da fumaça residual do cigarro em cultivos celulares: efeitos tóxicos do *thirdhand smoke* (capítulo de livro). In: Feira de Iniciação Científica 2014 [recurso eletrônico]: ciência, tecnologia e inovação: livro de destaques / Feira de Iniciação Científica. – Novo Hamburgo: Feevale, 2015.

5) Figueiró LR, Becker AF, Linden R, Dantas DCM, Ziulkoski AL. Cellular effects of thirdhand tobacco smoke (pôster). 9th Congress of Toxicology in Developing Countries and the XIX Congress of Toxicology. 2015.

6) Figueiró LR, Ziulkoski AL, Dantas DCM. Avaliação da citotoxicidade do *thirdhand smoke* (apresentação oral). X Jornada do Programa de Pós-Graduação Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre. 2015.

7) Becker AF, Figueiró LR, Dantas DCM, Ziulkoski AL. A comparação de ensaios de viabilidade celular em células Hep-2 e 3T3 expostas ao *thirdhand smoke* (resumo em anais de evento). Inovamundi - Feira de Iniciação Científica, Universidade Feevale, 2015.

8) Versão resumida da Introdução da Tese foi submetida para o periódico Cadernos de Saúde Pública como Revisão.

Figueiró LR, Ziulkoski AL, Dantas DCM. *Thirdhand smoke*: quando o perigo vai além do que se vê ou sente. Cadernos de Saúde Pública (*submissão*).