



Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós-Graduação Engenharia Ambiental
Mestrado em Engenharia Ambiental

Lorena Giacomini Martins

AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS EMISSÕES DA
INDÚSTRIA SIDERÚRGICA NA EXPOSIÇÃO NÃO-
OCUPACIONAL AO BENZENO

Ouro Preto, MG

2009



Universidade Federal de Ouro Preto
Programa de Pós-Graduação Engenharia Ambiental
Mestrado em Engenharia Ambiental

Lorena Giacomini Martins

**“AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DAS EMISSÕES DA
INDÚSTRIA SIDERÚRGICA NA EXPOSIÇÃO NÃO-
OCUPACIONAL AO BENZENO”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Ouro Preto, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título: “Mestre em Engenharia Ambiental – Área de Concentração: Saneamento Ambiental”

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Xavier Coutrim

Co-Orientador: Prof. Dr. Robson José de Cássia Franco Afonso

Ouro Preto, MG

2009

M386a

Martins, Lorena Giacomini.

Avaliação da influência das emissões da indústria siderúrgica na exposição não ocupacional ao benzeno [manuscrito] / Lorena Giacomini Martins - 2009.

xiv, 90f. : il., color.; graf.; tab.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Xavier Coutrim.

Coorientador: Prof. Dr. Robson José de Cassia Franco Afonso.


Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.

Área de concentração: Saneamento Ambiental.

1. Benzeno - Teses. 2. Exposição ocupacional - Teses. 3. Monitorização biológica - Teses. 4. Ácido *trans, trans*-mucônico - Teses. 5. Coqueria - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 547.532:614.878

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

 UFOP <small>Universidade Federal de Ouro Preto</small>	Ministério da Educação Universidade Federal de Ouro Preto Programa de Mestrado em Engenharia Ambiental ICEB - Campus – Morro do Cruzeiro Ouro Preto – MG – CEP 35.400-000 Fone: (031)3559-1725 E-mail: proagua@iceb.ufop.br
---	--

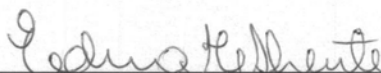
*“Avaliação da influência das emissões da indústria siderúrgica na
exposição não ocupacional ao Benzeno”*

Autora: Lorena Giacomini Martins

Dissertação defendida e aprovada, em 25 de setembro de 2009, pela banca examinadora
constituída pelos professores:



Professor Dr. Maurício Xavier Coutrim – Orientador
Universidade Federal de Ouro Preto



Professora Dr.ª. Edna Maria Alvarez Leite
Universidade Federal de Minas Gerais



Professor Dr. José Fernando de Paiva
Universidade Federal de Ouro Preto

“Para tudo há um tempo, para cada coisa há um momento debaixo dos céus.”(Eclesiastes 3,1)

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a Deus e a todos que direta ou indiretamente sempre me incentivaram nessa conquista.

Em especial agradeço a minha família: meus pais, Nilson e Glória, minha irmã Fernanda e meu cunhado Wagner, e ao meu esposo, Luiz Augusto, pelo companheirismo, compreensão, incentivo e apoio contínuos. Vocês sempre fazem a diferença!

Aos professores, Maurício Xavier Coutrim e Robson José de Cássia Franco Afonso, por todos os ensinamentos transmitidos.

Aos amigos do laboratório pelo companheirismo.

E, também especialmente, à Suzana pelo empenho incansável em ver esse trabalho realizado.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	ix
LISTA DE NOTAÇÕES	x
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO	
1.1. OBJETIVOS	2
1.1.1. Objetivo Geral	2
1.1.2. Objetivos Específicos	3
1.2. JUSTIFICATIVA	3
CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1. BENZENO	5
2.1.1. Toxicidade	7
2.1.2. Biotransformação	9
2.1.3. Principais Fontes de Emissão de Benzeno	11
2.2. LEGISLAÇÃO DO BENZENO	13
2.2.1. Legislação para Exposição Ocupacional ao Benzeno	13
2.2.2. Legislação para Exposição Não-Ocupacional ao Benzeno	16
2.3. INDICADORES BIOLÓGICOS DE EXPOSIÇÃO AO BENZENO	17
2.3.1. Ácido <i>trans, trans</i> -mucônico	18
CAPÍTULO 3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1. METODOLOGIA	22
3.1.1. Submissão do Projeto Ao Comitê De Ética Em Pesquisa	22
3.1.2. Amostragem	23
3.1.3. Otimização do Método Analítico	24
3.1.3.1. Quantificação do Ácido <i>trans, trans</i> -mucônico	26
<i>Método de Extração</i>	26
<i>Método Cromatográfico</i>	28
3.1.4. Validação do Método	30
<i>Interferência da Matriz Biológica</i>	31

	<i>Linearidade e Faixa de Trabalho</i>	32
	<i>Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)</i>	33
	<i>Precisão</i>	33
	<i>Recuperação</i>	34
3.1.5.	Quantificação do ATTM	35
3.1.5.1	Determinação de Creatinina	35
	CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES	
4.1.	OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	
4.1.1.	Separação e Identificação do ATTM	37
4.1.2.	Interferência da Matriz Biológica	38
4.1.3.	Linearidade e Faixa de Trabalho	40
4.1.4.	Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)	41
4.1.5.	Precisão	42
4.1.6.	Recuperação	43
4.2.	AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DE ATTM URINÁRIO	44
4.2.1.	Avaliação dos resultados de ATTM por Sítio de amostragem	52
4.2.2.	Avaliação de resultados de ATTM entre fumantes e não fumantes	56
4.2.3.	Relação entre ATTM urinário e sexo	59
4.2.4.	Relação entre ATTM urinário e benzeno atmosférico	61
4.2.5.	Análise dos dados considerados <i>outliers</i>	62
	CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES	64
	REFERÊNCIAS	65
	ANEXOS	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Diferentes formas de representação da molécula do benzeno.	5
Figura 2.2	Principais Vias Metabólicas do Benzeno: CYP, citocromo P450; GSH, glutationa; MPO, mieloperoxidases; NQO1: quinona oxidoredutase.	10
Figura 3.1	Direção e velocidade dos ventos.	24
Figura 3.2	Cartuchos utilizados na extração do ATTM.	27
Figura 3.3	Sistema de extração a vácuo (<i>manifold</i>).	28
Figura 4.1	Cromatogramas mostrando picos de ATTM em diferentes amostras: A) padrão de 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$, em fase aquosa, com tempo de retenção de 8,7 minutos; B) amostra fortificada com padrão de 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$; e C) amostra <i>in natura</i> .	39
Figura 4.2	Comparação entre Curvas Analíticas confeccionadas em água e em pool de urina.	40
Figura 4.3	Parte de um cromatograma de uma amostra, ampliado para destacar a linha de base e os picos considerados ruídos para essa injeção, com suas respectivas áreas.	42
Figura 4.4	<i>Boxplot</i> dos dados referentes às duas campanhas de amostragem.	47
Figura 4.5	Resultados do teste de variância realizado entre os dados das duas campanhas de amostragem.	47
Figura 4.6	Resultados do teste de variância realizado entre os dados das duas campanhas de amostragem sem os dados considerados <i>outliers</i> .	49
Figura 4.7	Gráfico de distribuição de todos resultados de ATTM urinário ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de creatinina) sem <i>outliers</i> .	49
Figura 4.8	Teste de variância para os resultados de ATTM urinário ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de creatinina) entre os diferentes sítios de amostragem.	52
Figura 4.9	Dispersão dos resultados de ATTM urinário ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de creatinina) para os diferentes sítios de amostragem, evidenciando os <i>outliers</i> de cada grupo.	52
Figura 4.10	Teste de variância para os resultados de ATTM urinário ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de creatinina) entre os diferentes sítios de amostragem, sem os dados <i>outliers</i> .	53
Figura 4.11	Teste de variância entre os Sítios 1 e 4, sem os dados considerados <i>outliers</i> .	54
Figura 4.12	Teste de variância entre os Sítios 3 e 4, sem os dados considerados <i>outliers</i> .	54
Figura 4.13	<i>Boxplot</i> dos dados agrupados em fumantes e não fumantes.	57
Figura 4.14	Teste de variância entre Fumantes e Não Fumantes, desconsiderando todos <i>outliers</i> calculados para os dois grupos.	58
Figura 4.15	Teste de variância entre Fumantes e Não fumantes, desconsiderando os <i>outliers</i> apenas do grupo Não Fumantes.	58
Figura 4.16	Teste de variância entre resultados de ATTM urinário ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de creatinina) de voluntários do sexo feminino e masculino não-fumantes.	60
Figura 4.17	Teste de variância entre resultados de ATTM urinário ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de creatinina) de voluntários do sexo feminino e masculino que são fumantes.	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Indicadores Biológicos de Exposição ao Benzeno (IBE-Bz).	18
Tabela 2.2	Diferentes Métodos de Determinação do ATTM com ênfase nas de CLAE.	20
Tabela 3.1	Reagentes Utilizados.	25
Tabela 3.2	Materiais e Equipamentos Utilizados.	26
Tabela 3.3	Composição do equipamento de CLAE.	28
Tabela 3.4	Condições de análise para separação dos picos de ATTM por CLAE-DAD.	29
Tabela 4.1	Resumo da estatística de Regressão.	41
Tabela 4.2	Análise de variância dos dados de linearidade.	41
Tabela 4.3	Estatística descritiva para os resultados de LD e LQ, em $\mu\text{g.L}^{-1}$, do método analítico otimizado.	42
Tabela 4.4	Coefficientes de Variação obtidos no ensaio de precisão através de repetibilidade.	43
Tabela 4.5	Resultados do ensaio de recuperação do método analítico.	44
Tabela 4.6	Dados meteorológicos da cidade referentes aos dois períodos de amostragem.	45
Tabela 4.7	Caracterização dos voluntários quanto ao gênero e exposição à fumaça do cigarro.	45
Tabela 4.8	Estatística descritiva para os resultados de ATTM urinário das duas campanhas, em $\mu\text{g.g}^{-1}$ creatinina	46
Tabela 4.9	Estatística descritiva para os resultados de ATTM urinário das duas campanhas, em $\mu\text{g.g}^{-1}$ creatinina, sem <i>outliers</i> .	48
Tabela 4.10	Exemplos de concentrações de ATTM urinário encontrados na literatura.	50
Tabela 4.11	Estatística descritiva para os resultados de ATTM urinário ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de creatinina) por sítio de amostragem.	51
Tabela 4.12	Estatística descritiva para os resultados de ATTM urinário ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de creatinina) por sítio de amostragem, sem <i>outliers</i> dos sítios.	53
Tabela 4.13	Estatística descritiva para os resultados de ATTM urinário ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de creatinina) para os grupos “Fumantes”, “Fumantes sem <i>outliers</i> ” e “Não Fumantes sem <i>outliers</i> ”	57
Tabela 4.14	Estatística descritiva: resultados de ATTM urinário ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de creatinina) entre gêneros, desconsiderando os dados <i>outliers</i> .	59
Tabela 4.15	Relação de concentrações de ATTM urinário e benzeno atmosférico de autores que quantificaram os dois analitos.	62

LISTA DE NOTAÇÕES

- ABIQUIM – Associação Brasileira da Indústria Química
- ACGIH – *American Conference of Governmental Industrial Hygienists*
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATRDR – *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*
- ATTM – Ácido *trans,trans* mucônico
- CPE – Comitê de Ética em Pesquisa
- CESTESB – Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
- CNS – Conselho Nacional de Saúde
- CPSC – *Consumer Product Safety Commission*
- COVs – Compostos Orgânicos Voláteis
- DAD – Detector por Arranjo de Diodos
- EFS – Extração em Fase Sólida
- EPAQS – *Expert Panel on Air Quality Standards*
- FDA – *Food and Drug Administration*
- Fundacentro – Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho
- HPAs – Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
- IARC – International Agency for Research on Cancer
- ICSC – *International Chemical Safety Cards*
- IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*
- IBE – Indicador Biológico de Exposição
- INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
- LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MAC – *Maximum Allowable Concentrations*

MAK – *Maximale Arbeitsplatz Konzentration*

MDIC – Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior

MPT – Média Ponderada no Tempo

MTE – Ministério do Trabalho e Emprego

MS – Ministério da Saúde

NIOSH – *National Institute for Occupational Safety and Health*

OEL – *Occupational Exposition Limit*

OSHA – *Occupational Safety and Health Administration*

PPB – Partes por Bilhão

PPM – Partes por Milhão

SECEX – Secretaria de Comércio Exterior

STEL – *Short-term Exposure Limit*

TLV-TWA – *Threshold Limit Value – Time Weighted average*

TRK – *Technische Richtkonzentrationen*

USEPA – *United States Environmental Protection Agency*

UV-vis – Ultravioleta Visível

VRT – Valor de Referência Tecnológico

WHO – *World Health Organization*

O benzeno, substância comprovadamente carcinogênica, é um composto onipresente na natureza. Seus efeitos tóxicos crônicos envolvem principalmente alterações hematológicas, como leucemias, além de influenciar diversos tipos de danos ao DNA. Existem diferentes fontes antropogênicas de emissão de benzeno, além de fontes naturais, sendo as principais fumaça de cigarro, escapamentos de automóveis, processos de abastecimento em postos de combustíveis e emissões industriais, principalmente de indústrias siderúrgicas e petroquímicas. As emissões mais significativas de benzeno nas siderúrgicas ocorrem durante o processo de coqueificação e são oriundas principalmente nas coquearias, normalmente presentes nessas indústrias. Tanto estas emissões quanto as das petroquímicas, são previstas por leis ocupacionais que instituem limites de exposição aos trabalhadores desses setores. As emissões de benzeno em áreas ocupacionais são legalmente controladas em todo o mundo, mas, poucos países legislam sobre a exposição não ocupacional. O Brasil não apresenta regulamentação quanto às concentrações atmosféricas fora de ambientes ocupacionais. Devido a esses fatores, nesta pesquisa foi avaliada a ocorrência de diferenças estatísticas no teor de ácido *trans*, *trans*-mucônico (ATTM) urinário, indicador biológico de exposição ao benzeno, entre moradores de uma cidade que possui uma grande indústria siderúrgica na área urbana. O ATTM foi extraído da urina através de cartucho contendo trocador iônico forte (SAX) e foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando coluna C18 e detecção por UV-vis com arranjo de diodos. O método foi otimizado e validado com relação à linearidade, faixa de trabalho, precisão e exatidão, que apresentou resultados entre 78% e 98%. O método apresentou os limites de detecção e de quantificação iguais a 1,0 e 3,5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectivamente. Foram determinadas as concentrações de ATTM em 193 amostras de urina coletadas em quatro sítios em duas campanhas de amostragem durante períodos de chuvas e estiagem. A concentração média de ATTM urinário encontrada foi 59,2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de creatinina. Não foi encontrada diferença estatística significativa ao nível de 95% de confiança com relação ao teor de ATTM urinário entre as duas campanhas, mas, nesse nível de confiança constatou-se diferença entre os resultados de indivíduos residentes em locais sob influência direta das emissões das coquearias e os resultados daqueles residentes em locais sem essa influência. Também foi encontrada diferença estatisticamente significativa ao nível de 95% de confiança entre os voluntários fumantes e não fumantes.

Palavras-chave: *Benzeno, exposição não ocupacional, indicador biológico de exposição, ácido trans,trans-mucônico, emissões em coquearias.*

ABSTRACT

Benzene, a confirmed human carcinogen, is a ubiquitous environmental substance. Its chronic toxic effects are mainly haematopoietic effects, like leukaemia, and DNA damages. Besides natural sources of benzene, there are many anthropogenic sources, that the principal are tobacco smoke, exhaust emissions and evaporation losses from motor vehicles, evaporation losses during the handling, distribution and storage of fuels and industrial discharge, mainly from petroleum industry and steel industry. The significant emissions of benzene in the steel industry occur during the coke production processes, in a coke oven plant, usually existing in this industry. Both petroleum industry and steel industry emissions are due to the occupational laws that establish exposure limits for its workers. Benzene's emissions in occupational areas are lawfully supervised around the world, but few countries have determined non occupational laws. Brazil hasn't benzene atmospheric emissions regulation for general places. Due to this facts, in this work was evaluated the occurrence of significant statistics difference in the *trans,trans*-muconic acid (TTMA) urinary contents, biomarker exposure from benzene, among inhabitants from a city that has a steel industry in the urban area. The TTMA was clean-up through ion-exchange (SAX) cartridge and it was determined by HPLC using a C18 column and UV-Vis detection with arrays of diodes. The method was optimized and validated about linearity range, work range, precision and accuracies, that showed results between 78% and 98%. It showed too, detection and quantification limits of 1,0 e 3,5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. Altogether, the TTMA urinary concentration was determined in 193 samples collected in four different places in two different periods, rainy and dry seasons. The mean TTMA urinary concentration was 59,2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ creatinine. No statistically significant difference at the 95% level confidence was found between TTMA urinary concentrations in both periods. A difference statistically significant at 95% confidence level was found between TTMA urinary concentrations of the one group of voluntary living in areas with direct influence from coke oven plants emission and another living in places without such influence. The difference between the TTMA urinary concentration of smokers and non-smokers was statistically significant at 95% confidence level.

Keywords: *Benzene, non-occupationally exposure, biomarker exposure trans, trans-muconic acid, coke oven plants emissions.*

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

O benzeno, substância comprovadamente carcinogênica (ATRDR, 2007), é um excelente solvente orgânico que foi amplamente difundido e utilizado principalmente durante o advento industrial ocorrido após a Segunda Guerra Mundial (Fundacentro, 1995). É uma substância onipresente na natureza, encontrado naturalmente no petróleo bruto, além de ser emitido em processos de combustão, como em queimadas de florestas e vulcões (Costa, 2001; WHO, 1993). Durante muito tempo foi comercialmente produzido como subproduto da destilação do carvão mineral nas coquerias das usinas siderúrgicas, mas essa produção vem sendo substituída pela produção nos parques petroquímicos e de refino de petróleo. Seus efeitos tóxicos crônicos envolvem principalmente alterações hematológicas, além de influenciar danos ao DNA (Hrabayashi *et al*, 2008; Buthbumrung *et al*, 2008; Chanvaivit *et al*, 2007, IARC, 1982:).

Existem diferentes fontes de emissão de benzeno além das naturais, sendo que as principais fontes da substância na atmosfera são a fumaça de cigarro, escapamentos de automóveis, processos de abastecimento em postos de combustíveis, e emissões industriais, principalmente em coquerias das indústrias siderúrgicas e nas indústrias petroquímicas (ATRSD, 2007). As emissões nas siderúrgicas são evidentes principalmente durante o processo de coqueificação que ocorre nas coquerias, normalmente presentes nessas indústrias. Elas ocorrem devido a vazamentos durante o processo de coqueificação e ainda durante a posterior manipulação do coque. As emissões dessas indústrias, assim como as das petroquímicas, são previstas por leis ocupacionais que instituem limites de exposição aos trabalhadores desses setores.

O benzeno foi um problema de saúde pública durante muitos anos. Com a descoberta de casos de intoxicação relacionados à exposição ocupacional pela substância, inúmeros pesquisadores passaram a estudar seus efeitos tóxicos, bem como quantificá-lo levando em consideração as fontes emissoras, e a avaliar a exposição humana, através da própria substância inalterada, ou de algum de seus metabólitos que funcionam como indicador biológico de exposição (IBE).

Várias legislações trabalhistas foram publicadas com o intuito de regulamentar e diminuir cada vez mais as emissões de benzeno no mundo. Mesmo reconhecendo que não há limite seguro de exposição a substâncias consideradas cancerígenas vários órgãos governamentais e entidades voltadas à saúde do trabalhador estabelecem, de acordo com a tecnologia pertinente no momento, limites máximos de exposição ao benzeno, como a OSHA (*Occupational Safety and Health Administration*), a ACGIH (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists*) e a NIOSH (*National Institute for Occupational Safety and Health*), órgãos americanos que influenciam legislações em todo mundo. No Brasil, as concentrações limites em vigor foram determinados pela criação do Anexo 13-A da NR N°15 em 20 de dezembro de 1995, que também introduz o conceito de valor de referência tecnológico (VRT). As concentrações limites determinadas, e ainda válidas, são de 2,5ppm ($8\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$) para indústrias siderúrgicas e 1ppm ($3,2\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$) para as demais indústrias e atividades.

Apesar das emissões em áreas ocupacionais estarem bem controladas legalmente em todo o mundo, poucos países legislam sobre a exposição não ocupacional ao benzeno. O Brasil não apresenta regulamentação quanto às concentrações atmosféricas fora de ambientes ocupacionais. Existem algumas pesquisas, internacionais e nacionais, que avaliam pessoas não expostas ocupacionalmente ao benzeno, mas a maioria das pesquisas existentes foram realizadas com trabalhadores de áreas de risco.

Nesta pesquisa foi avaliado o teor de ácido *trans,trans* mucônico (ATTM) urinário, indicador biológico de exposição ao benzeno, entre moradores de uma cidade que possui uma grande indústria siderúrgica em sua área urbana. O ATTM extraído da matriz urina por extração em fase sólida (EFS) e analisado por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta e visível com arranjo de diodos (CLAE/UV-vis-DAD). O método foi otimizado e validado com relação à linearidade, faixa de trabalho, limites de detecção e quantificação, exatidão e precisão. A avaliação da população se deu em duas campanhas de amostragem, período de chuvas e estiagem, totalizando 193 amostras.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo principal dessa pesquisa foi determinar os teores de ácido *trans,trans*-mucônico urinário, indicador biológico de exposição ao benzeno, em moradores sob influência de coquearias, fonte de emissão de benzeno, e verificar diferenças estatísticas nos resultados encontrados que possam ser atribuídas à localização geográfica em relação à fonte

1.1.2 Objetivos Específicos

- Otimizar e validar método analítico para determinação de ATTMM urinário utilizando EFS e análise por CLAE/UV-vis-DAD;
- Classificar a população amostrada em diferentes sítios de exposição, a fim de se tentar correlacionar possíveis variações encontradas nas concentrações de ATTMM;
- Identificar possíveis fatores interferentes nos resultados de concentração de ATTMM urinário, tais como, hábito de fumar, idade, gênero, alimentação, através da aplicação de um questionário;
- Realizar campanhas de amostragem, coletando amostras para determinação de ATTMM urinário em período de estiagem e em período chuvoso.
- Avaliar diferenças estatísticas nos resultados de concentração de ATTMM urinário.

1.2 JUSTIFICATIVA

O refino do minério de ferro em indústrias siderúrgicas, com o objetivo de transformá-lo em aço, passa por um processo de redução utilizando o coque como agente termo-redutor. O coque é produzido em um processo chamado de coqueificação nas coquearias normalmente presentes nas siderúrgicas (US-EPA, 2008).

Durante o processo de coqueificação ocorre grande emissão de poluentes atmosféricos, desde material particulado até gases e vapores orgânicos de elevada toxicidade, dentre os quais se encontra o benzeno. A emissão desses compostos, prevista por lei para essas indústrias, pode ocorrer devido a vazamentos durante o processo de

coqueificação e ainda durante o desenformamento, transporte e extinção do coque (US-EPA, 2008).

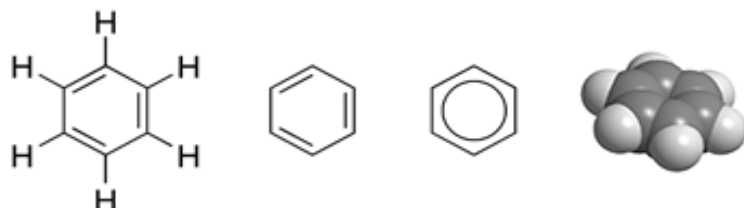
Nenhum tipo de exposição a agentes carcinogênicos como o benzeno pode ser considerado seguro. Ainda assim, a legislação brasileira estabelece como VRT para áreas de indústria siderúrgica a concentração de 2,5ppm ($8\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$) e não regulamenta sobre exposição não ocupacional. Considerando a difusão atmosférica das emissões de gases e vapores industriais, a população sob influência dessas fontes de emissão pode ficar expostas à concentração preocupante de poluentes, tais como o benzeno. Apesar disso, a maioria dos estudos existentes sobre o assunto diz respeito aos grupos expostos ocupacionalmente.

O local escolhido para a avaliação nessa pesquisa tem como peculiaridade o fato de ter se desenvolvido no entorno de uma grande indústria siderúrgica, a qual, com o passar dos anos, ficou situada no centro da comunidade. O ATTM urinário foi escolhido para a avaliação da exposição dos indivíduos ao benzeno por ser um IBE sensível a baixas concentrações atmosféricas do benzeno e ser recomendado com esse objetivo no Brasil pela Portaria 34/2001 do Ministério da Trabalho e Emprego (MTE,2001).

Neste capítulo serão relatadas as principais características do benzeno, incluindo seu potencial toxicológico, fontes de exposição e algumas legislações que dispõem sobre sua utilização e limites de exposição, principalmente ocupacionais. Também serão abordados seus indicadores biológicos de exposição, com ênfase no ATTM urinário e algumas técnicas analíticas empregadas na sua detecção.

2.1 BENZENO

O benzeno, também conhecido por benzol e pirobenzol, de nome sistemático ciclohexa-1,3,5-trieno, segundo a IUPAC, é um hidrocarboneto aromático com fórmula química C_6H_6 , como mostrado na Figura 2.1, que apresenta odor adocicado característico. Possui elevada volatilidade e leve solubilidade em água, mas é miscível com a maioria dos solventes orgânicos. A sua alta volatilidade em função de sua pressão de vapor de 95,2mmHg a 25°C e o seu relativamente baixo ponto de ebulição (80,1°C) são as principais características físico-químicas responsáveis por sua rápida evaporação para a atmosfera. É altamente inflamável, com ponto de fulgor de -11°C (CESTEB, 2009; NIOSH, 2007; ICSC, 2003; WHO, 1993). Ele foi isolado pela primeira vez em 1825, por Faraday e o início de sua produção industrial foi em 1849, como subproduto da destilação seca do carvão mineral, nas coquearias das usinas siderúrgicas (Fundacentro, 1995).



Fonte: Google Imagens (<http://img165.imageshack.us/img165/3747/benzenoko9.gif> acesso em 13/03/2009)

Figura 2.1: Diferentes formas de representação da molécula de benzeno.

É naturalmente encontrado no petróleo bruto, podendo estar presente próximo a reservatórios naturais de petróleo e gás natural. Vulcões e queimadas de florestas também são fontes naturais que contribuem para sua presença no meio ambiente (Costa, 2001, WHO, 1993). Com a evolução das informações sobre seu elevado potencial toxicológico, sua utilização industrial foi consideravelmente reduzida ao longo dos anos, mas o benzeno ainda é usado, mesmo que em pequenas concentrações, ou baixa escala, como constituinte de combustíveis e como solventes para gorduras, graxas, resinas, óleos, tintas, plásticos e borrachas. Também é utilizado como solvente em processos de extração que requerem solventes orgânicos e na síntese de alguns produtos como detergentes, explosivos e corantes (USEPA, 2000). As fontes antropogênicas são caracterizadas pelas emissões de gases de escapamento de veículos automotores, pela queima de combustíveis, pelas emissões como efluente industrial e pela fumaça de cigarros e são as principais responsáveis pela contaminação por benzeno existente no meio ambiente. Nesse contexto, o meio atmosférico é a principal matriz envolvida na contaminação ambiental por benzeno (Schettgen *et al.*, 2008; Chanvaivit *et al.*, 2007; Wiwanitkit *et al.*, 2003; Coutrim *et al.*, 2000).

Ele é um composto comprovadamente carcinogênico. Os relatos de efeitos danosos à saúde ocasionados pelo benzeno começaram a aparecer no final do século XIX, depois de uma fase de grande desenvolvimento industrial, quando seu uso foi bastante disseminado e inúmeros casos de contaminação ocupacional por benzeno passaram a ser relatados (Machado *et al.*, 2003). A exposição humana crônica pode causar sérios tipos de toxicidade hematopoiética como leucopenia, trombocitopenia, anemia, pancitopenia, aplasias na medula óssea além de influenciar danos oxidativos ao DNA, aberrações cromossômicas e polimorfismos genéticos (Hirabayashi *et al.*, 2008; Buthbumrung *et al.*, 2008; Chanvaivit *et al.*, 2007; IARC, 1987).

A obtenção do benzeno ocorreu por muitas décadas principalmente nas plantas de coque das siderúrgicas. Apenas na década de 40 sua produção a partir do petróleo passou a ser significativa (Fundacentro, 1995), tornando-se responsável por 95% da produção nacional em 2002, segundo Costa e Costa, ficando, apenas 5% dessa produção provenientes de companhias siderúrgicas. A produção nacional de benzeno em 2008 foi de 335 mil toneladas segundo dados da Secretaria de Comércio Exterior (SECEX), órgão do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior (MDIC, 2009), sendo o 5º produto químico mais exportado no país nesse ano (Portal ABIQUIM).

2.1.1 Toxicidade

De acordo com a classificação da Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC - *International Agency for Research on Cancer*), órgão internacional pertencente à Organização Mundial de Saúde (WHO – *World Health Organization*), dentre as substâncias que podem oferecer risco à saúde humana, o benzeno é classificado como Grupo 1, grupo dos carcinogênicos, o que significa que ele é considerado uma substância cancerígena ao homem. Além disso, a ATSDR (*Agency for Toxic Substances and Disease Registry*) e a US-EPA (*United States Environmental Protection Agency*) colocam o Benzeno na sexta posição em uma lista que classifica as substâncias potencialmente tóxicas aos seres humanos, após arsênio, chumbo, mercúrio, cloreto de vinila e bifenila policlorada, respectivamente em ordem decrescente de toxicidade (ATSDR, 2007).

Os primeiros relatos de efeitos indesejados provenientes da exposição ao benzeno são datados do final do século XIX, com casos de anemia em mulheres trabalhadoras expostas na Suécia e um caso de hemorragia em um homem, também exposto ocupacionalmente, na França (Machado *et al.*, 2003). Com o subsequente crescimento industrial, o registro de casos e sintomas de contaminação de trabalhadores expostos cresceu desordenadamente levando ao desenvolvimento de vários trabalhos de pesquisa na área a fim de comprovar sua toxicidade e a necessidade de controle e regulamentação de suas emissões, principalmente atmosféricas. Como os primeiros sintomas detectados foram de efeitos hematológicos como anemias, muitos estudos passaram a correlacionar vários tipos de leucemias com a exposição ocupacional a elevadas concentrações de benzeno (IARC, 1987). Snyder e Kocsis (1975) (*apud* Snyder e Hedli, 1996), realizaram pesquisas com trabalhadores de fábricas que utilizavam benzeno como solvente e constataram que eles apresentaram além de anemia, leucopenia e trombocitopenia. Esses efeitos hematológicos, que em muitos casos se apresentam associados, são caracterizados pela depressão de hemácias, leucócitos e plaquetas, respectivamente. A exposição crônica ao benzeno pode acarretar em uma depressão sanguínea conjunta dessas células, o que resulta no quadro chamado de pancitopenia, que usualmente está associado a casos irreversíveis de aplasia de medula óssea (USEPA, 2002; IARC, 1987). Estudos mais recentes, como os relatados por Kirkeleit *et al.* (2008) e Ray *et al.* (2007), continuam comprovando que o benzeno pode causar problemas hematológicos, principalmente em pessoas expostas, como as que trabalham na extração de petróleo, ou

residentes de grandes centros urbanos, que apresentam maior probabilidade de desenvolver neoplasmas hematológicos, como leucemia mielogênica e mieloma múltiplo. Wan e Winn (2008) apontam em estudos realizados com ratos, que a exposição de fêmeas ao benzeno durante o período gestacional pode levar a filhotes com fatores que elevam a suscetibilidade ao desenvolvimento de leucemias.

O benzeno também pode causar danos oxidativos ao DNA e polimorfismos genéticos, principalmente quando associado a outros poluentes atmosféricos. Estudos realizados comparando a presença de tais danos entre crianças que residem em zonas urbanas com crianças residentes em zonas rurais mostram que as residentes em zonas urbanas, que sofrem maior exposição ao benzeno, principalmente de origem automotiva, e a outros poluentes ambientais, apresentaram mais casos de danos oxidativos ao DNA que as residentes em zonas rurais (Buthbumrung *et al.*, 2008). Chanvaivit *et al.* (2007) encontraram que trabalhadores expostos ocupacionalmente apresentam uma diminuição na capacidade de reparo das fitas de DNA, o que pode elevar o risco de efeitos genotóxicos como crescimento celular irregular e a casos de câncer.

Os efeitos tóxicos do benzeno são decorrentes de alguns de seus metabólitos, produzidos durante sua biotransformação (Snyder e Hedli, 1996; Snyder *et al.*, 1993). Existem vários estudos que tentam elucidar todas as vias metabólicas envolvidas com essas substâncias e correlacionar às concentrações de metabólitos como muconaldeído e benzoquinonas com fatores que desencadeiam seus efeitos tóxicos (Rivedal e Leithe, 2008; Singh e Winn, 2008).

No Brasil, o quadro causado pela exposição ao benzeno é chamado de benzenismo. Segundo documento do Ministério da Saúde sobre vigilância de risco químico (MS, 2006), benzenismo é um conjunto de sinais, sintomas e complicações, causadas pela exposição aguda ou crônica ao benzeno. As complicações podem ser agudas, quando de exposição a altas concentrações com presença de sinais e sintomas neurológicos, ou crônicas, com sinais e sintomas clínicos diversos, podendo ocorrer complicações a médio ou a longo prazos, localizadas principalmente no sistema hematopoético. Assim que os inúmeros casos de benzenismo começaram a ser relatados e comprovados por pesquisas científicas, uma série de medidas começou a ser tomada em todo o mundo para controlar as emissões do benzeno. Os primeiros passos abordados dizem respeito ao estabelecimento de limites de emissões para os diferentes ramos industriais que apresentam liberação de benzeno, através dos chamados limites de exposição ocupacionais, por meio da criação de legislações específicas. Porém, as legislações existentes são essencialmente referentes a

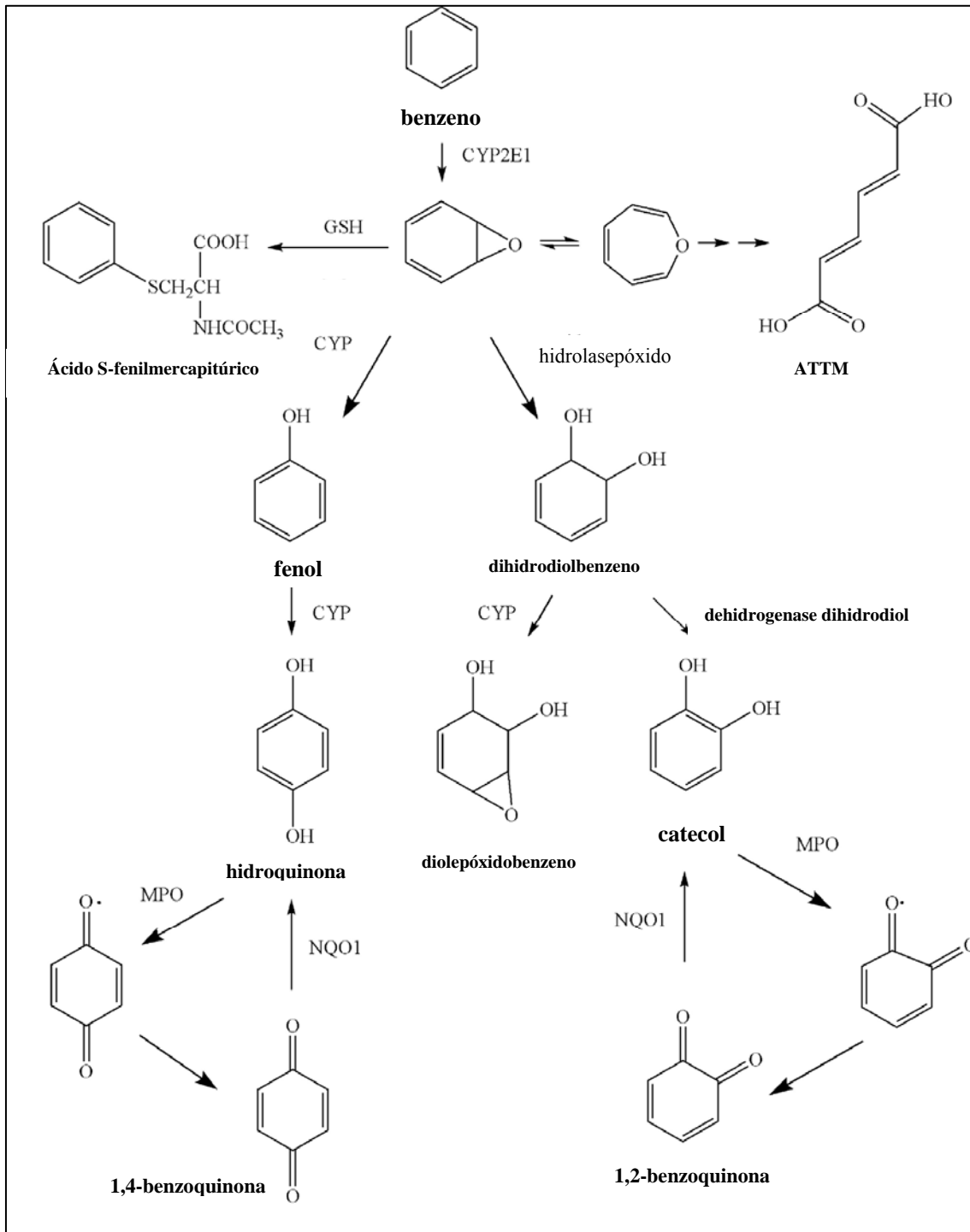
limites de exposição ocupacional. Poucas são as referências e legislações no mundo que tratam da exposição não-ocupacional ao benzeno.

2.1.2 Biotransformação

As pesquisas iniciais tentando elucidar o metabolismo do benzeno começaram ainda no século XIX, porém, só foi possível se obter respostas seguras após a síntese de moléculas de benzeno com ^{14}C . Parke e Williams (1953) *apud* Snyder e Hedli (1996), utilizaram-se desse artifício. Após administrarem [^{14}C]benzeno a coelhos, eles conseguiram identificar 32,6% da concentração inicial na forma de metabólitos urinários, 44,5% na forma de benzeno inalterado no ar expirado e cerca de 5 a 10% nas fezes e em tecidos corporais.

O benzeno é rapidamente absorvido pelas vias oral e respiratória. Também é absorvido pela pele, mas devido a sua elevada volatilidade essa absorção é menos significativa. Estudos realizados com animais mostram que a absorção do benzeno oralmente ingerido é de quase 100%. Porém, devido a sua baixa solubilidade em água e também a sua volatilidade, é raro encontrar casos de intoxicação por benzeno devido a sua ingestão. A principal via de contaminação é a respiratória, por inalação do vapores atmosféricos. Cerca de 50% do benzeno inalado é absorvido e sofre biodistribuição e biotransformação no organismo humano. Ele tende a sofrer bioacumulação no tecido adiposo, além de atravessar a barreira placentária (USEPA, 2002; WHO, 1993). Seu metabolismo ocorre primariamente no fígado, mas também ocorre, em menor extensão, em tecidos alvos como a medula óssea (WHO, 1993). As principais vias metabólicas do benzeno estão expostas na Figura 2.2. O benzeno é oxidado via citocromo P-450 (CYP2E1) a benzeno epóxido, um intermediário muito reativo. Este intermediário é metabolizado por diferentes vias, gerando vários metabólitos como fenol, catecol, hidroquinona, benzoquinonas, ácidos mercaptúricos, ácido *trans,trans*-mucônico, que são eliminados pela urina (Johnson *et al.*, 2007; USEPA, 2002; Snyder e Hedli, 1996; WHO, 1993). São alguns desses metabólitos os responsáveis pela potencial toxicidade do benzeno. A excreção do benzeno não metabolizado acontece, principalmente, através do ar expirado, mas ele também pode ser encontrado desta forma, em menores concentrações, no sangue e na urina. Já seus metabólitos são eliminados principalmente via trato urinário,

sendo que baixíssimas concentrações destes podem ser encontradas nas fezes (WHO, 1993).



Fonte: Johnson *et al.*, 2007.

Figura 2.2 - Principais Vias Metabólicas do Benzeno. Legenda: CYP, citocromo P450; GSH, glutatona; MPO, mieloperoxidase; NQO1: quinona oxidorreductase).

2.1.3 Principais Fontes de Emissão de Benzeno

O benzeno é naturalmente encontrado no meio ambiente. Ele está presente no petróleo em concentrações que podem variar de 1 a 5%, e é produzido em larga escala nos parques petroquímicos. É utilizado industrialmente em processos de sínteses químicas. Também é produzido durante o processo de coqueificação nos parques metalúrgicos. Durante esses processos industriais inevitavelmente ocorrem emissões de gases e vapores dessa substância. Além dos processos industriais, ele também é liberado por processos de combustão, que podem ser naturais ou artificiais, como as que ocorrem em motores de ignição. (WHO, 2000). Assim, processos que envolvem manipulação de petróleo, coque e combustíveis são grandes fontes emissoras de benzeno. Considerando-se o elevado número de veículos automotores existentes, a queima de combustíveis e processos de abastecimento são fontes de emissão bastante significativas.

A exposição humana ao benzeno ocorre principalmente pela atmosfera e a contaminação ocorre por inalação de seus gases e vapores. Essa exposição, proveniente de diversas fontes, poder ser ocupacional ou não-ocupacional. Regiões próximas a parques metalúrgicos, refinarias de petróleo e grandes centros industriais, principalmente grandes cidades com elevado tráfego automotivo são áreas propensas a contaminação ambiental por benzeno. Por estar presente na fumaça de cigarros, o risco de intoxicação a fumantes e fumantes passivos é superior. Essa exposição envolve a população em geral, e não apenas trabalhadores diretamente expostos em atividades de risco (Lee *et al.*, 1993; IARC, 1982).

A exposição de trabalhadores ao benzeno em suas atividades diárias é chamada exposição ocupacional. Estas atividades variam do processo de síntese do benzeno às atividades que possam liberar gases e vapores como emissões fugitivas. Estes trabalhadores envolvem, por exemplo, frentistas de postos de combustíveis e motoristas de caminhões tanque que em suas atividades manipulam combustíveis, pessoas empregadas em parques metalúrgicos que possuem coquearias, sujeitas às emissões liberadas em todo processo de coqueificação e também trabalhadores de refinarias de petróleo. Outros grupos de trabalhadores que são alvos de pesquisas quanto à exposição ao benzeno são policiais de trânsito, motoristas de taxi e vendedores ambulantes, que passam várias horas por dia expostos a fumaça de escapamentos automotivos. (Manini, *et al.*, 2008; Kirkeleit *et al.*, 2008; Chanvaivit *et al.*, 2007; Manini, *et al.*, 2006, Carrieri, *et al.*, 2006).

O refino do minério de ferro a aço que ocorre nas indústrias siderúrgicas passa por um processo de redução utilizando o coque como agente termo-redutor. O coque é produzido no processo chamado coqueificação que ocorre nas coquearias normalmente presentes nas siderúrgicas. Por esse processo, diversos tipos de carvão mineral são aquecidos em atmosfera isenta de oxigênio, até a remoção da maioria dos seus componentes voláteis, resultando no coque que consiste de uma massa composta principalmente por carbono (USEPA, 2008).

Durante o processo de coqueificação ocorre grande emissão de poluentes atmosféricos, desde material particulado a gases e vapores orgânicos de elevada toxicidade. Dentre estes compostos perigosos estão compostos orgânicos voláteis (COVs), como benzeno, tolueno e xilenos, naftaleno, fenol e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs). A emissão desses compostos pode ocorrer devido a vazamentos durante o processo e ainda durante o desenformamento, transporte e extinção do coque. O material particulado é formado principalmente por compostos orgânicos solúveis em benzeno e também incluem COVs (USEPA, 2008).

Assim, além da produção de benzeno destinada a fins comerciais, as plantas de coque são grandes fontes de emissão de benzeno atmosférico, sendo, portanto, perigosas fontes de contaminação ambiental, gerando grandes riscos de contaminação ocupacional, e também de contaminação não-ocupacional, devido à difusão atmosférica de poluentes.

A exposição não ocupacional ao benzeno ocorre com pessoas que não trabalham diretamente com atividades de risco, mas, mesmo assim, podem estar expostas ao benzeno devido à sua difusão na atmosfera. Essas pessoas englobam principalmente moradores de grandes centros urbanos e moradores de regiões próximas a siderurgias, parques petroquímicos e até mesmo postos de combustíveis. Além desses fatores, o hábito de fumar é uma condição que também eleva a possibilidade de contaminação da população em geral (Menezes *et al.*, 2008; Wiwanitkit *et al.*, 2005). Estudos comprovam que a excreção de metabólitos do benzeno é consideravelmente maior em fumantes quando comparados com não fumantes. Estudo realizado por Wiwanitkit *et al.* (2005) encontrou concentrações nove vezes maiores de ATTm na urina de fumantes em relação aos não fumantes.

Há uma grande preocupação com a população exposta não-ocupacionalmente ao benzeno, mas, paradoxalmente, ainda são poucos os estudos existentes abrangendo esse grupo de pessoas. A questão da exposição ao benzeno é bem conhecida e documentada e há um grande número de pesquisas sobre o assunto, mas a maioria envolvendo indivíduos

expostos ocupacionalmente. Porém, como o benzeno é uma substância cancerígena, nenhum tipo de exposição pode ser considerado seguro, e, sendo sua difusão atmosférica elevada, qualquer pessoa passa a ser passível de exposição e, portanto, de intoxicação.

2.2 LEGISLAÇÃO DO BENZENO

Desde a comprovação dos efeitos tóxicos do benzeno e, principalmente de seu potencial carcinogênico, em todo mundo há uma preocupação intensa para reduzir suas emissões. As legislações existentes são próprias de cada país, mas alguns adotam como referência os limites estabelecidos por órgãos americanos. Cada país, dentro de suas características particulares relacionadas às necessidades e possibilidade, principalmente tecnológicas, estabeleceu limites de emissões e prazos para uma adequação à nova realidade. Ao longo dos anos, através de novos estudos e do surgimento de novas tecnologias, as legislações também sofreram várias mudanças com o intuito de reduzir ainda mais os limites de exposição, e portanto os limites de emissões de benzeno, e, em consequência, os riscos implícitos nas atividades que envolvem sua emissão.

2.2.1 Legislação para Exposição Ocupacional ao Benzeno

Com a confirmação do crescente número de casos de intoxicação crônica pelo benzeno, surgiu a preocupação em se estabelecer limites de exposição considerados seguros aos trabalhadores expostos a atividades de risco de contaminação por benzeno. Em 1946, a ACGIH (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists*) recomendou um limite de exposição de 100ppm (325mg.m^{-3}), sendo esse valor a concentração máxima de benzeno permitido no ar. No ano seguinte esse valor foi reduzido para 50ppm (162.5mg.m^{-3}) (ACGIH, 2001, *apud* Capleton e Levy, 2005). Com a evolução dos estudos sobre esse assunto, surgiu o conceito de TLV-TWA (*Threshold Limit Value – Time Weighted Average*), que se refere à concentração média ponderada pelo tempo para uma jornada normal de 8 horas diárias e 40 horas semanais, à qual a maioria dos trabalhadores pode estar repetidamente exposta, dia após dia, sem sofrer efeitos adversos à saúde (Portal Cetesb). A partir desse conceito as concentrações de limites de exposição ao benzeno caíram ainda mais e o valor foi reduzido gradativamente para 35ppm (114mg.m^{-3})

em 1948, 25ppm (82mg.m^{-3}) em 1957, 25ppm como valor teto (concentração que não pode ser excedida em nenhum momento da jornada de trabalho) em 1963 e 10ppm ($32,5\text{mg.m}^{-3}$) em 1974 (NIOSH, 1974; Bartolucci *et al.*, 1995 e Mastrangelo, 1995, *apud* Coutrim *et al.*, 2000).

Em 1976, o NIOSH (*National Institute for Occupational Safety and Health*) (NIOSH, 1976) passou a considerar o benzeno como substância cancerígena ao homem. Desta forma, não era possível determinar uma concentração de exposição que fosse considerada segura, e esse órgão passa a recomendar que a exposição fosse à menor concentração possível. Assim, surgiram diversas restrições ao uso de benzeno e a necessidade de se encontrar substitutos que não fossem tóxicos, mas que apresentassem a mesma eficiência. Nesse documento o NIOSH passa a recomendar um nível não superior a 1ppm ($3,3\text{mg.m}^{-3}$) como concentração de exposição ocupacional.

O surgimento do conceito do limite de exposição ocupacional (*Occupational Exposition Limit*, OEL) foi um importante caminho para se reduzir a exposição de trabalhadores a substâncias perigosas e promover a prevenção contra doenças ocupacionais. Esse conceito é admitido em todo mundo, mas alguns países adotam diferentes nomenclaturas. A nomenclatura mais utilizada por vários países é a adotada pela ACGIH, ou seja, TLV-TWA. A ACGIH também adota o conceito STEL (*Short-term Exposure Limit*) que é a concentração máxima permitida para a exposição em um curto intervalo de tempo (normalmente 15 minutos). Na Alemanha a nomenclatura adotada é *Maximale Arbeitsplatz Konzentration* (MAK) e na Rússia e Polônia é a *Maximum Allowable Concentrations* (MAC) (Mikheev, 1995).

Atualmente, vários órgãos governamentais norte americanos apresentam documentos e referências sobre limites de exposição ocupacional ao benzeno. O NIOSH em seu *Pocket Guide to Chemical Hazards* (NIOSH, 2007), recomenda como limite de exposição concentrações de 0,1ppm ($0,33\text{mg.m}^{-3}$ / TLV-TWA) e 1ppm (STEL). O OSHA (*Occupational Safety and Health Administration*), na Norma 1910.1028 (Portal OSHA, 2009), que dispõe sobre o benzeno, determina como limites de exposição admissíveis 1ppm (TLV-TWA) e 5ppm ($16,5\text{mg.m}^{-3}$ / STEL). Já o ACGIH recomenda como limites 0,5ppm (TLV-TWA) e 2,5ppm (STEL) (ROC, 2005). Também existem normas que regulamentam sobre concentrações máximas de benzeno na água e em produtos acabados, elaboradas por órgãos como a FDA (*Food and Drug Administration*) e CPSC (*Consumer Product Safety Commission*) (ROC, 2005).

Muitos países desenvolveram legislação própria baseada em dados nacionais e em estudos internacionais, mas alguns utilizam como limites os valores estabelecidos por agências norte americanas como a ACGIH (NIOSH, 2009). No Brasil, as primeiras publicações de trabalhos científicos nacionais relacionados aos danos causados pela exposição ao benzeno datam da década de 1940, mas apenas anos depois, em 1978, com a publicação da Portaria N° 3.214/MT (MTE, 1978) é que a preocupação com a exposição de trabalhadores ao benzeno passou a ter maior respeito e qualidade (FUNDACENTRO, 1995). Essa portaria, aprova as Normas Regulamentadoras sobre a consolidação das leis do trabalho, relativas a segurança e medicina do trabalho (MTE, 1978).

Porém, a preocupação em relação à exposição ao benzeno passou a ter maior significância no Brasil com as constantes manifestações de órgãos de cunho social, como os movimentos sindicais, principalmente com os movimentos relativos à área metalúrgica (FUNDACENTRO, 2005). Esses movimentos passaram a denunciar casos de epidemias por contaminação crônica ao benzeno, em diversos setores produtivos. As denúncias tiveram repercussão nacional, e novos casos passaram a ser descobertos. Mais de 3000 trabalhadores foram afastados com diagnóstico de benzenismo (MS, 2003; FUNDACENTRO, 2005). Com a repercussão gerada por todos esses casos, a década de 80 foi marcada por evolução de pensamento e cobrança por mudanças. Nesse âmbito, vários eventos aconteceram com intuito de estudar, conhecer, informar e legislar sobre o assunto. Temas relacionados à saúde do trabalhador passaram a ser abordados em simpósios e conferências, muitos deles específicos sobre o benzeno.

Em 1995, a partir de um grupo de trabalho tripartite, que contava com representantes do governo, dos trabalhadores e dos empregadores dos setores envolvendo atividades com benzeno, foi elaborada a Portaria N° 14 de 20/12/1995 do Ministério do Trabalho (MTE, 1995), que foi a responsável pela criação do Anexo 13-A da Norma Regulamentadora N°15 (NR15), que dispõe exclusivamente sobre o benzeno, considerando-o como agente carcinogênico. Além da criação desse anexo, ela regulamenta ações, atribuições e procedimentos de prevenção da exposição ocupacional ao benzeno e estabelece prazo limite para proibição de uso do benzeno em alguns setores industriais.

É essa portaria que introduz o conceito de valor de referência tecnológico (VRT), que segundo a mesma, é a concentração de benzeno no ar considerada exequível do ponto de vista técnico. Seu cumprimento é obrigatório e não exclui risco à saúde. Este novo parâmetro, utilizado para avaliação da concentração ambiental, deriva-se do limite adotado na Alemanha para substâncias carcinogênicas e mutagênicas - TRK (*Technische*

Richtkonzentrationen), que considera não existir um valor limite seguro para exposição a estas substâncias (Costa, 2001; MTE, 2001). Ela também introduz o conceito VRT-MPT (Valor de Referência Tecnológico – Média Ponderada no Tempo), que corresponde à concentração média de benzeno no ar ponderada pelo tempo, para uma jornada de trabalho de 8 horas diárias. Os valores estabelecidos para o VRT-MPT foram, e ainda são, de 2,5ppm ($7,98\text{mg.m}^{-3}$) para as empresas siderúrgicas e 1,0ppm ($3,19\text{mg.m}^{-3}$) para as demais indústrias, inclusive petroquímicas.

Em 2001, o Ministério do Trabalho e Emprego publicou a Portaria nº 34/MTE (MTE, 2001) regulamentando o uso de indicadores biológicos de exposição ao benzeno. No anexo dessa portaria o ATTM urinário é o IBE indicado para ser utilizado nas avaliações da exposição ao benzeno devido a sua determinação analítica ser mais fácil em relação aos demais IBEs.

2.2.2 Legislação para Exposição Não-Ocupacional ao Benzeno

A pesar da legislação ocupacional sobre o benzeno ser mundialmente bem definida, são poucos os países que determinam limites de exposição não-ocupacional. Porém, sendo o benzeno comprovadamente um potencial carcinogênico, várias propostas por parte de entidades e organizações científicas internacionais vêm surgindo no sentido de atribuir limites ambientais (não-ocupacionais) de exposição.

No Reino Unido, o Painel de Especialidade sobre Qualidade do Ar (EPAQS - *Expert Panel on Air Quality Standards* (EPAQS, 1994) recomenda como valor limite em ambientes fechados, a concentração de 5ppb ($16,2\mu\text{g.m}^{-3}$) e que no futuro este valor deva ser reduzido para 1ppb ($3,2\mu\text{g.m}^{-3}$). A Organização Mundial de Saúde propôs uma redução progressiva, das emissões de benzeno, a partir de 2003, de modo que no ar ambiente, o valor limite de 3ppb ($9,6\mu\text{g.m}^{-3}$) seja alcançado até o ano de 2010 (ENDS *Report*, 1998 apud Costa, 2001). O Parlamento Europeu e o Conselho da União Européia determinaram em 2008 limites ambientais de benzeno de $5\mu\text{g.m}^{-3}$, com decréscimos gradativos para alcançar concentração de $1\mu\text{g.m}^{-3}$ em 2010 (European Parliament, 2008). No Brasil ainda não existe legislação sobre emissões não-ocupacionais de benzeno.

2.3 INDICADORES BIOLÓGICOS DE EXPOSIÇÃO AO BENZENO

Existem vários métodos para se avaliar a intoxicação humana por benzeno. Eles podem medir as concentrações do próprio benzeno, em sua forma inalterada, no ar exalado, no sangue ou na urina, ou podem avaliar as concentrações, normalmente urinárias, de seus metabólitos. Neste caso dizemos que está sendo utilizado um indicador biológico de exposição (IBE) ao benzeno.

Um IBE é uma substância ou agente químico, ou mesmo algum efeito biológico não tóxico, que em fluido biológico apresenta relação com a exposição ambiental a determinado agente tóxico. No caso do benzeno, são utilizados produtos da sua biotransformação, ou seja, alguns de seus metabólitos (MTE, 2001).

Durante muito tempo o fenol urinário foi utilizado como IBE ao benzeno. Porém, com os constantes esforços para reduzir as emissões de benzeno, principalmente por adequação às legislações ocupacionais, foi necessário desenvolver novas metodologias para escolha de IBEs mais específicos e principalmente mais sensíveis às baixas concentrações de benzeno (Ducos *et al.*, 1990; Rupert *et al.*, 1997; Coutrim *et al.*, 2000; Costa, 2001; Paula *et al.*, 2003; Carrieri *et al.*, 2006). Um IBE é específico quando é produzido exclusivamente pelo composto ao qual está sendo relacionado, e é sensível quando é possível ser detectado na matriz analisada mesmo a baixas concentrações de exposição ambiental. A Tabela 1 mostra alguns possíveis IBEs ao benzeno, destacando a sensibilidade e especificidade de cada um.

Além da especificidade e da sensibilidade, existem outros fatores importantes e determinantes ao se decidir por um IBE. A forma de coleta da amostra deve ser levada em consideração. Amostras invasivas, como as coletas de sangue são de difícil aceitação da população. Outro fator é a sofisticação da metodologia empregada nas análises das amostras. Alguns IBE requerem metodologias que empregam equipamentos de elevada tecnologia o que pode tornar os custos também muito elevados (WHO, 1996, Costa, 2001).

Considerando esses fatores, o ácido *trans, trans*-mucônico, tem sido bastante estudado e indicado como IBE ao benzeno, apesar de não ser considerado um metabólito específico do benzeno.

Tabela 2.1 - Indicadores Biológicos de Exposição ao Benzeno (IBE-Bz)

IBE-Bz	Matriz Biológica	Sensibilidade	Especificidade
Benzeno	Ar exalado	S	S
	Sangue	S	S
	Urina	S	S
Fenol	Urina	N	N
Ácido <i>trans, trans</i> -mucônico	Urina	S	N
Ácido S-fenilmercaptúrico	Urina	S	S
Catecol e Quinol	Urina	N	N
Benzenotriol	Urina	N	S*
N-Acetilcisteína e Tiofenol	Urina	N	N
Hidroquinona	Urina	N	N
N-7 Fenilguanina	Urina	N	S*
Hemoglobina, Albumina adutos e N-Fenilvalina adutos	Sangue	N	S*
Aberrações cromossomais em linfócitos	Sangue	N	N

S= SIM N= NÃO S* = específico da via de danos.

FONTE: WHO, 1996; Costa, 2001

2.3.1 Ácido *trans, trans*-mucônico

O ácido *trans, trans*-mucônico é um metabólito do benzeno produzido a partir de uma via secundária do seu metabolismo. Segundo Inoue *et al.* (1989) (*apoud* WHO, 1996), apenas cerca de 1,9% do benzeno inicial é recuperado como ATTM urinário. Além do benzeno, ele também é metabólito do ácido sórbico, um conhecido conservante bastante utilizado na indústria alimentícia. Apesar disso, sua sensibilidade não é suficientemente afetada (Costa, 2001; Ducos, 1990) e seu uso é confiavelmente indicado e bastante utilizado como IBE ao benzeno, mesmo que em baixas concentrações. Alguns autores questionam sua utilização em grupos não expostos ocupacionalmente, devido a elevados valores basais de ATTM urinário associados à ingestão de ácido sórbico (Weaver *et al.*, 2000; Negri *et al.*, 2005), mas tenta-se eliminar possíveis interferentes com avaliação

detalhada do tipo de alimentos ingeridos e tempo da última alimentação das pessoas que terão a urina analisada.

Vários autores desenvolveram diferentes metodologias de detecção para o ATTM urinário ao longo dos últimos anos e suas técnicas vêm sendo aprimoradas por novos estudos. A tabela 2.1 mostra alguns exemplos de métodos utilizados na sua determinação. Entre esses métodos estão descritas várias técnicas cromatográficas e a mais utilizada é a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção espectrofotométrica na região do ultravioleta (CLAE-UV).

Ducos *et al.* (1990) foi o primeiro autor a propor um processo de extração do ATTM das amostras de urina antes da injeção no cromatógrafo para ser analisada por CLAE-UV. Seu método foi aprimorado com o tempo, mas ainda continua bastante atual. Muitos trabalhos recentes ainda o utilizam como referência com ou sem modificações, conforme exposto na Tabela 2.2.

Dentre as pesquisas existentes utilizando ATTM urinário para se avaliar a exposição ao benzeno, a grande maioria avalia pessoas ocupacionalmente expostas. Porém, considerando que o quadro da exposição ocupacional ao benzeno está mundialmente sob controle, principalmente devido às legislações trabalhistas serem bem definidas, passa-se a criar um novo contexto de preocupação, focando a população em geral, ou não-ocupacionalmente exposta. Schroijsen *et al.* (2008) realizaram um estudo com adolescentes da região de Flandres na Bélgica com objetivo de avaliar a exposição a vários poluentes atmosféricos e tentar relacioná-la com alguns fatores pessoais, entre eles a área de residência. Foram avaliados quase 1700 adolescentes de nove microrregiões diferentes, considerando, por exemplo, área urbana e rural. Entre os poluentes alvos estava o benzeno, avaliado através do ATTM urinário. A concentração média de ATTM encontrada foi de $72\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de creatinina, e não foi possível observar diferenças entre as microrregiões analisadas. Já Buthumrung *et al.* (2008) encontraram valores médios de ATTM urinário significativamente maiores em crianças da área urbana de Bangkok, Tailândia ($120\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de creatinina), quando comparado com crianças da área rural ($60\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de creatinina).

Tabela 2.2: Diferentes Métodos de Determinação do ATTM com ênfase nas de CLAE

Técnica Analítica	Extração ATTM Urina	Coluna (dimensões e diâmetro partícula)	Fase Móvel	Vazão	Temperatura (°C)	Deteção	LD (µg.L ⁻¹)	Referência
CLAE	EFS com SAX ^(a)	C18 (250 X 4,6 mm) 5 µm	HAc 1% (v/v) / metanol 90:10 (v/v)	1ml/min	NR	UV (λ= 259 nm)	50	Ducos <i>et al.</i> (1990)
CLAE	EFS com resina Dowex ^(b)	C18 (110 X 4,7)	HAc/metanol/NaAc (1:10:89, v/v)	1ml/min	AMBIENTE	UV (λ= 265 nm)	25	Lee <i>et al.</i> (1993)
CLAE	EFS com SAX ^(c)	NR	Ac. fórmico/THF/água (14:17:969 v/v/v)	1ml/min	NR	UV (λ= 263 nm)	1,9	Buratti <i>et al.</i> (1996)
CG	EFS com SAX	-	-	-	-	MS	10	Ruppert <i>et al.</i> (1995, 1997)
CLAE Bidimensional	Não Realizada	-	-	-	-	UV (λ= 262 nm)	4	Serena <i>et al.</i> 2000
CLAE	EFS com SAX ^(a)	C18 (250 X 4,6mm) 5µm	HAc/ MeOH/NaAc 1mol/L/H2O (4,5:100:1,8:893,7 v/v)	NR	40	UV- arranjo diodos	16	Weaver <i>et al.</i> (2000)
CL-CL	Não Realizada	-	-	-	-	UV (λ= 264 nm)	20	Marrubini <i>et al.</i> 2001
CLAE	EFS com SAX ^(a)	NR	NR	NR	NR	UV (λ=264nm)	25	Senzolo <i>et al.</i> (2001)
CLAE	Segundo Ducos <i>et al.</i> (1990)	C18 (250 X 4,6mm) 3 µm	Água/Metanol/HAc (93.5:5.5:1 V/V)	0,7ml/min	NR	UV (λ=259nm)	NR	Marrubini <i>et al.</i> (2002)
CLAE	Segundo Ducos <i>et al.</i> (1990) modificado	C18 (250 X 4,6 mm)	HAc 1%/Metanol (95:5 v/v)	1ml/min	40	UV (λ= 259 nm)	10	Violante <i>et al.</i> (2003)
CLAE	EFS com SAX ^(a)	C18 (150 X 4,6 mm) 5 µm	HAc 1%/Metanol (95:5 v/v)	0,6ml/min	25	UV (λ= 263 nm)	10	Cocco <i>et al.</i> (2003)
CLAE	EFS com SAX ^(a)	C18 (250 X 4,2mm) 5µm	MeOH/HAc 1% (10:90 v/v)	1ml/min	40	UV (λ= 264 nm)	6	Paula <i>et al.</i> (2003)
CLAE	EFS com SAX ^(d)	C18 (250 X 4,2mm) 5µm	HAc/NaAc 1mol/L/MeOH/Água (4,5:1,8:100:893,7 v/v)	1,5ml/min	NR	UV (λ=265nm)	NR	Kouniali <i>et al.</i> (2003)
CG	EFS com SAX	-	-	-	-	MS	NR	Sorensen <i>et al.</i> 2003
CLAE/ESI	EFS com SAX	-	-	-	-	MS	6	Barbieri <i>et al.</i> 2004
CG	EFL com acetato de etila	-	-	-	-	MS	5	Waidyanatha <i>et al.</i> 2004
LC-ESI-MS	EFS com SAX	-	-	-	-	MS	1	Manini <i>et al.</i> 2004
CLAE	EFS com SAX	-	-	-	-	UV	10	Fustinoni <i>et al.</i> 2005
CLAE	EFS com resina troca iônica ^(e)	NR	HAc/MeOH/NaAc 5mmol/L/Água (10:100:??) (para 1000mL)	1,2ml/min	NR	NR	25	Wiwanitkit <i>et al.</i> (2005)
CLAE	EFS com resina Oasis MAX	C18 (150 X 4,6 mm) 5 µm	A / B 90:10 v/v	1ml/min	30	UV (λ=263nm)	5	Lee <i>et al.</i> (2005)
CLAE	EFS com SAX ^(a)	C18	HAc aquoso/metanol (90:10 v/v)	1,2ml/min	20	UV (λ= 262 nm)	NR	Navasumrit <i>et al.</i> (2005)
CLAE	EFS com SAX	NR	NR	NR	NR	UV (λ= 264 nm)	10	Carriero <i>et al.</i> (2006)
CG	EFL com acetato de etila	-	-	-	-	MS	5,66 nmol.L ⁻¹	Kim <i>et al.</i> 2006
CL	Não Realizada	-	-	-	-	MS	2,5	Manini <i>et al.</i> 2006
CLAE	Segundo Ducos <i>et al.</i> (1990)	RP18	Segundo Ducos <i>et al.</i> , 1990	NR	NR	UV (λ= 265 nm)	NR	Roma-Torres <i>et al.</i> (2006)
CG	NR	-	-	-	-	MS	3	Scherer <i>et al.</i> 2007
CLAE	EFS com SAX ^(a)	C18, 5µM	Metanol/HAc 1% (10:90 V/V)	1,2ml/min	NR	UV (λ= 259 nm)	NR	Ray <i>et al.</i> (2007)
CLAE	EFS com SAX ^(a)	C18 (250 X 4,6 mm) 5 µm	Metanol/HAc 1% (10:90 V/V)	1ml/min	NR	UV (λ= 264 nm)	20	Chakroun <i>et al.</i> (2008)
CL-MS	Não Realizada	-	-	-	-	MS	2,5	Manini <i>et al.</i> 2008
CLAE	EFS com SAX	-	-	-	-	UV	NR	Buthbunrung <i>et al.</i> 2008
CLAE	Segundo Ducos <i>et al.</i> (1990)	C18 (150 X 4,6mm) 5 µm	Metanol/HAc 1% (10:90 V/V)	NR	NR	UV (λ= 264 nm)	NR	Menezes <i>et al.</i> (2008)
CLAE	EFS com SAX	NR	Gradiente MeOH/HAc 1%	NR	NR	UV	8,6	Schroijen <i>et al.</i> (2008)

CLAE= cromatografia líquida de alta eficiência CG= cromatografia gasosa CL= cromatografia líquida

EFS= Extração em Fase Sólida EFL= Extração em Fase Líquida NR= NÃO RELATADO SAX= Resina Fortemente Trocadora de ânions ESI=Eleto spray

MS= massas UV= ultra-violeta λ= comprimento de onda FID= detector de ionização em chama

NR= nao relatado THF= tetrahidrofuran MeOH= metanol

(a)= Lavagem: ácido acético (HAc) 1% Eluição: ácido acético 10%

(b)= Lavagem: H3PO4 0,2mmol/L + Acetato de Sódio (NaAc) 0,1mol/L + água Eluição: NaCl 1,5mol/L + metanol (1:1)

(c)= Lavagem: Água + NaCl 0,1mol/L Eluição: H2SO4 0,5mol/L

(d)= Lavagem: HAc 1% + Água + Acetonitrila Eluição: HAc 10%

(e)= Lavagem: solução H3PO4 + Tampão fosfato + Água Eluição: NaCl 1,5mol/L + Metanol (1:1 v/v)

A=MeOH/Ácido ortofosforico 150mM/L (9:91 v/v) B= Acetonitrila/Ácido ortofosforico 125mM/L (30:70 v/v)

Ruchirawat *et al.*, (2007) também realizaram estudos na cidade de Bangkok. Eles avaliaram crianças de escolas da zona urbana e rural e vendedores ambulantes expostos às emissões veiculares, e encontraram elevação dos níveis de ATTm urinário nos vendedores ambulantes quando comparados resultados de amostras coletadas pela manhã, antes da exposição diária a poluentes, com amostras coletadas no final do dia. Eles também encontraram elevação considerável nos níveis do metabólito em crianças da área urbana ($270\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de creatinina) comparados com crianças de áreas rurais ($80\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de creatinina).

Cocco *et al.* (2003) avaliaram valores de ATTm urinário entre adultos não expostos ocupacionalmente. Eles encontraram um aumento significativo na concentração de ATTm urinário de fumantes ($37,6\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de creatinina) comparado com não fumantes ($15,6\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de creatinina), como também em mulheres ($25,4\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de creatinina) comparada aos homens ($9,2\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de creatinina) sob as mesmas condições.

Considerando a gravidade dos efeitos da exposição ao benzeno e considerando a existência de diferenças significativas nas concentrações de ATTm urinário entre grupos não expostos ocupacionalmente, constata-se a necessidade de avaliar a exposição ao benzeno da população em geral, principalmente grupos que podem ter algum fator de risco agravante, como a exposição a poluentes industriais específicos.

3.1 METODOLOGIA

Os procedimentos metodológicos utilizados e relatados a seguir estão dispostos de acordo com a seguinte estrutura: (1) submissão do projeto ao Comitê de Ética em Pesquisa, (2) amostragem, (3) otimização do método, (4) validação do método otimizado e (5) análises das amostras.

Para o desenvolvimento do tema proposto foi realizado um estudo experimental com enfoque quantitativo.

As amostras foram coletadas em uma cidade onde está localizada uma grande indústria siderúrgica.

O desenvolvimento do método de análise do ATTm e a posterior análise das amostras de urina coletadas foram realizados no Laboratório de Cromatografia localizado no Departamento de Química da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto – Minas Gerais.

O Ácido *trans,trans*-mucônico foi determinado através do método de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de absorção de ultravioleta visível com arranjo de diodos (CLAE/UV-Vis-DAD), adaptando o método de Ducos *et al.*, 1990.

Para se corrigir os efeitos de diluição da urina, que é um fator individual, o teor de creatinina foi determinado em todas as amostras analisadas e os resultados foram expressos em $\mu\text{g.g}^{-1}$ de creatinina (Alessio *et al.*, 1985).

3.1.1 Submissão do Projeto ao Comitê de Ética em Pesquisa

Como urina, amostra que seria analisada, trata-se de material biológico, foi necessário que o projeto recebesse aprovação de um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), de acordo com a Resolução CNS 196/1996 (Conselho Nacional de Saúde, 1996) sobre

diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos. Para tanto, uma série de medidas foram tomadas, desde a elaboração de um projeto próprio, nos moldes exigidos pela resolução, até o cadastramento da pesquisa no Ministério da Saúde, a fim de se obter um número de registro para a sua identificação.

Para atender as exigências da resolução em questão, foi elaborado um Termo de Consentimento (anexo I), destinado ao esclarecimento e aprovação dos voluntários participantes da pesquisa. Esse termo, que é impresso em duas vias, uma para o voluntário e outra para arquivo de pesquisa, apresenta um breve relato sobre o projeto, incluindo alguns conceitos básicos sobre o benzeno e seus malefícios, indicações sobre a forma de coleta da amostra, que é feita de forma simples, considerada não invasiva, e alguns contatos para maiores informações ou possibilidade de desistência caso o voluntário optasse por desistir da participação na pesquisa.

Como nesse projeto de pesquisa algumas informações pessoais foram de grande importância para caracterização da população e para justificar ou eliminar a influência de alguns fatores, um questionário (anexo II) que foi respondido pelos voluntários para também foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).

Apenas após a aprovação do projeto com o Termo de Consentimento e o questionário, homologada pelo CEP da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) através do certificado CEP/UFOP N° 08/07 (anexo III), foi possível começar a parte de amostragens dessa pesquisa.

3.1.2 Amostragem

O local selecionado para realização das amostragens está sob influência das emissões de uma grande indústria siderúrgica.

Para seleção dos sítios a serem amostrados foi feito um estudo geográfico da cidade e dos ventos predominantes na região, cujas direções preferenciais e intensidade estão apresentados na Figura 3.1. De acordo com o observado nesta figura, foram escolhidos bairros diretamente afetados pelas emissões das coqueiras da indústria siderúrgica. Além disso, também foi considerado a possível influência do tráfego de automóveis e caminhões que transitam pela cidade, principalmente em relação à rodovia que a corta. Assim, os locais de amostragens puderam ser divididos em quatro sítios

distintos: (1) sob influência direta das coquerias da siderúrgica; (2) sob influência de uma rodovia; (3) sob influência das coquerias e rodovia e (4) sem influência direta dessas duas possíveis fontes de contaminação, considerado como o “branco”.

Dentro de cada sítio, as amostras foram coletadas de forma aleatória. Os voluntários foram contatados em suas residências e receberam informações sobre a pesquisa. Os que concordaram em participar foram submetidos a um questionário a fim de serem caracterizados quanto a alguns fatores como idade, gênero, condições de saúde e para poder eliminar alguma possibilidade de interferência nos resultados, relacionada ao hábito de fumar, alimentação e/ou uso de medicamentos.

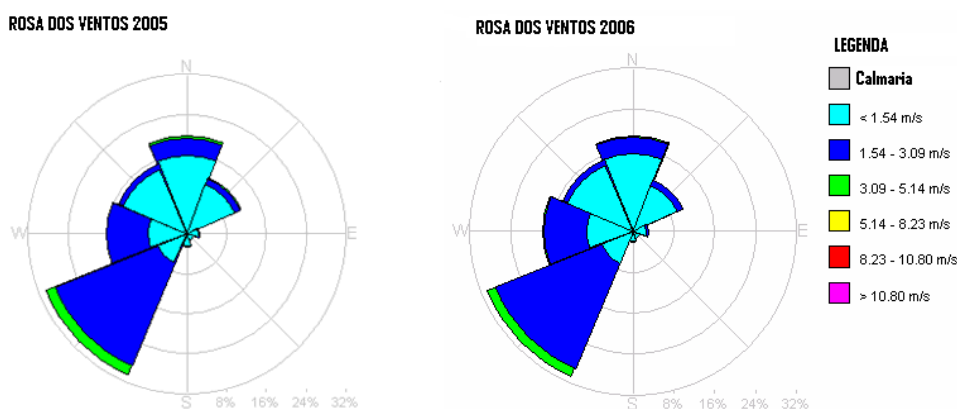


Figura 3.1 – Direção e velocidade dos ventos.

Foram definidas duas campanhas de amostragem, sendo uma no verão, ou período chuvoso, e outra próxima ao inverno, ou período de estiagem, a fim de se avaliar possíveis interferências sazonais nos resultados. As campanhas aconteceram nos períodos de 14 a 18 de janeiro de 2008 e 26 a 29 de maio de 2008. Ao todo foram coletadas e analisadas 193 amostras, sendo 102 na primeira e 91 na segunda campanha de amostragem.

O contato com os voluntários e a coleta e armazenamento das amostras contou com a colaboração de um hospital da cidade, que possui prática em fazer coleta domiciliar, com a finalidade de aumentar a credibilidade do trabalho perante a população e de facilitar a armazenagem, transporte e conservação das amostras. No primeiro contato os voluntários, em suas residências, recebiam informações sobre a pesquisa, e os que concordavam em participar assinavam o Termo de Consentimento, preenchiam o

questionário e recebiam um pequeno frasco de polietileno de 50 mL para coletar a amostra de urina. Os frascos com amostras eram identificados e armazenados temporariamente em caixa térmica refrigerada, munida de termômetro de máximo e mínimo, transportada em um carro que dava suporte às coletas. Periodicamente as amostras eram levadas até o hospital, para serem armazenadas à temperatura de -20°C, local que permaneceram até o dia de transporte para a Universidade Federal de Ouro Preto, onde foram realizadas as análises. As amostras foram deslocadas para a universidade também em caixas térmicas, envoltas em gelo, de forma que ao chegarem ao laboratório de destino elas ainda estavam congeladas. No laboratório elas também foram armazenadas à temperatura de -20°C até o momento de serem analisadas.

3.1.3 Otimização do Método Analítico

Após estudo bibliográfico foi definido que o método analítico utilizado para a determinação do ATTM urinário seria o desenvolvido por Ducos *et al.*, 1990, com algumas adaptações, como a utilização de detector de arranjo de diodos, e o empregado por Coutrim, 1998, para determinação da creatinina. Os reagentes e materiais utilizados nos procedimentos estão listados nas Tabelas 3.1 e 3.2 respectivamente.

Tabela 3.1 – Reagentes utilizado.

Reagentes	Especificações
Creatinina	Grau PA, Fluka $\geq 99\%$ de pureza
Ácido Clorídrico	Grau Cromatográfico, Merck
Tolueno	Grau Cromatográfico, Merck
Água Milli Q [®]	Condutividade = 0,065 μ S
Ácido Pírico	Grau PA, 100% pureza, JT Baker [®]
Hidróxido de Sódio	Grau PA, 100% pureza
Metanol	Grau Cromatográfico, JT Baker [®]
Ácido Acético	Grau Cromatográfico, JT Baker [®]
Ácido <i>trans, trans</i> -mucônico	Grau PA Aldrich [®] , $\geq 99\%$ de pureza

Tabela 3.2 – Materiais e equipamentos utilizados.

Material / Equipamento	Especificações
Espectrofotômetro	Bioespectro modelo SP-220
Micropipetas	Volumes 5000, 1000, 200 e 20 µL
Balança	Shimadzu AUY 220
Chapa Aquecedora	
Sistema de membrana filtrante	Phenomenex PTFE, 0,22 µm de poro
Cartucho	Strata [®] SAX, com 500 mg de trimetilaminopropilsilano com capacidade para 3 ml de solvente, diâmetro de partícula de 55µm e tamanho médio de poro de 70Å.
<i>Manifold</i>	Marca Phenomenex [®] , com capacidade para 12 cartuchos
Bomba de Vácuo	Primatec modelo 131
Coluna Cromatográfica	Shimadzu C18 (150 x 2,0 mm; 3,2 µm)
Pré-coluna	Phenomenex C18 (4 x 3 mm)
Cromatógrafo	Shimadzu Modelo 20A

3.1.3.1 Quantificação do Ácido *trans, trans*-mucônico

Dentre os métodos de quantificação do ATTM o aprimorado por Ducos *et al.*, 1990, é considerado de simples execução, quando comparado com outros métodos, e ainda é muito citado na literatura científica para esse tipo de análise (Chakroun *et al.*, 2008; Paula *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2002; etc;). A partir dele foram introduzidas modificações nas dimensões da coluna cromatográfica, na temperatura aplicada à coluna, no tipo de detector e no comprimento de onda de detecção.

Método de Extração

Pelo fato da urina constituir-se de uma matriz biológica de composição muito diversificada, antes de serem injetadas no cromatógrafo as amostras foram filtradas em membrana de 0,22 µm, e então passaram por um processo de limpeza (*clean up*) com o

objetivo de isolar o analito de interesse de interferentes da matriz. O *clean up* foi realizado através da técnica de extração em fase sólida (EFS). O sistema de extração assemelha-se à cromatografia líquida utilizando-se uma pequena coluna aberta, denominada de cartucho, Figura 3.2, que contém a fase sólida, que corresponde à fase estacionária na cromatografia (Lanças, 2004). Como a substância alvo da separação trata-se do ácido *trans, trans*-mucônico, o mecanismo de separação utilizado foi o de troca iônica e a resina empregada era fortemente trocadora de ânions (SAX). Para a extração foi utilizado um cartucho com 500mg de uma resina com trimetilaminopropilsilano com capacidade para 3ml de solvente.

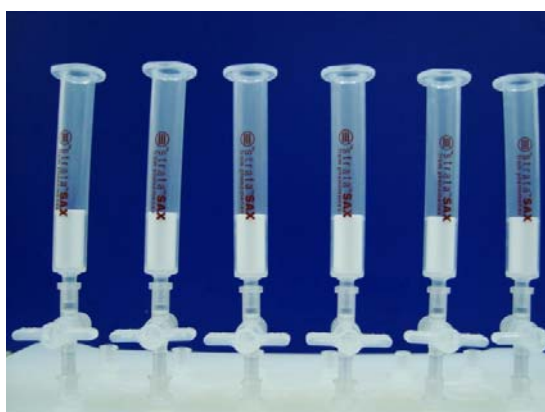


Figura 3.2 – Cartucho utilizados na extração do ATTM.

O processo de extração contou com o auxílio de um *manifold*, que é um sistema de extração a vácuo, com capacidade para 12 cartuchos por extração, Figura 3.3, através das seguintes etapas:

- condicionamento: foram eluídos pelo cartucho 3mL de metanol seguidos de 3mL de água Milli Q[®];
- aplicação da amostra: aplicou-se 1ml de amostra (urina previamente filtrada em membrana de 0,22 μm de poro). As amostras foram eluídas por um tempo de aproximadamente 3 minutos;
- remoção de interferentes (lavagem): eluiu-se pelo cartucho 3mL de ácido acético 1% (solução preparada no dia da utilização, a partir de ácido acético glacial grau cromatográfico);
- eluição do analito: o ATTM foi eluído com 3mL de ácido acético 10% (solução preparada no dia da utilização), com um tempo de eluição de aproximadamente 5 minutos. A solução resultante foi coletada em frasco apropriado e em seguida

transferida para um frasco próprio para o amostrador automático do cromatógrafo (*vial* de 1,5mL com tampa e septo de silicone faceado com teflon), devidamente identificado, pronto para ser levado ao equipamento de CLAE.

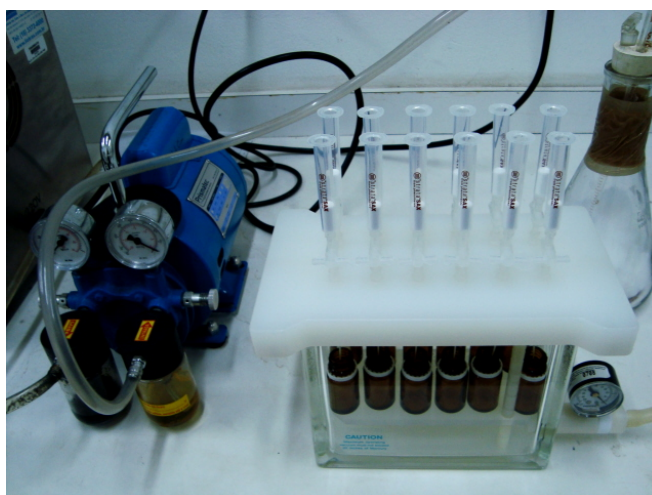


Figura 3.3 – Sistema de extração a vácuo (*manifold*).

Método Cromatográfico

O ATTU urinário foi quantificado em equipamento de CLAE marca Shimadzu, modelo 20A, com as características descritas na Tabela 3.3. Para a separação utilizou-se uma coluna de fase reversa C18 (150mm x 2,0 mm; 3,2 μ m) acoplada a uma pré-coluna também C18 (4mm x 3mm). As condições cromatográficas utilizadas estão descritas na Tabela 3.4.

Tabela 3.3 – Composição do equipamento de CLAE.

Sistema	Especificações
Bombas Binárias	Modelo LC-20AD
Degaseificador	Modelo DGU-20A3
Controlador	Modelo CBM-20A
Injetor Automático	Modelo SIL-20AC
Detector UV-Vis DAD	Modelo SPM-M20A
Controlador de Temperatura	GBC Modelo TC300
<i>Software</i>	<i>LabSolutions</i>

Tabela 3.4 – Condições de análise para separação dos picos de ATTM por CLAE-DAD.

Sistema Cromatográfico	Descrição
CLAE	<i>Shimadzu</i> LC-DAD
Coluna	<i>Shimadzu</i> C18 (150mm x 2,0mm; 3,2 μ m)
Pré-coluna	Phenomenex C18 (4mm x 3 mm)
Vazão da Fase Móvel	0,2 ml.min ⁻¹ (Metanol e Ácido Acético, 1%)
Fase Móvel	Início: 10% Metanol mantido até 12 minutos Variação até 90% de metanol em 1 minuto 90% metanol por 8 min Variação até 10% de metanol em 2 minutos Estabilização em 10% metanol por 5 minutos Tempo total de corrida: 28 minutos
Volume de Injeção	20 μ L (sistema de injeção automática)
Tempo de Médio Eluição	8,7 minutos
Temperatura da Coluna	40 °C

Para execução das curvas analíticas foi preparada uma solução padrão estoque de ATTM na concentração de 100 mg.L⁻¹, pesando-se exatamente 0,0100 g de ácido *trans, trans* mucônico PA Aldrich. Esses foram transferidos para balão volumétrico de 100 mL com auxílio de aproximadamente 10 mL de metanol os quais foram utilizados para solubilizar o ATTM. Após total dissolução o balão foi aferido com água Milli Q[®] e a solução armazenada em freezer por prazo de até seis meses, no máximo. A partir desta solução, no momento da confecção de uma curva, preparava-se uma solução intermediária, aquosa, na concentração de 10 mg.L⁻¹, e, por diluição, a partir dessa solução, as demais soluções padrão de menor concentração eram preparadas.

Como urina é uma matriz biológica muito complexa, as curvas analíticas utilizadas na quantificação do ATTM urinário foram construídas, por método de calibração externa, na matriz. A curva em matriz foi confeccionada em um *pool* composto por dez amostras de urina de pessoas não-fumantes a fim de se obter uma solução com menor concentração possível do analito. Os padrões foram preparados a partir da fortificação do *pool* com volumes apropriados de padrão concentrado ou da solução de padrão intermediário de ATTM, de forma a se utilizar baixos volumes para não causar diluição da matriz. Depois de preparados, os padrões na matriz passaram pelo mesmo tratamento que

as amostras: filtração por membrana 0,22µm, processo de extração em fase sólida e injeção no cromatógrafo.

O comprimento de onda utilizado para a leitura das áreas dos picos referentes aos padrões do ATTM foi de 264nm. Sendo o cromatógrafo composto por um detector de arranjo de diodos (DAD), foi possível analisar vários comprimentos de onda diferentes e encontrar o mais sensível para detectar o ATTM.

As soluções padrões para as curvas foram preparadas em cinco alíquotas diferentes para cada concentração de padrão e cada alíquota foi analisada em duplicata. Também foram analisadas em duplicata cinco amostras do *pool*. O valor obtido a partir da média das áreas encontradas para as amostras de *pool* foi descontado do valor médio das áreas encontradas para cada padrão. Esse procedimento foi adotado com a finalidade de tornar a curva realizada em uma matriz teoricamente isenta do analito pesquisado.

As curvas analíticas foram construídas de acordo com a relação da área do pico de ATTM na solução padrão descontada da área do pico do ATTM no *pool*, versus a concentração de ATTM na solução padrão. As soluções utilizadas para as curvas analíticas tinham as seguintes concentrações: 10,0; 25,0; 50,0; 100; 250 e 500 µg.L⁻¹ de ATTM. Soluções de ATTM padrão mais concentradas também foram analisadas para se avaliar a linearidade do método, mas não foram utilizados na quantificação das amostras.

3.1.4 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

Segundo Resolução RE nº 899 da ANVISA (ANVISA, 2003), a validação de uma metodologia analítica é um processo empregado para garantir que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados encontrados em uma pesquisa. Estudos experimentais que comprovem a veracidade de métodos e resultados estão sendo cada vez mais exigidos visto que resultados de pesquisas confiáveis são referências para tomadas de decisões importantes relacionadas a fatores que podem englobar, por exemplo, a saúde humana e a prejuízos financeiros irreparáveis (Ribani *et al.*, 2004).

Existem documentos nacionais e internacionais que fornecem metodologias para serem empregadas em processo de validação. Por exemplo, as diretrizes da *International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of*

Pharmaceuticals for Human Use (Portal ICH) são utilizadas como referência na União Européia, Estados Unidos e Japão para questões relacionadas a novos fármacos. Entre os seus documentos existe um guia específico para validação de procedimentos analíticos (ICH, 1997). No Brasil existem algumas publicações oficiais como a RE N° 899/2003, da ANVISA (ANVISA, 2003), que trás o “Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos” e “Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos”, do INMETRO (INMETRO, 2007). Algumas normas como a ABNT NBR ISO/IEC 17025 (NBR ISO/IEC, 2005) que dispõe sobre “Requisitos gerais para a competência de laboratórios de ensaio e calibração” possuem alguns conceitos usados como referência para elaboração dessas publicações. Além desses documentos, existem trabalhos de pesquisas publicados que foram desenvolvidos exclusivamente para alguma técnica analítica e que também são utilizados como referência para novos projetos, como Ribani *et al.*, 2004; Paula *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2002.

Para a validação do método analítico utilizado nessa pesquisa foram avaliados os seguintes parâmetros: interferência da matriz biológica, linearidade e faixa de trabalho, limites de detecção e de quantificação, precisão e exatidão..

Interferência da Matriz Biológica

Matrizes complexas podem alterar a sensibilidade do detector que mede o analito de interesse (INMETRO, 2007). Como a urina é uma matriz biológica bastante complexa é necessário avaliar se ela exerce alguma interferência na detecção do ATTm.

O efeito matriz pode causar uma resposta super estimada ou reduzida do analito no detector utilizado na metodologia (Cardoso, 2008). Assim, é importante avaliar se essa interferência existe para poder minimizar possibilidades de erros, aplicando mudanças, por exemplo, no pré-tratamento da amostra e conferindo possibilidade de erros proporcionais utilizando a curva que mais se assemelhe às condições da amostra.

O estudo dessa interferência foi feito comparando-se o coeficiente angular obtido a partir de uma curva analítica construída em água Milli Q com aquele obtido de uma curva construída a partir de soluções de um *pool* de amostras de urina fortificadas com padrão de ATTm (Paula *et al.*, 2003). A comparação da inclinação das retas de regressão entre as curvas em água e em *pool* de urinas comprovou a existência de acentuado efeito matriz, o

que definiu que as curvas utilizadas para a quantificação da amostra seriam sempre confeccionadas em *pool* de urinas.

Linearidade e Faixa de Trabalho

Quando os resultados obtidos em uma metodologia analítica são diretamente proporcionais à concentração do analito existente na amostra se diz que esse método apresenta linearidade. Ela é determinada por intermédio da curva analítica, dentro de um intervalo especificado, o qual apresenta geralmente 5 ou 6 pontos (INMETRO, 2007; Lanças, 2004; ANVISA, 2003). A escolha desse intervalo depende do tipo de aplicação a que se destina a quantificação do analito e da concentração média de analito que se suspeita conter nas amostras. A RE n° 899/2003 (ANVISA, 2003), por exemplo, determina uma faixa de 80% a 120% da concentração teórica do analito para matérias-primas e fórmulas farmacêuticas. Já para determinação de impurezas a mesma resolução determina um intervalo do nível de impureza esperado (mínimo) até 120% do limite máximo especificado.

A faixa de trabalho compreende o intervalo de concentrações escolhido para quantificação das amostras. Ela deve apresentar resposta linear e a concentração do analito mais esperada de ser encontrada nas amostras deve, dentro do possível, situar-se em seu centro.

A linearidade foi obtida a partir da expressão matemática de regressão linear usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado nas amostras. Segundo ANVISA, 2003, o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação deve ser de 0,99. Também foi aplicada a função “Análise de Dados – Regressão” do Excel, que realiza a análise da regressão linear múltipla, incluindo a regressão linear simples. Com essa função os dados da curva foram submetidos a um teste de variância ANOVA onde pode-se analisar os resultados através de um Teste F. Os resultados foram obtidos a partir de um intervalo de confiança de 95%, e os resultados avaliados a partir da comparação do F observado (calculado) com o F crítico (tabelado) e do *p value* (Lapponi, 2005).

Limites de Detecção e de Quantificação

Limite de detecção (LD) representa a menor concentração do analito que pode ser detectada por um determinado método experimental, sem que essa concentração seja, necessariamente, quantificada com exatidão (ANVISA, 2003). O LD pode ser calculado por três diferentes modos: método visual, quando se distingue visualmente o ruído e o sinal da menor concentração detectável; método baseado em parâmetros da curva analítica, que utiliza a estimativa do desvio padrão das respostas e o coeficiente angular da curva analítica; e o método da relação sinal-ruído (Ribani *et al.*, 2004). Neste método é feita uma comparação dos sinais de baixas concentrações conhecidas do analito com o ruído gerado na linha de base do processo. O LD é calculado como a concentração que gera um sinal três vezes maior que o ruído do sistema, ou seja, uma relação 3:1 (Lanças, 2004; Ribani *et al.*, 2004).

O método da relação sinal-ruído foi o que apresentou melhor resultado quanto a determinação do LD para esse trabalho, que foi calculado através da relação da área do pico do ruído com a área do pico da menor concentração conhecida, descontada da área do *pool*.

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração que pode ser determinada com exatidão em um procedimento analítico. Os mesmos métodos utilizados para calcular o LD podem ser usados para o cálculo do LQ. Utilizando o mesmo critério do LD, o método utilizado para determinar o LQ foi o do sinal-ruído. Aqui, a relação aceitável é a de 10:1, ou seja, o LQ é a concentração referente a um sinal dez vezes maior ao sinal gerado pelo ruído da linha de base. Ele também foi calculado de acordo com a relação da área de picos gerados pelo ruído com a área do pico da menor concentração conhecida do analito, descontada da área do *pool* (Lanças, 2004; Ribani *et al.*, 2004).

Precisão

A precisão de um método é a avaliação da dispersão de resultados entre ensaios diferentes de uma mesma amostra, em condições definidas (INMETRO, 2007). Pode ser determinado por repetibilidade, cujos resultados são obtidos pelos mesmos método, amostra, laboratório, operador e equipamento, e por reprodutibilidade, cujos resultados são obtidos pelos mesmos método e amostra, porém em diferentes laboratórios,

com diferentes operadores e equipamentos (Lanças, 2004). Esses parâmetros são normalmente, dependentes da concentração do analito e devido a isso são geralmente expressos pelo desvio padrão relativo (DPR) ou coeficiente de variação (CV%), já que este é normalizado com base na concentração.

Nesse trabalho a precisão foi determinada pela repetibilidade, de acordo com a seguinte equação, onde são aceitos valores de DPR de até 20% (INMETRO, 2007; Ribani *et al.*, 2004):

$$\text{DPR} = \text{CV} = \text{DP} / \text{CMD} \times 100 \quad (3.1)$$

Onde:

- DP = desvio padrão da amostra
- CMD = concentração média determinada

Exatidão

A exatidão de um método analítico é avaliada pela recuperação. A recuperação é a proporção do analito de interesse que é passível de ser quantificada. O ensaio de recuperação mede a eficiência do processo de isolamento, ou seja, extração, do analito da matriz onde é encontrado (Lanças, 2004; Ribani *at al.*, 2004). É normalmente estimada pela análise de amostras fortificadas com concentrações conhecidas do analito. O ideal é que sejam analisadas pelo menos três diferentes concentrações, já que ela tende a variar em concentrações muito baixas. O percentual de recuperação esperado encontra-se na faixa de 70 a 120% para a maioria dos ensaios analíticos (INMETRO, 2007; Lanças, 2004).

Neste trabalho a recuperação foi calculada segundo o INMETRO, a partir da análise de cinco replicatas, avaliadas em duplicata, nas concentrações de 50,0; 100,0 e 500,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ATTM, de acordo com a seguinte fórmula

$$\text{Recuperação (\%)} = ((\text{C1}-\text{C2})/\text{C3}) \times 100 \quad (3.2)$$

onde:

- C1 = concentração determinada na amostra adicionada;
- C2 = concentração determinada na amostra não adicionada;
- C3 = concentração adicionada.

3.1.5 QUANTIFICAÇÃO DO ATTM

As campanhas de amostragem foram realizadas após a obtenção do método analítico otimizado.

As amostras permaneceram armazenadas em freezer (-20°C) até o momento de serem analisadas.

3.1.5.1 Determinação de Creatinina

A determinação de creatinina foi realizada assim que as amostras chegaram ao laboratório, de acordo com método adaptado por Coutrim, 1998. O método utilizado foi o de redução do ácido pícrico pela creatinina em meio alcalino, formando ácido picrâmico. A creatinina após originar o ácido picrâmico apresentou coloração vermelho alaranjada e foi determinada espectrofotometricamente a 525nm com o espectrofotômetro Biospectro modelo SP-220.

O primeiro passo para a quantificação da creatinina em amostras de urina foi a confecção de uma curva analítica. Para isso foi necessário o preparo de soluções de acordo com os seguintes procedimentos:

- Solução padrão de creatinina de 500mg.L⁻¹ - pesou-se 126,30mg de creatinina PA que foram dissolvidos em aproximadamente 50mL de uma solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1mol.L⁻¹. Transferi-se a solução para um balão volumétrico de 250mL, adicionada de 2mL de tolueno PA, como preservante, e aferiu-se o balão com a mesma solução de HCl 0,1mol.L⁻¹. Essa solução foi armazenada em geladeira. No momento da confecção da curva analítica foram preparadas soluções padrões nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,5 e 5,0mg.L⁻¹ que foram descartadas após serem utilizadas.
- Ácido Pícrico 1% (p/v) – pesou-se 2,00g de ácido pícrico PA e dissolve-os em cerca de 100mL de Água Milli Q. Esta solução permaneceu em repouso por um dia e no dia seguinte foi filtrada para um balão volumétrico de 200mL, que foi aferido com a mesma água. A solução foi armazenada em geladeira.
- Hidróxido de Sódio 10% (p/v) – pesou-se 10,00g de hidróxido de sódio em pastilhas, que foram dissolvidos em aproximadamente 50mL de Água Milli Q contida em um béquer de 150mL que se encontrava em banho de gelo. Após a solução atingir

temperatura ambiente, ela foi transferida para balão volumétrico de 100mL e este foi aferido com a mesma água. A solução foi armazenada em frasco de polietileno.

- Picrato Alcalino – mediu-se 50,0mL da solução de hidróxido de sódio 10% (p/v), com auxílio de uma pipeta volumétrica, e transferiu-os para balão volumétrico de 250mL. Aferiu-se o balão com a solução de ácido pícrico 1% (p/v). Esta solução foi utilizada no mesmo dia de seu preparo e então descartada.

A confecção da curva analítica e a quantificação do teor de creatinina das amostras seguiram as seguintes etapas:

- a) transferiu-se 1,0mL de urina para um balão volumétrico de 250mL e ajustou-se o volume do balão com água Milli Q;
- b) transferiu-se uma alíquota de 5,0mL da urina diluída para um tubo de ensaio. A ele adicionou-se 2,5mL de solução de picrato alcalino e homogeneizou-se a solução resultante. Paralelamente, preparou-se uma solução com 5,0mL de água Milli Q e 2,5mL de picrato alcalino para servir como prova em branco;
- c) em seguida, colocou-se o tubo de ensaio em banho termostatizado a 40°C, onde ficou até ocorrer reação de formação de cor alaranjada (aproximadamente 10 minutos);
- d) após a formação de cor as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro com leituras das absorvâncias realizadas em um comprimento de onda de 525nm, em tempo máximo de 30 minutos depois de completada a reação de formação de cor.

Após a realização das análises de creatinina as amostras foram congeladas novamente para posterior utilização na quantificação do ATTM. Este processo foi realizado em um prazo máximo de um mês, o qual é considerado o tempo de validade das amostras segundo a Portaria N.º 34/2001 (MTE, 2001) Nesta quantificação as amostras dos voluntários foram analisadas de forma intercaladas com soluções padrão que foram utilizadas na confecção da curva analítica.

Assim, de acordo com o método acima proposto, foram obtidas as concentrações do ATTM das amostras de urina de voluntários que se dispuseram a participar da pesquisa. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de creatinina com a finalidade de se minimizar os efeitos individuais de diluição das amostras de urina.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo estão apresentados e discutidos os resultados obtidos durante o processo de otimização do método analítico, as coletas e análises das amostras de urina. Inicialmente estão abordados os dados referentes ao método otimizado e sua validação e, em seguida, os dados referentes às amostragens e às concentrações de ATTM urinário encontradas.

As avaliações dos resultados foram feitas a partir do tratamento dos dados utilizando os programas *Microsoft Office Excel 2007* e *Minitab 15*.

4.1 OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO

4.1.1 Separação e Identificação do ATTM

O método analítico otimizado introduziu algumas modificações no método original, desenvolvido e validado por Ducos *et al.* (1990), como a utilização de temperatura, de acordo com Paula *et al.* (2003), para melhorar a resolução dos picos cromatográficos. As dimensões da coluna utilizada também foram diferentes. O método original utilizou coluna C18 (250 x 4,6 mm; 5 μm) e o método empregado utilizou coluna C18 (150 x 2,0 mm; 3,2 μm). Sabendo que a eficiência de uma coluna aumenta com a diminuição do diâmetro de partículas (Harris, 2005), essa modificação foi realizada com o intuito de melhorar a resolução dos cromatogramas obtidos. Com a modificação da coluna foi necessário ajustar o fluxo da fase móvel para manter a pressão do sistema dentro do limite do equipamento evitando coeluição de picos. Assim, o fluxo original que era de 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ passou para 0,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, representando também menor custo da análise devido à menor quantidade de solvente utilizada.

O tempo de retenção do ATTM foi determinado na condição cromatográfica utilizada a partir da eluição de uma solução aquosa padrão. Posteriormente foram analisadas amostras de urina fortificadas com diferentes concentrações de padrão de ATTM para se conhecer o perfil dos cromatogramas gerados e verificar se o tempo de

retenção sofreria alteração por influência da matriz. O detector com arranjo de diodos permitiu a verificação da pureza do pico do ATTM eluído a partir da comparação dos espectros obtidos com o espectro do ATTM padrão e esse procedimento conferiu maior confiança na identificação e quantificação dos picos de ATTM nas amostras. Ainda assim, persistindo alguma dúvida na identificação do pico de ATTM na amostra uma quantidade de ATTM padrão era adicionado na mesma (fortificação) a fim de se confirmar qual dos picos do cromatograma apresentaria aumento na área. Os cromatogramas da Figura 4.1 exemplificam a identificação de ATTM numa amostra de urina pelo processo de fortificação. O espectro de absorção molecular na região do UV-vis do pico de ATTM permitiu encontrar o comprimento de onda de máxima absorção, ou seja, 264nm, para a quantificação do ATTM.

Antes de chegar ao método otimizado foram testadas algumas condições para se tentar melhorar a separação do ATTM das demais substâncias presentes na amostra. Uma das condições testadas foi o fluxo de 0,18 mL.min⁻¹ para fase móvel. Observou-se que com essa condição a separação não foi melhorada e o tempo de retenção do analito e o tempo para eluição de todas as outras substâncias ficaram maiores, implicando no aumento do tempo de análise. Outra medida tomada para tentar melhorar a separação do pico de ATTM de picos vizinhos foi a modificação da concentração e volume do ácido acético utilizado na lavagem do processo de EFS, com o intuito de eliminar maior quantidade de interferentes presentes na matriz. Inicialmente foi mantida a concentração de 1% para o ácido acético e foi testado o volume de 5 mL para lavagem ao invés de 3 mL, conforme recomendado pela literatura. Essa medida não acarretou em mudanças significativas nos cromatogramas das amostras nem nas áreas dos picos de ATTM nas mesmas. Outra condição testada foi a lavagem do cartucho de extração com 5 mL de ácido acético 3%,v/v. Essa medida acarretou na eluição do ATTM durante a lavagem dos cartuchos e nenhum pico de ATTM foi detectado nos cromatogramas das amostras. Dessa forma, optou-se por utilizar 3 mL de ácido acético 1%,v/v, nas etapas de lavagem do processo EFS.

4.1.2 Interferência da Matriz Biológica

A interferência do efeito matriz foi avaliada comparando-se os coeficientes angulares entre duas curvas analíticas, sendo uma delas obtidas de soluções padrão em

água e a outra de soluções padrão preparadas em um *pool* composto por dez amostras de urina de pessoas não fumantes e não expostas ocupacionalmente.

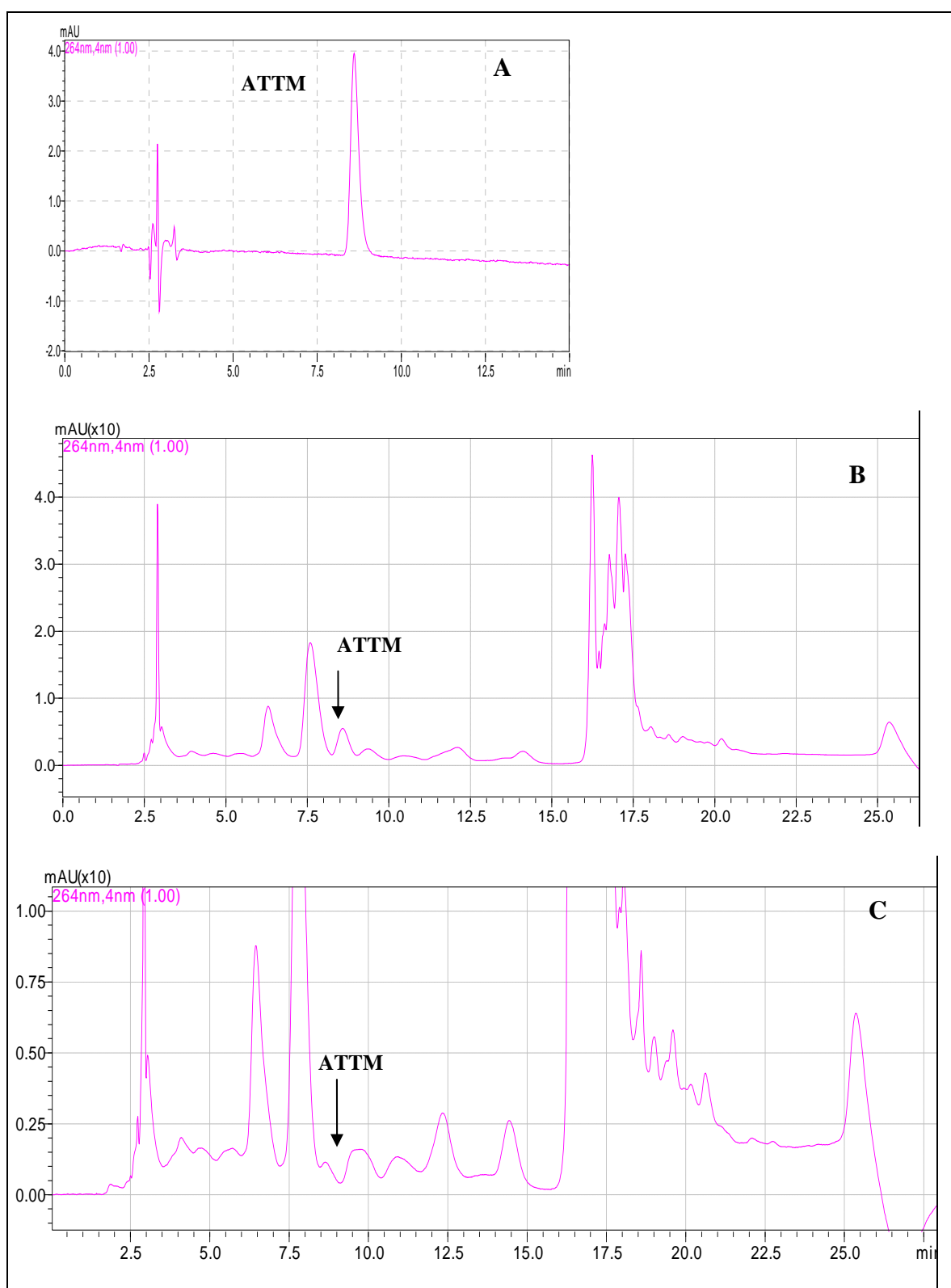


Figura 4.1 – Cromatogramas mostrando picos de ATTM em diferentes amostras: A) padrão de $500 \mu\text{g.L}^{-1}$, em fase aquosa, com tempo de retenção de 8,7 minutos; B) amostra fortificada com padrão de $500 \mu\text{g.L}^{-1}$; e C) amostra *in natura*.

Para a confecção da curva em *pool* de urina, após adição de volumes apropriados de padrão, as soluções resultantes passaram pelo mesmo tratamento que as amostras: filtração em membrana 0,22 µm, processo de EFS e injeção no cromatógrafo.

Na Figura 4.2 são apresentadas as duas curvas analíticas obtidas. É possível verificar pelos coeficientes angulares das mesmas que a matriz interfere negativamente na determinação do ATTM por esse método, fazendo com que a sensibilidade para a detecção do ATTM seja menor na curva obtida no *pool* (menor valor do coeficiente angular). Dessa forma, ficou constatada a existência de interferência da matriz nessa determinação e, assim, todas as curvas analíticas utilizadas nas quantificações do ATTM em amostras de urina passaram a ser confeccionadas em *pool* de urinas.

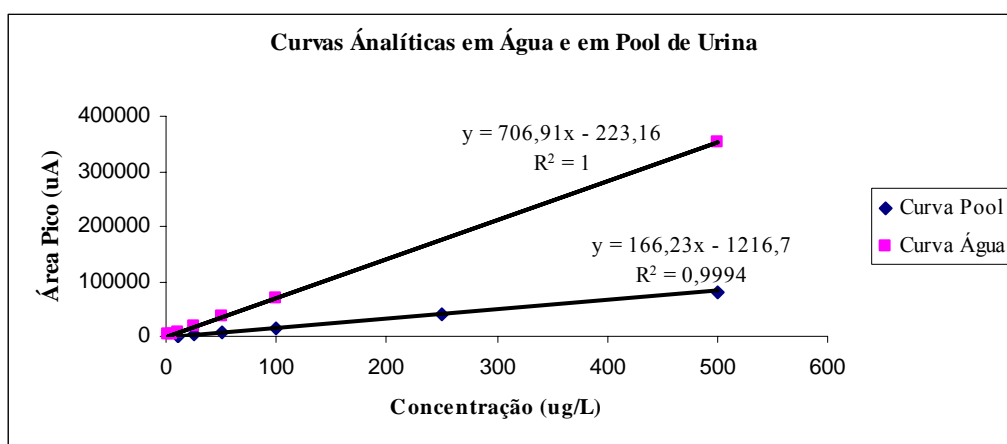


Figura 4.2 – Comparação entre Curvas Analíticas confeccionadas em água e em pool de urina.

4.1.3 Linearidade e Faixa de Trabalho

A linearidade das curvas analíticas foi avaliada com base no coeficiente de regressão linear das mesmas e analisada para um intervalo compreendido entre 10 e 10000 µg.L⁻¹ de ATTM. Em todos os casos foram obtidos coeficientes de regressão linear sempre maiores ou iguais a 0,999, dentro do critério de aceitação da ANVISA, que prescreve o valor de 0,99 (ANVISA, 2003).

Pela ferramenta de Regressão da Análise de Dados do Excel, a um nível de confiança de 95% foi encontrado um *p-value* de $5,02 \cdot 10^{-2}$, consideravelmente menor que o valor de alfa para esse nível de confiança, o que confirma a linearidade dos dados. Outra condição testada por essa ferramenta é a variância dos dados através do teste F. Como F calculado é maior que o F tabelado até para 99% de confiança, o intervalo de dados

analisados pode ser considerado linear. Os resultados obtidos estão expostos nas Tabelas 4.1 e 4.2.

Tabela 4.1 – Resumo da estatística de Regressão

R múltiplo	0,9996
R-Quadrado	0,9992
R-quadrado ajustado	0,9990
Erro padrão	23124
Observações	9

Tabela 4.2 – Análise de variância dos dados de linearidade

	<i>gl</i>	<i>F</i>	<i>p-value</i>
Regressão	1	$8,31556 \cdot 10^{-3}$	$5,02363 \cdot 10^{-12}$
Resíduo	7		
Total	8		

A faixa de trabalho foi escolhida considerando-se as concentrações de ATTM encontradas na literatura para pessoas não expostas ocupacionalmente ao benzeno. Ela compreendeu o intervalo de 10 - 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$, composto por seis pontos, e as curvas analíticas obtidas sempre apresentaram coeficiente de regressão linear igual ou superior a 0,999. Na Figura 4.2 é apresentada uma das curvas analíticas obtidas nessa faixa de concentração. Algumas amostras apresentaram concentrações de ATTM maiores que 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$, ultrapassando o limite superior da curva analítica. O ATTM foi quantificado nessas amostras através de uma curva analítica com sete pontos e as concentrações do ATTM encontrado nessas amostras sempre ficaram dentro do intervalo da curva analítica.

4.1.4 Limites de Detecção e de Quantificação

Os limites de detecção e de quantificação foram calculados a partir do método de relação sinal-ruído (SR), considerando para o LD a relação SR de 3:1, e para o LQ a relação SR de 10:1. Para essas determinações foram consideradas as áreas dos ruídos dos cromatogramas obtidos da injeção de cinco amostras com adição do padrão de 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$, concentração essa referente ao menor ponto da curva analítica. Como as injeções foram feitas em duplicatas, resultou um total de 10 cromatogramas. Para cada cromatograma foram consideradas as áreas de três picos de ruídos, como exemplificada na Figura 4.3.

Também para cada cromatograma foi calculada a média das três áreas selecionadas, e então, determinou-se a concentração de ATTM correspondente à essa área média a partir da área do pico de ATTM correspondente à concentração de $10 \mu\text{g.L}^{-1}$. Após isso ter sido feito para os 10 cromatogramas tomou-se o valor médio das concentrações obtidas como o valor da concentração de ATTM correspondente ao ruído para o cálculo do LD e LQ. A concentração de ATTM limite assim obtida foi igual a $1,0 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o LD e $3,5 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o LQ. A estatística descritiva desses resultados está expressa na Tabela 4.3.

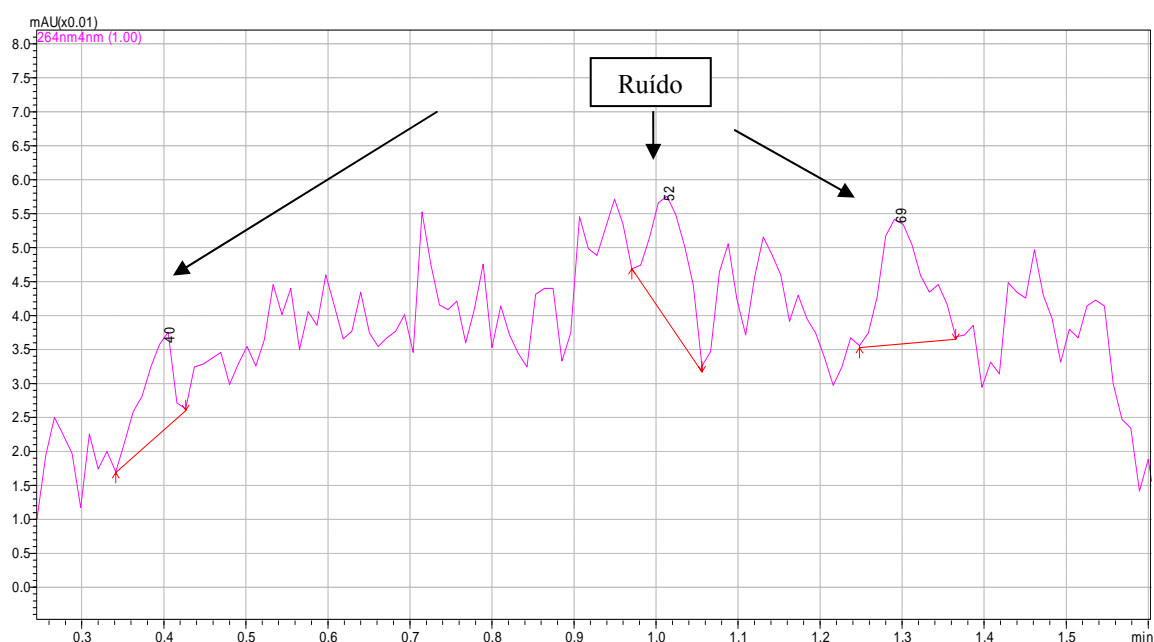


Figura 4.3 – Parte de um cromatograma de uma amostra, ampliado para destacar a linha de base e os picos considerados ruídos para essa injeção, com suas respectivas áreas.

Os limites de detecção e quantificação do método avaliado estão abaixo daqueles obtidos em trabalhos semelhantes conforme pode ser observado nos dados da Tabela 2.1.

Tabela 4.3 – Estatística descritiva para os resultados de LD e LQ, em $\mu\text{g.L}^{-1}$, do método analítico otimizado.

Parâmetro	N	Média	Erro Padrão	Desvio Padrão	Valor Mínimo	1º Quartil	Mediana	3º Quartil	Valor Máximo
LD	10	1,04	0,188	0,595	0,436	0,653	0,806	1,291	2,48
LQ	10	3,49	0,627	1,983	1,452	2,176	2,687	4,302	8,267

4.1.5 Precisão

A precisão do método foi determinada através do desvio padrão relativo (DPR, equação 3.1) da repetibilidade dos resultados de concentração das análises de sete amostras de *pool* adicionadas de padrão e extraídas antes de serem injetadas no cromatógrafo. Os resultados obtidos estão expostos na Tabela 4.4, e estão bem abaixo do limite aceitável de 20% de variação para precisão segundo Ribani *et al.* (2004).

Tabela 4.4 – Coeficientes de Variação obtidos no ensaio de precisão através de repetibilidade.

Concentração ATTM ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Coeficiente de Variação (%)
25	3,8
100	6,1
500	2,2
Média	4,0

4.1.6 Exatidão

A exatidão do método foi avaliada através da recuperação de ATTM padrão adicionado às amostras. O estudo de recuperação foi realizado de acordo com INMETRO, 2007. Foram analisados três níveis de concentrações, com as extrações em cinco replicatas, sendo que cada solução obtida foi injetada duas vezes no cromatógrafo. Amostras de *pool* de urina foram fortificadas com soluções padrão para se obter as concentrações requeridas, passaram pelo processo de extração e então foram quantificadas em uma curva analítica anteriormente confeccionada também em *pool* de urina. Cinco amostras do *pool* sem adição também foram extraídas e quantificadas em duplicatas. Os cálculos de recuperação foram realizados a partir da equação 3.2 e os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.5. A recuperação média calculada foi de 87,6%, resultado satisfatório de acordo com o intervalo aceitável, de 70-120%, sugerido por Lanças (2004) e por Ribani *et al.* (2004). Também está de acordo com autores que utilizaram o mesmo método de extração para promover o *clean up* das amostras como Ducos *et al.* (1990) e Cocco *et al.* (2003), que relatam recuperação de 90%, e Paula *et al.* (2003) que cita média de 86% de taxa de recuperação.

Tabela 4.5 – Resultados do ensaio de recuperação do método analítico.

ATTM ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Recuperação (%)
50	77,7
100	87,0
500	98,2
Média	87,6

4.2 AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DE ATTM URINÁRIO

Para determinação do ATTM urinário foram realizadas duas campanhas amostrais com o objetivo de avaliar possíveis variações sazonais nas concentrações do analito. Uma campanha foi realizada em janeiro de 2008, período chuvoso, e a outra em maio de 2008, período de estiagem. Os dados meteorológicos relativos aos períodos em questão estão apresentados na Tabela 4.6. A média de precipitação acumulada para o primeiro período foi de 21,4 milímetros e para o segundo período foi de 6,9 milímetros.

Os valores das concentrações de ATTM, em $\mu\text{g.g}^{-1}$ de creatinina, obtidos para todas as amostras avaliadas estão expressos no Anexo IV, divididos por campanha e identificados por sítio de amostragem. Ao todo foram coletadas e analisadas 193 amostras, sendo 102 na primeira campanha e 91 na segunda campanha. A Tabela 4.7 mostra a caracterização dos voluntários obtida através dos dados dos questionários, conforme modelo em anexo. Porém, considerando que resultados de amostras de urina que apresentam teores de creatinina maiores que $3,0 \text{ mg.L}^{-1}$ ou menores que $0,3 \text{ mg.L}^{-1}$ podem sofrer alterações devido a elevada concentração ou diluição da urina amostrada (Alessio *et al.*, 1981), as amostras de voluntários que apresentaram teores de creatinina que extrapolaram esses limites foram desconsideradas, totalizando 179 amostras válidas. Para o tratamento estatístico dos dados, os teores de ATTM urinário menores que o LQ estabelecido pelo método foram considerados como sendo $1,0 \mu\text{g.g}^{-1}$ de creatinina. A Tabela 4.8 mostra a estatística descritiva dos resultados de ATTM urinário válidos.

Tabela 4.6 – Dados meteorológicos da cidade referentes aos dois períodos de amostragem.

DADOS METEOROLÓGICOS DOS PERÍODOS DE AMOSTRAGEM						
DIA	Temperatura (°C)			Umidade Relativa (%)	Precipitação (mm)	
	Mínima	Média	Máxima		Diária	Acumulada no mês
Primeira Campanha - Janeiro 2008						
10	20,1	23,6	28,1	62	0,4	15,8
11	21,2	26,3	31,4	63	3,2	19,1
12	21,9	26,1	30,6	63	0	19,1
13	22,9	26,1	31,2	63	0	19,1
14	21,2	25,5	29,7	63	0	19,1
15	20,3	24,5	30,7	63	0	19,1
16	22,2	26	30,6	63	0	19,1
17	22,6	25,1	32,1	64	2,3	21,4
Segunda Campanha - Maio 2008						
22	14,4	20,6	28,8	67	0,2	6,9
23	14,5	20,2	28,3	70	0	6,9
24	14,2	20,5	28,7	72	0	6,9
25	14,6	20,1	27,5	76	0	6,9
26	15,5	21,3	28,9	75	0	6,9
27	16,5	21,8	28,2	73	0	6,9
28	16,9	21,3	27,8	74	0	6,9
29	14,9	20,9	27,8	76	0	6,9

Fonte: Dados cedidos por uma estação meteorológica da região

Tabela 4.7 – Caracterização dos voluntários quanto ao gênero e exposição à fumaça de cigarro.

Voluntários	Sexo		Exposição à fumaça de cigarro			
	(n)	Masculino	Feminino	NF	F	FP
	193	45	148	152	20	21

Legenda: NF = Não Fumante F = Fumante FP = Fumante Passivo

Tabela 4.8 – Estatística descritiva para os resultados de ATTM urinário das duas campanhas, em $\mu\text{g.g}^{-1}$ creatinina

Dados	N	Média	Erro Padrão	Desvio Padrão	Valor Mínimo	1º Quartil	Mediana	3º Quartil	Valor Máximo
1 ^a Campanha	95	112	22,8	223	1,0	25,4	49,5	107	1868
2 ^a Campanha	84	74,4	8,22	75,3	1,0	25,7	97,2	97,2	468

Para verificação da dispersão dos dados e para evidenciar a existência de possíveis *outliers*, dados que são considerados suspeitos dentro do conjunto ao qual pertencem, sendo anormalmente grandes ou pequenos (Lapponi, 2005), foi utilizada a ferramenta *boxplot* do programa Minitab 15. O gráfico com os resultados do tratamento está apresentado na Figura 4.4, onde ficou evidenciada a presença de *outliers*.

Através de aplicação de teste de normalidade no conjunto de dados observou-se que eles tratam de uma distribuição contínua, e por isso adotou-se o Teste de Levene para a análise de variâncias entre os resultados de ATTM urinário obtidos. Essas análises foram, na maioria das vezes, realizadas a um nível de confiança de 95%, adotando um valor de alfa de 0,05 ($\alpha = 0,05$) e o padrão avaliativo empregado foi a comparação entre o valor de alfa e p (p value) calculado para cada teste estatístico. Quando um valor- p de um teste estatístico era menor que o seu alfa, a hipótese nula, que nesse caso é a igualdade dos grupos testados, era rejeitada.

Os dados relativos às duas campanhas de amostragem foram submetidos a teste de variância de acordo com o exposto na Figura 4.5. O Teste de Levene para esse grupo de amostras apresentou $p = 0,094$ para intervalo de confiança de 95%. De acordo com o teste, a esse nível de confiança os dados entre as duas campanhas são considerados estatisticamente iguais. Porém a um nível de confiança de 90% ($\alpha = 0,10$) as duas campanhas podem ser consideradas diferentes estatisticamente.

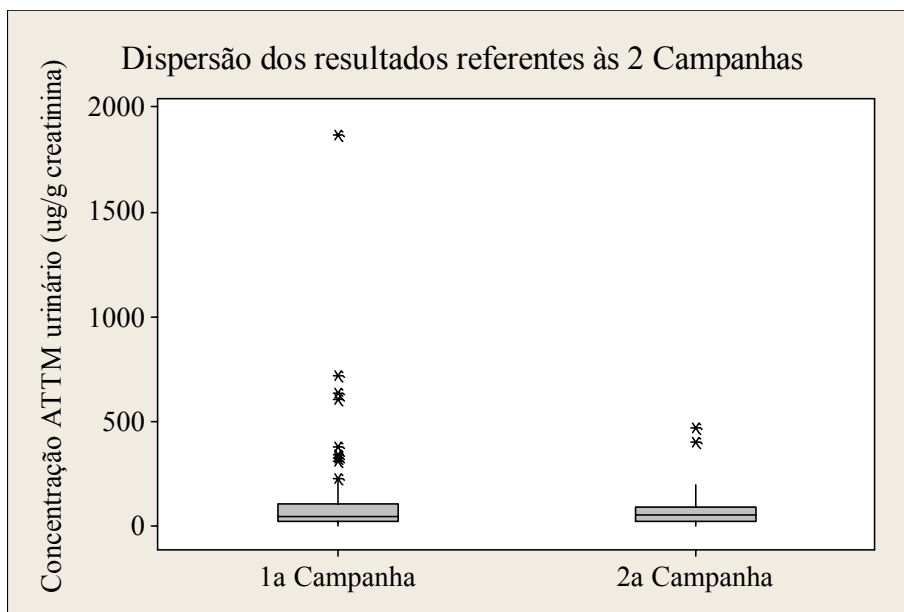


Figura 4.4 – *Boxplot* dos dados referentes às duas campanhas de amostragem.

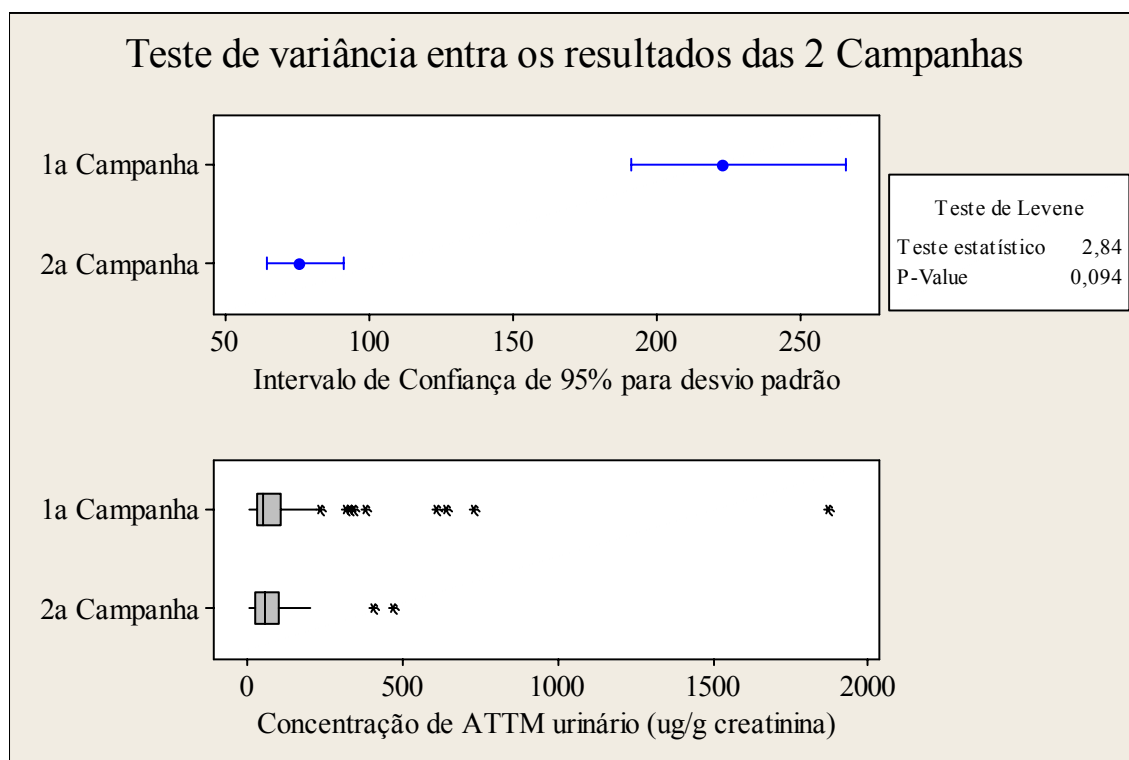


Figura 4.5 – Resultados do teste de variância realizado entre os dados das duas campanhas de amostragem.

Como o teste de dispersão de dados através da ferramenta *Boxplot*, Figura 4.4, apresentou valores considerados *outliers*, foram realizados novos testes estatísticos sem a presença dos dados considerados discrepantes. Na Tabela 4.9 estão apresentados os novos resultados para estatística descritiva. Da mesma forma, os dados também foram

submetidos a novo teste de variância, conforme resultados apresentados no gráfico da Figura 4.6. A partir dos novos testes, sem *outliers*, foi possível concluir que as duas campanhas de amostragem não apresentaram diferença estatística significativa ao nível de confiança de 95%, com $p = 0,174$ para o Teste de Levene. Assim, não foi possível distinguir variação entre as campanhas que pudesse ser atribuída ao fator sazonalidade. Isso talvez possa ser explicado pelo fato de a média de precipitação acumulada no período considerado chuvoso, nesse ano não foi expressivamente superior à média para o período de estiagem, de forma que não houve a lavagem da atmosfera que se esperava. Segundo comentários dos próprios voluntários, o período que compreendeu a primeira campanha de amostragem estava sendo considerado um período atípico em relação à precipitação que estavam acostumados. Assim, nos demais testes estatísticos realizados, as amostras foram agrupadas de forma a considerar amostragem única. Os valores da estatística descritiva básica para os dados assim agrupados estão expostos no gráfico de distribuição da Figura 4.7.

Tabela 4.9 – Estatística descritiva para os resultados de ATTM urinário das duas campanhas, em $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ creatinina, sem *outliers*.

Dados	N	Média	Erro Padrão	Desvio Padrão	Valor Mínimo	1° Quartil	Mediana	3° Quartil	Valor Máximo
1 ^a Campanha	82	52,9	4,4	39,9	1,0	20,9	43,3	78,2	162,0
2 ^a Campanha	82	65,5	5,4	49,8	1,0	25,3	54,4	96,6	201,0

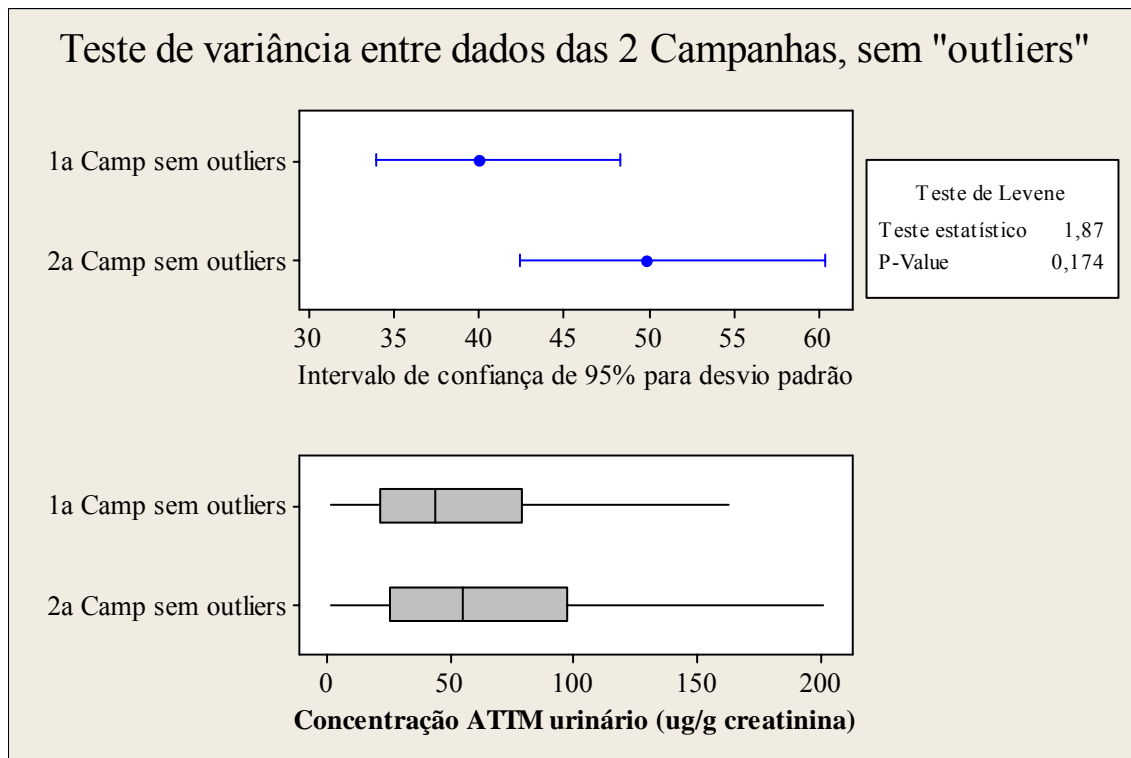


Figura 4.6 – Resultados do teste de variância realizado entre os dados das duas campanhas de amostragem sem os dados considerados *outliers*.

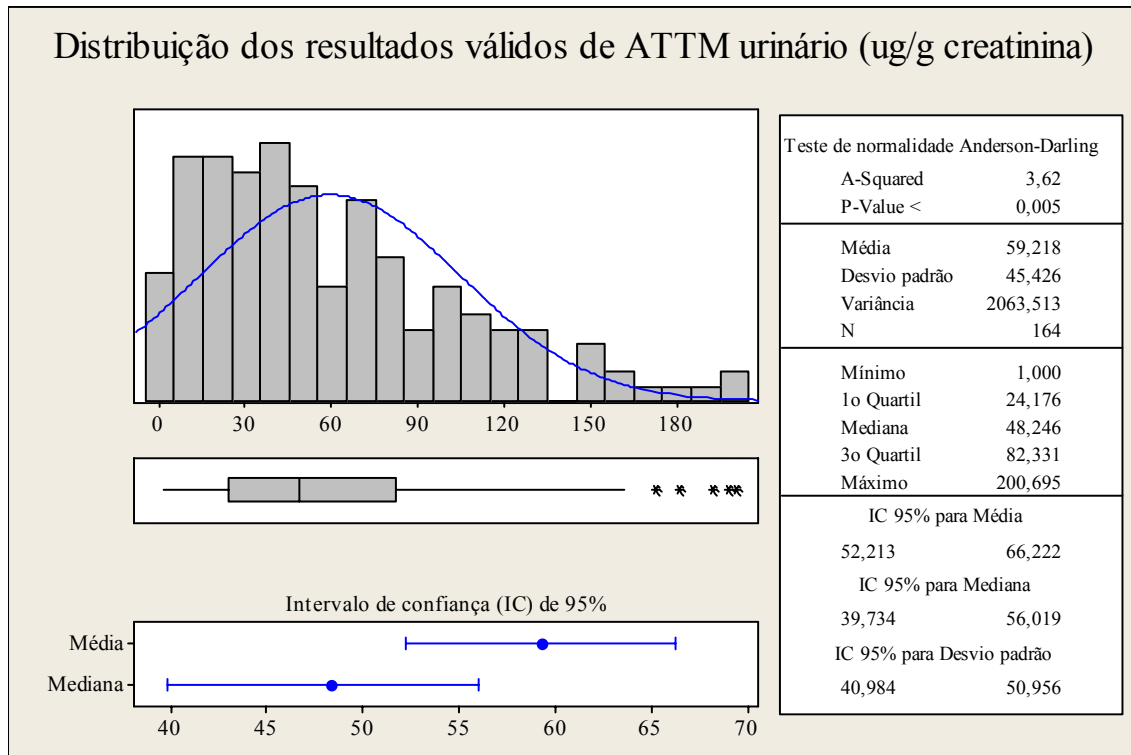


Figura 4.7 – Gráfico de distribuição dos resultados de ATTM urinário ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de creatinina) sem *outliers*.

Os valores de média e mediana calculados para os resultados de ATTM urinário das amostras analisadas estão de acordo com resultados encontrados na literatura para grupos controle em estudos ocupacionais e para não fumantes em estudos que comparam a relação desse analito com a exposição à fumaça de cigarro. Os valores encontrados na literatura para esses grupos variam bastante, conforme exemplos mostrados na Tabela 4.10. Os resultados também estão próximos aos de estudos realizados com grupos de crianças e adolescentes não expostos a fontes diretas de emissão de benzeno, como os de Schroijsen *et al.*(2008), que citam valor médio de 88 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de creatinina e Buthbumrung *et al.*(2008), que encontrou valores médios de 120 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de creatinina para crianças residentes em área urbana e 60 $\mu\text{g.g}^{-1}$ de creatinina para as de área rural. A variação de resultados de ATTM urinário entre os diferentes estudos para grupos com características semelhantes pode ser explicada devido ao fato do ATTM urinário ser influenciado, além da exposição ao benzeno, por hábitos pessoais como alimentação, exposição à fumaça de cigarro e outros fatores ambientais, localização de residência.

Tabela 4.10 – Exemplos de concentrações de ATTM urinário encontrados na literatura.

Grupo	Concentração ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de creatinina)	Autor
Não Fumantes	10	Menezes <i>et al.</i> (2008)
Controle	39	Manini <i>et al.</i> (2008)
Crianças e adolescentes	88	Schroijsen <i>et al.</i> (2008)
Criança área urbana	120	Buthbumrung <i>et al.</i> (2008)
Criança área rural	60	
Controle	40	Chanvaivit <i>et al.</i> (2007)
Controle em área urbana	100	Lin <i>et al.</i> (2006)
Controle em área rural	40	
Não fumantes	240	Wiwanitkit <i>et al.</i> (2005)

4.2.1 Avaliação dos resultados de ATTM por Sítio de amostragem

A análise de resultados por sítio de amostragem também foi realizada considerando amostragem única. A estatística descritiva referente aos resultados agrupados por sítios está apresentada na Tabela 4.11.

Para avaliar a variabilidade dos resultados, as concentrações de ATTM urinário obtidas por sítio de amostragem também foram submetidas a teste de variância. Os resultados estão expostos na Figura 4.8.

Tabela 4.11 – Estatística descritiva para os resultados de ATTM urinário ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de creatinina) por sítio de amostragem.

Local	N	Média	Erro Padrão	Desvio Padrão	Valor Mínimo	1º Quartil	Mediana	3º Quartil	Valor Máximo
Sítio 1	44	65,7	7,8	51,7	1,0	20,2	51,5	108,0	198,0
Sítio 2	54	68,5	6,2	45,2	1,0	34,2	62,8	93,8	200,0
Sítio 3	37	34,8	5,8	35,1	1,0	13,1	24,8	44,5	162,0
Sítio 4	29	63,4	7,0	37,8	9,3	37,8	58,1	79,2	156,0

Sítio 1 = Com influência direta das coquearias.

Sítio 2 = Com influência direta das coquearias e de tráfego automotivo.

Sítio 3 = Com influência de tráfego automotivo.

Sítio 4 = Considerado como “branco”.

O Teste de Levene entre os diferentes sítios de amostragem apresentou valor de $p = 0,027$ caracterizando que há diferença estatística significativa entre os sítios de amostragem ao nível de confiança de 95%. Outros autores que tentaram fazer essa diferenciação na concentração de ATTM urinário por estudo de diferentes sítios dentro de uma mesma região não conseguiram distinguir diferença estatística significativa em seus resultados, como nos estudos realizados por Schroijsen *et al.* (2008) e Wilhelm *et al.* (2007). Entre os sítios propostos por Schroijsen *et al.* (2008) estavam áreas urbanas, áreas rurais e área de incineradores. Enquanto que Wilhelm *et al.* (2007) avaliaram áreas submetidas a emissões de diferentes segmentos industriais, entre as quais havia uma região de coquearias, e os resultados foram comparados com aqueles obtidos em uma região considerada como branco. A diferença entre a pesquisa de Wilhelm *et al.* (2007) e essa pesquisa é que eles utilizaram como voluntários apenas crianças e adolescentes enquanto que nesse trabalho foram avaliados apenas indivíduos adultos.

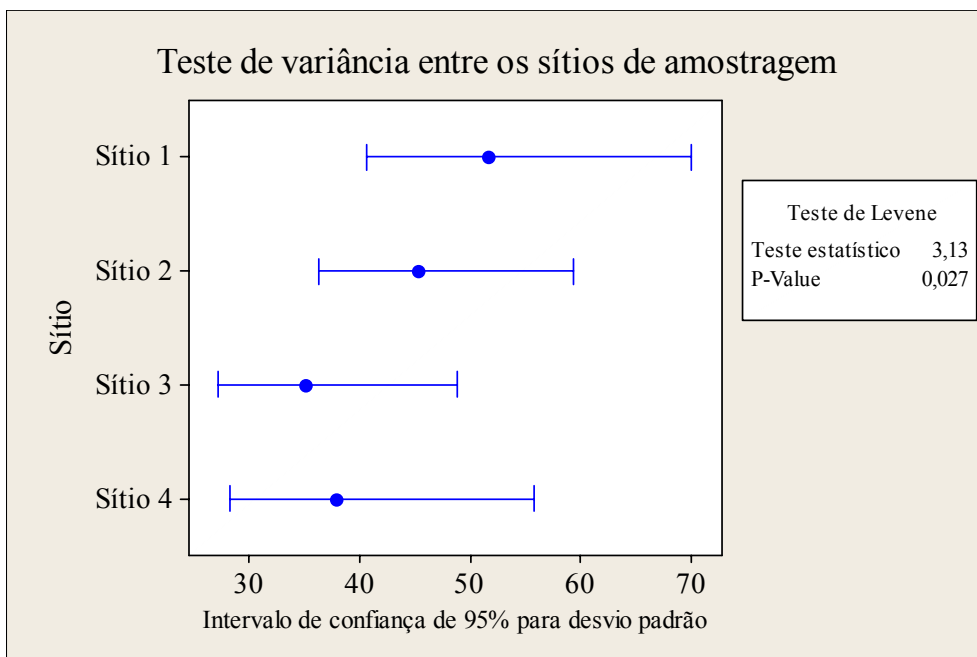


Figura 4.8 – Teste de variância para os resultados de ATTM urinário ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de creatinina) entre os diferentes sítios de amostragem.

Realizando um teste de dispersão para os resultados dos sítios de amostragem foram calculados novos dados *outliers* para cada sítio, conforme mostrado na Figura 4.9. Assim, foram recalculadas a estatística descritiva básica, conforme Tabela 4.12, e foi realizado novo teste de variância conforme gráfico da Figura 4.10.

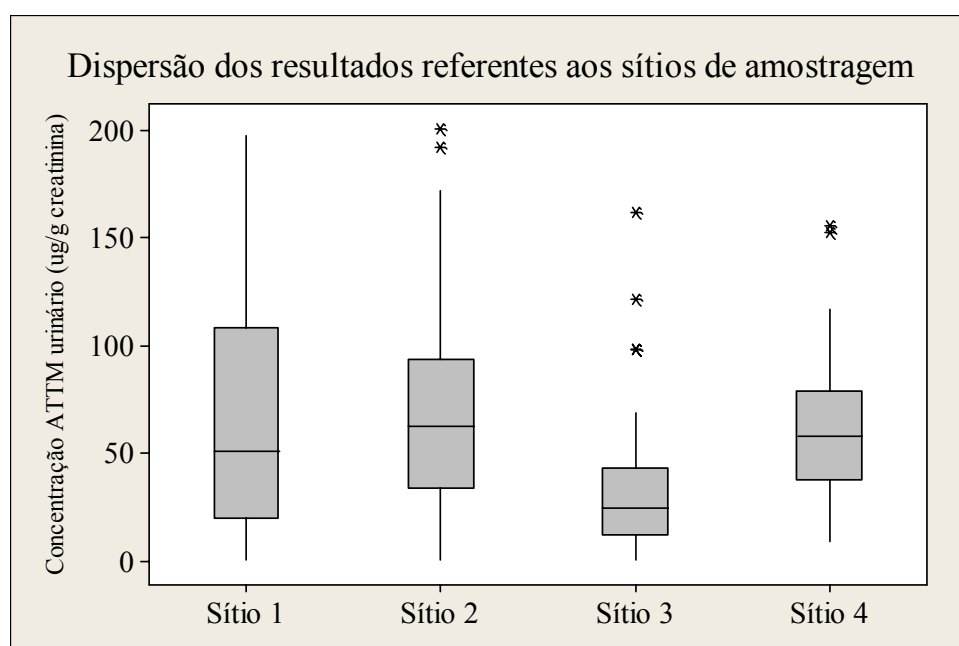


Figura 4.9 – Dispersão dos resultados de ATTM urinário ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de creatinina) para os diferentes sítios de amostragem, evidenciando os *outliers* de cada grupo.

Tabela 4.12 – Estatística Estatística descritiva para os resultados de ATTM urinário ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de creatinina) por sítio de amostragem, sem *outliers* dos sítios.

Local	N	Média	Erro Padrão	Desvio Padrão	Valor Mínimo	1º Quartil	Mediana	3º Quartil	Valor Máximo
Sítio 1	44	65,7	7,8	51,7	1,0	20,2	51,5	108,0	198,0
Sítio 2	51	61,4	4,9	35,2	1,0	31,9	59,5	85,6	146,0
Sítio 3	32	23,0	2,6	14,9	1,0	12,5	53,7	33,1	55,3
Sítio 4	27	56,6	5,6	29,2	9,34	37,5	37,5	78,0	117,0

Sítio 1 = Com influência direta das coquearias.

Sítio 2 = Com influência direta das coquearias e de tráfego automotivo.

Sítio 3 = Com influência de tráfego automotivo.

Sítio 4 = Considerado como “branco”.

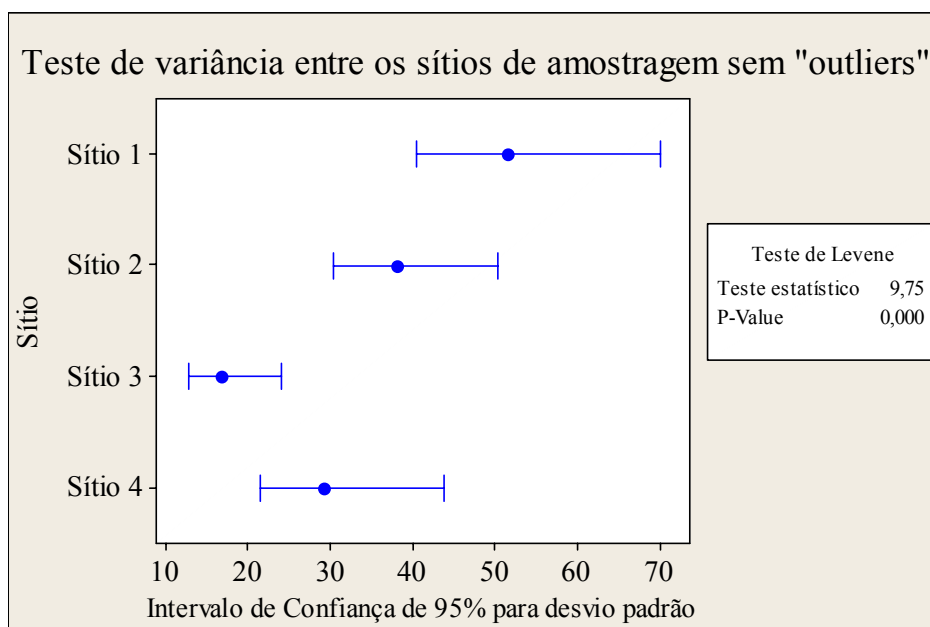


Figura 4.10 – Teste de variância para os resultados de ATTM urinário ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de creatinina) entre os diferentes sítios de amostragem, sem os dados *outliers*.

Conforme apresentado na Figura 4.10, o teste de variância entre os sítios de amostragem sem seus resultados considerados *outliers* confirma que há diferença estatística significativa entre os sítios de amostragem. Porém, diferente do esperado, o sítio que apresentou menores valores foi o Sítio 3 e não o Sítio 4 que é o considerado como “branco”. Isso pode ser explicado pelo fato de o questionário não considerar onde as pessoas estavam durante o dia, ou quais locais freqüentaram nas últimas horas, apesar de no momento da amostragem elas estarem no Sítio considerado “branco”. Devido a esse resultado, foram realizados testes de variância específicos entre os Sítios 1, 2 e 3 com o

Sítio 4. Estes testes mostraram que, para intervalo de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$), tanto o Sítio 1 ($p=0,012$) quanto o Sítio 3 ($p=0,001$) apresentaram diferença estatística significativa em relação ao Sítio 4, porém em direções opostas, conforme pode ser visto nas Figuras 4.11 e 4.12, respectivamente. Para o Sítio 2 ($p=0,270$) não foi observada essa diferença.

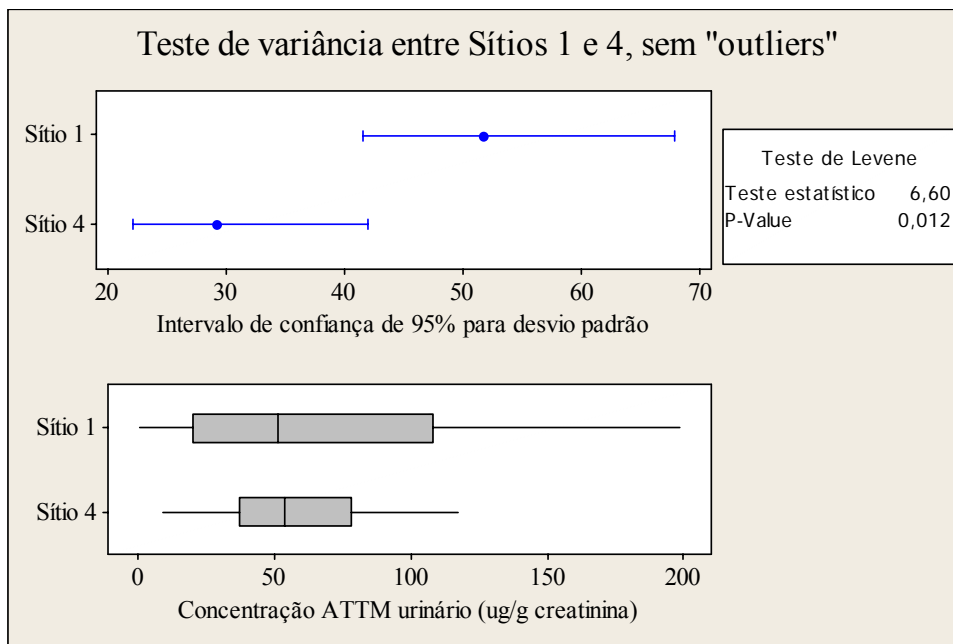


Figura 4.11 – Teste de variância entre os Sítios 1 e 4, sem os dados considerados *outliers*.

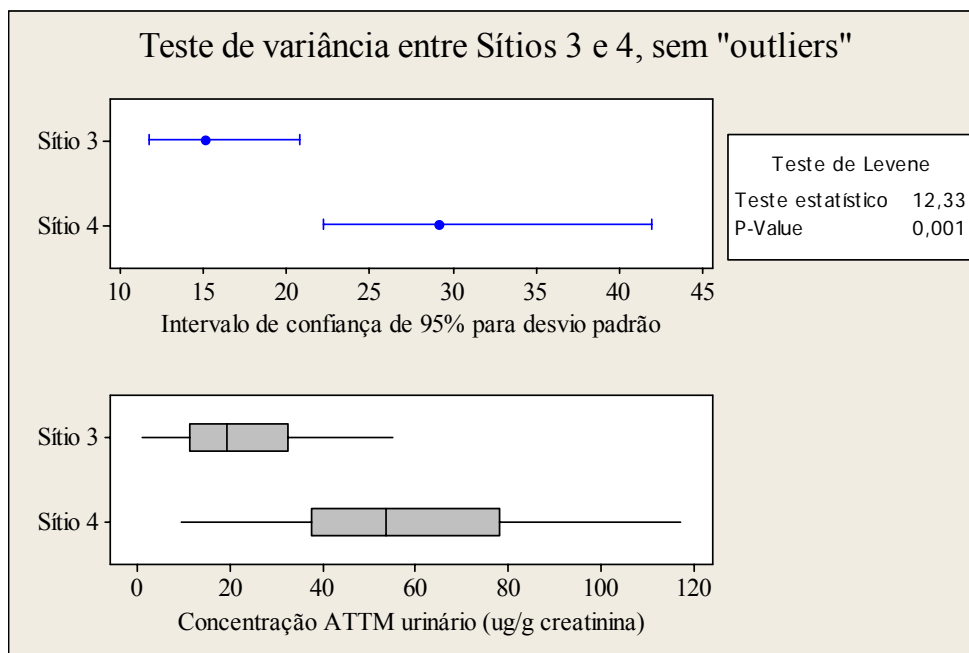


Figura 4.12 – Teste de variância entre os Sítios 3 e 4, sem os dados considerados *outliers*.

Considerando os Sítios selecionados para serem avaliados, era esperada a possibilidade de existência de diferença estatística significativa entre o Sítio 1, que é o mais atingido pelas emissões das coqueiras, e o Sítio 4, que foi considerado como branco. O fato do Sítio 2, que também sofre emissões das coqueiras, não ter apresentado diferença estatística significativa em relação ao Sítio 4 pode ser explicada ao se analisar a Figura 3.2 (direção e velocidade dos ventos). Nessa figura é possível observar que os ventos predominantes ocorrem preferencialmente na direção do Sítio 1 e que em direção ao Sítio 2 os ventos ocorrem com intensidade muito menor. Isso mostra que as emissões das coqueiras atingem o Sítio 1 de forma muito mais efetiva que o Sítio 2, o que ficou evidenciado pelos resultados de ATTM urinário dos 2 sítios, visto que a outra fonte para o Sítio 2, emissões automotivas, não influenciou nos resultados de ATTM urinário nessa pesquisa, conforme pode ser visto em relação aos resultados encontrados para o Sítio 3.

O Sítio 3 foi considerado sofrer mais influência de emissões automotivas devido a sua localização próxima a uma rodovia muito movimentada. Mas, diferente do esperado, para as amostras analisadas essa fonte de emissão não influenciou nas concentrações de ATTM urinário encontradas. Ao contrário, foi observada uma diferença estatística significativa entre o Sítio 3 e o Sítio 4, “branco”, mas de maneira inversa ao que se esperava pois, os resultados encontrados para o “branco” foram maiores que os encontrados no sítio que se propunha avaliar as emissões automotivas. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de ATTM urinário das amostras coletadas no Sítio 2, que recebe as emissões devido ao tráfego e também das coqueiras, e aquelas de um sítio considerado “branco”, confirmando que nessa pesquisa as emissões automotivas não influenciaram nos resultados de ATTM urinário.

Muitos trabalhos encontrados na literatura apresentam resultados que permitem a diferenciação entre grupos que recebem emissões de veículos, ou seja, expostos ao trânsito automotivo, e grupos controle (Manini *et al.*, 2008; Manini *et al.*, 2006; Fustinoni *et al.*, 2005; Navasumrit *et al.*, 2005). Porém, os grupos expostos considerados por esses autores são, normalmente, trabalhadores como motoristas, policiais de trânsito, vendedores ambulantes, e até mesmo vendedores de lojas situadas em avenidas muito movimentadas, que ficam continuamente expostos à essa fonte. Os Sítios 2 e 3 são áreas onde o trânsito de automóveis é mais acentuado que nos outros sítios, porém todos os quatro sítios estão localizados na área urbana da cidade. Em outras pesquisas, como a de Schroijsen *et al.* (2008), não foi possível fazer diferenciação em relação ao ATTM urinário entre indivíduos

residentes em sítios dentro de uma mesma cidade sem se considerar alguma fonte de emissão mais específica, como um efluente industrial, por exemplo.

A seleção dos bairros para divisão da área pesquisada em sítios ocorreu, principalmente, de acordo com a divisão geográfica da área e da direção preferencial dos ventos da região. Talvez fosse necessário avaliar situações mais pontuais, como por exemplo, o número de postos de combustíveis na região. Dessa forma, a seleção do sítio considerado como branco pode ter sido considerada de forma equivocada. Outro fato que pode ter influenciado nos resultados é o fato de as coletas no Sítio 4 terem ocorrido sempre no período da tarde. Alguns autores avaliaram amostras de voluntários coletadas na parte da manhã e no final do dia, encontrando maiores teores de ATTM urinário no final do dia para os mesmos voluntários (Buthbumrung *et al.*, 2008; Chanvaivit *et al.*, 2007). Nessa pesquisa o horário de coleta das amostras não foi considerado.

4.2.2 Avaliação de resultados de ATTM entre fumantes e não fumantes

Já foi comprovado em diversas pesquisas (Menezes *et al.*, 2008; Scherer *et al.*, 2007; Wiwanitkit, 2005) que o hábito de fumar interfere nos resultados de ATTM urinário. Para descartar a possibilidade de erros de interpretação dos resultados os voluntários foram caracterizados quanto a esse hábito. O gráfico de dispersão dos dados referente aos dois grupos, fumantes e não fumantes, construído com a ferramenta *Boxplot*, está exposto na Figura 4.13. Através dessa ferramenta também foram calculados os dados suspeitos, *outliers*, que se encontravam no limite superior da dispersão. Para análises estatísticas entre os dois grupos, foram consideradas duas situações. Na primeira, todos os dados discrepantes, *outliers*, tanto os do grupo Fumantes como os do grupo Não Fumantes, foram descartados. Porém, visto que o hábito de fumar causa elevação considerável nos teores de ATTM urinário, e que a eliminação desses resultados poderia culminar em uma descaracterização desse grupo, que é composto apenas por indivíduos declarados fumantes, foi considerada uma segunda situação, onde os *outliers* para o grupo Fumantes não foram descartados, sendo justificados pelo consumo de cigarros. Os resultados da estatística descritiva estão expressos na Tabela 4.13 e os dos testes de variância nas Figuras 4.14 e 4.15.

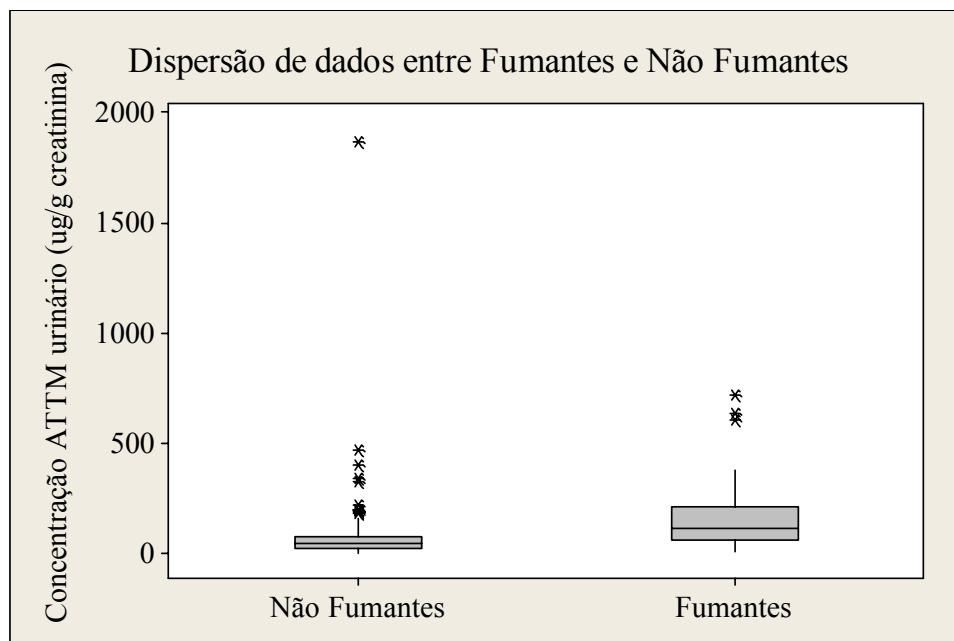


Figura 4.13 – *Boxplot* dos dados agrupados em fumantes e não fumantes.

Tabela 4.13 – Estatística descritiva para os resultados de ATT_M urinário ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de creatinina) para os grupos Fumantes, Fumantes sem *outliers* e Não Fumantes sem *outliers*

Grupo	N	Média	Erro Padrão	Desvio Padrão	Valor Mínimo	1° Quartil	Mediana	3° Quartil	Valor Máximo
F	20	197,0	48,3	216	6,8	63,1	117	211,0	723,0
F sem OL	16	99,0	15,7	63,0	6,8	55,7	98,5	143,0	218,0
NF sem OL	126	48,2	3,1	35,2	1,0	20,4	39,4	68,3	153,0

F = Fumantes NF = Não Fumantes OL = *outliers*

Os resultados do Teste de Levene para as duas situações expostas nas Figuras 4.14 e 4.15, indicam que há diferença estatística significativa entre os grupos Fumantes e Não Fumantes ao nível de confiança de 95%, apesar de na situação da Figura 4.15, que desconsidera os *outliers* apenas do grupo Não Fumantes, essa diferença ser mais significativa. Essa diferença já era esperada, visto que já é comprovado que a fumaça do cigarro possui benzeno em sua composição. Esses resultados estão de acordo com outras pesquisas nas quais também foi encontrada correlação entre concentrações de ATT_M urinário e hábito de fumar (Manini *et al.*, 2008; Menezes *et al.*, 2008; Scherer *et al.*, 2007; Wiwanitkit, 2005; Coutrim, 1998).

Uma boa forma de qualificar os indivíduos como fumante ou não fumante, e eliminar dúvidas, é quantificar o teor de nicotina em fluidos biológicos dos voluntários. Porém, isso não foi feito nessa pesquisa.

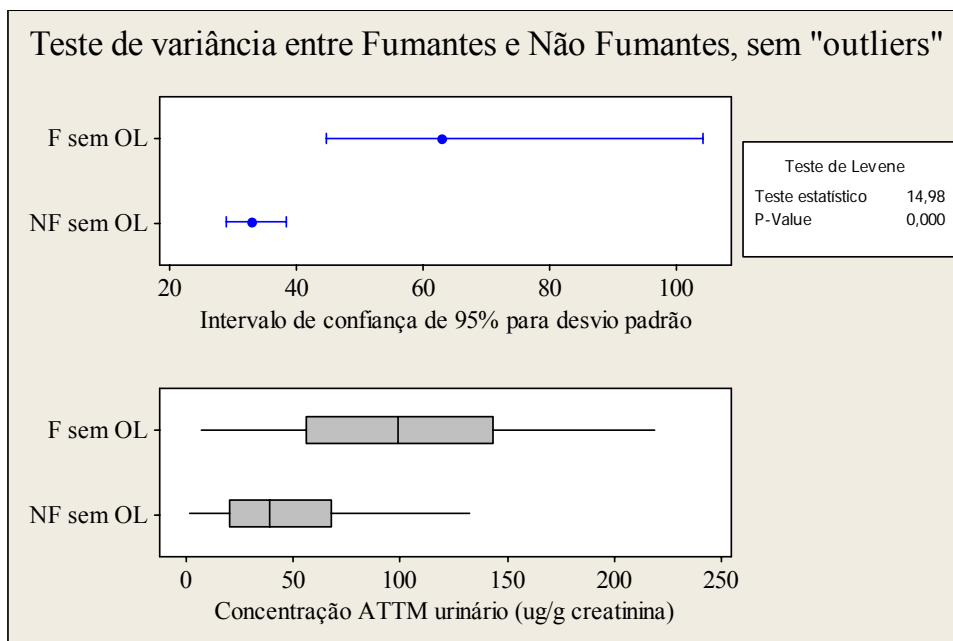


Figura 4.14 – Teste de variância entre Fumantes e Não Fumantes, desconsiderando todos *outliers* calculados para os dois grupos. (Legenda: F sem OL – Fumantes sem *outliers*. NF sem OL – Não Fumantes sem *outliers*).

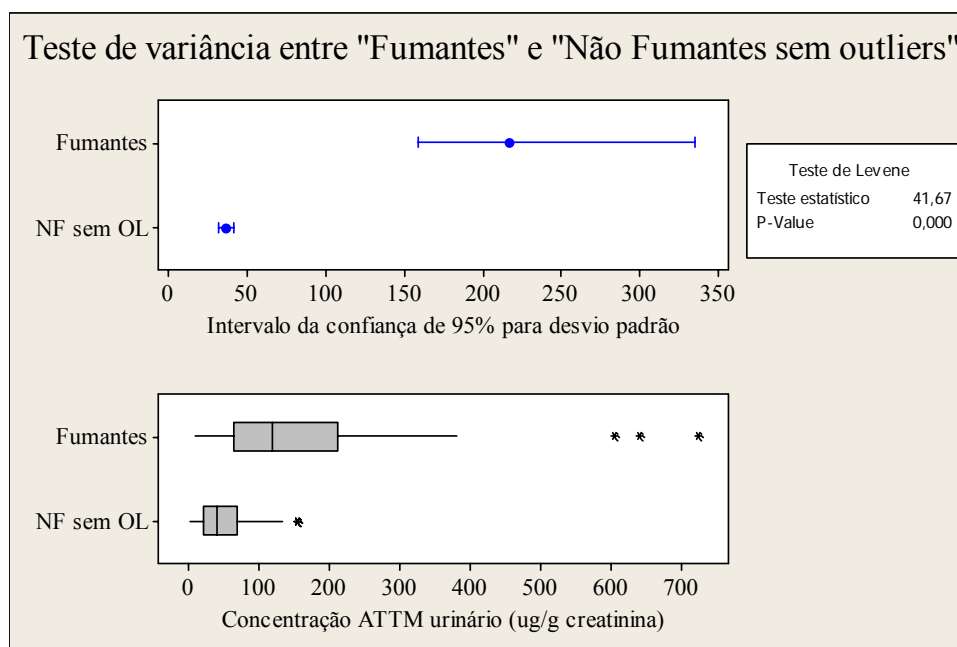


Figura 4.15 – Teste de variância entre Fumantes e Não Fumantes, desconsiderando os *outliers* apenas do grupo Não Fumantes (Legenda: NF sem OL – Fumantes sem *outliers*).

4.2.3 Relação entre ATTM urinário e gênero

Também foi realizada uma comparação de resultados entre voluntários do sexo feminino e masculino para se avaliar se o gênero pode influenciar nas concentrações de ATTM urinário. Os resultados da estatística descritiva básica para esses grupos estão na Tabela 4.14. Foram realizados testes de variância entre os grupos Feminino e Masculino, ambos Não Fumantes, cujo $p = 0,085$, para intervalo de confiança de 95%, e entre os grupos Feminino e Masculino, ambos Fumantes.

Tabela 4.14 – Estatística descritiva resultados de ATTM urinário ($\mu\text{g.g}^{-1}$ de creatinina) entre gêneros, desconsiderando os dados *outliers*.

Grupo	N	Média	Erro Padrão	Desvio Padrão	Valor Mínimo	1° Quartil	Mediana	3° Quartil	Valor Máximo
FNF	101	56,6	3,8	42,3	1,0	20,6	47,0	80,7	166,0
MNF	26	48,3	5,7	33,6	1,0	21,0	39,9	69,4	133,0
F F	11	275,0	79,4	263,0	6,8	78,5	147,0	604,0	723,0
M F	9	101,0	24,2	72,7	11,3	35,7	94,1	162,0	218,0

FNF = Feminino Não Fumante MNF= Masculino Não Fumante
F F = Feminino Fumante M F = Masculino Fumante

Foram realizados testes de variância entre os voluntários do sexo feminino e masculino considerando o fato de serem ou não fumantes. De acordo com os resultados mostrados nas Figuras 4.16 e 4.17, ao nível de confiança de 95% não foi encontrada diferença estatística significativa entre os gêneros, nem considerando os fumantes. Porém, essa diferença entre gêneros passa a ser significativa tanto entre fumantes, $p = 0,074$, e não-fumantes, $p = 0,085$, se considerarmos um nível de confiança de 90% ($\alpha=0,10$), de acordo com os valores de p encontrados.

Esses resultados confirmam pesquisas encontradas na literatura que também mostram tendências para maiores concentrações de ATTM urinário entre voluntários do sexo feminino em relação ao masculino. Alguns autores explicam essa diferença devido a um maior coeficiente de partição sangue/ar e a um metabolismo de 23 a 26% mais rápido de benzeno entre as mulheres (Aprea *et al.*, 2008, Cocco *et al.*, 2003, MeliKian *et al.*, 2002).

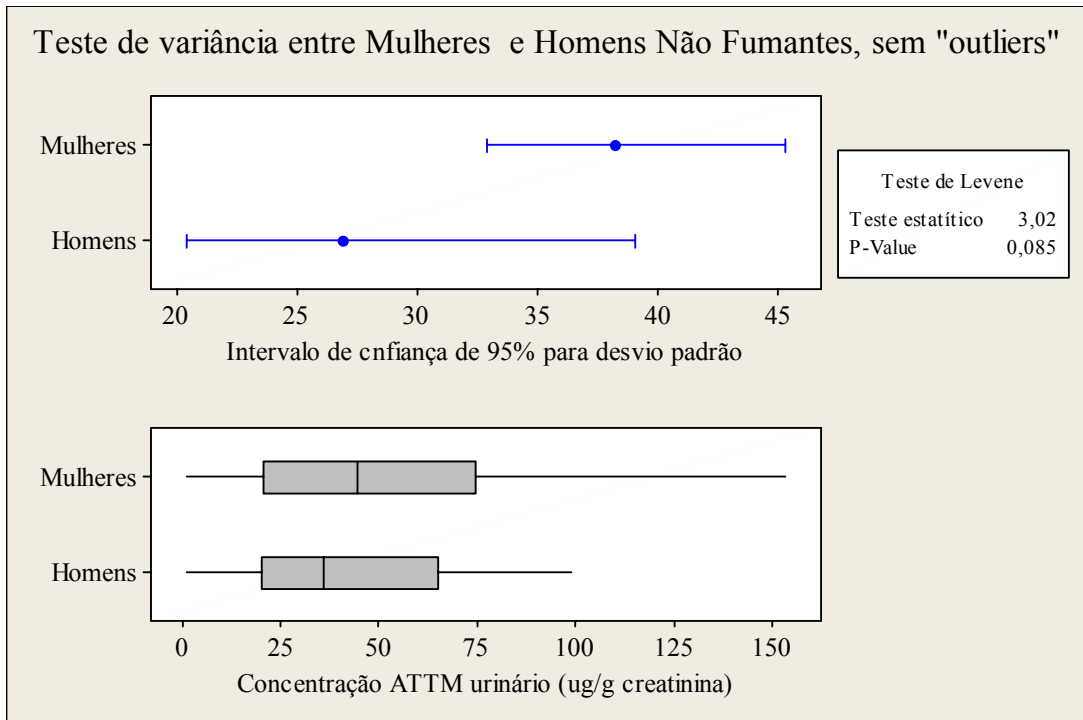


Figura 4.16 – Teste de variância entre resultados de ATTm urinário ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de creatinina) de voluntários do sexo feminino e masculino não-fumantes.

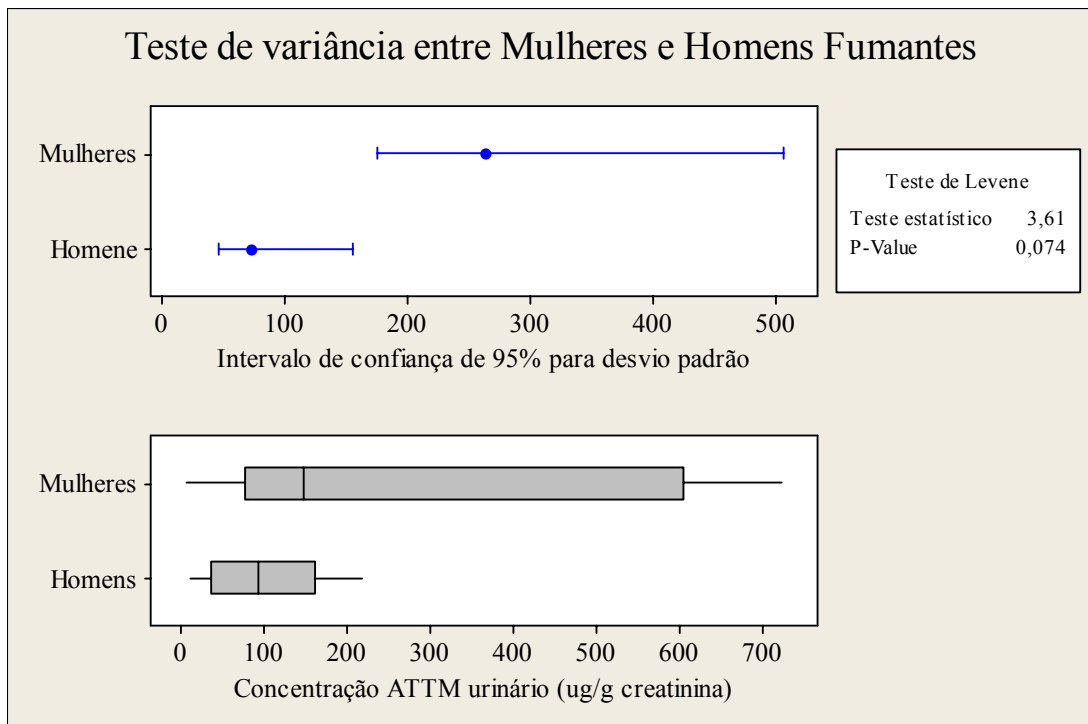


Figura 4.17 – Teste de variância entre resultados de ATTm urinário ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de creatinina) de voluntários do sexo feminino e masculino que são fumantes.

4.2.4 Relação entre ATTM urinário e benzeno atmosférico

Nessa pesquisa não foi possível determinar as concentrações de benzeno atmosférico nas regiões estudadas. Porém, muitos autores quando avaliam algum IBE ao benzeno também utilizam alguma técnica de quantificação do benzeno atmosférico a fim de se tentar relacionar as concentrações de ambas as espécies. A Portaria N° 34/2001 do Ministério do Trabalho e Emprego (MTE, 2001), em seu protocolo de utilização de indicador biológico de exposição ocupacional ao benzeno, traz uma tabela de correlações entre as concentrações de benzeno no ar e as concentrações urinárias de ATTM correspondentes. Essa mesma Portaria recomenda considerar o valor médio de creatinina de 1,2mg de creatinina.L⁻¹ de urina para efeitos de cálculo. O menor valor de correlação existente nessa tabela é de 1,3mg de ATTM.g⁻¹ creatinina (1,6mg ATTM.L⁻¹ urina) correspondendo a 2,0mg.m⁻³ de benzeno no ar (0,6ppm). Considerando os baixos valores de ATTM urinário encontrados nesse trabalho, não é possível fazer correlações com prováveis concentrações de benzeno atmosférico a partir da tabela da Portaria N° 34/2001 (MTE, 2001).

Para se ter noção dos valores de benzeno atmosférico que correspondem a baixas concentrações de ATTM urinário foi montada a Tabela 4.15 com alguns trabalhos encontrados na literatura que quantificaram os dois analitos. Pelos resultados apresentados nesta tabela é possível observar que a relação entre as concentrações atmosféricas de benzeno e ATTM urinário não são lineares, dependendo de cálculos mais apurados para se encontrar uma constante de correlação. Porém, observando quão baixas são as concentrações de benzeno atmosférico, fica evidente que legislações trabalhistas não abrangem parâmetros ambientais suficientemente sensíveis para o benzeno.

Tabela 4.15 – Relação de concentrações de ATTm urinário e benzeno atmosférico de autores que quantificaram os dois analitos.

Concentração ATTm urinário	Benzeno Atmosférico	Grupo Avaliado	Autor
0,055 mg.g ⁻¹ Cr	12,9 µg.m ⁻³	Controle (monges e freiras)	
0,095 mg.g ⁻¹ Cr	22,6 µg.m ⁻³	Vendedor de Roupa	Navasumrit <i>et al.</i> , 2005
0,080 mg.g ⁻¹ Cr	28,2 µg.m ⁻³	Vendedor de Rua	
52 µg.L ⁻¹	6 µg.m ⁻³	Controle	
147 µg.L ⁻¹	22 µg.m ⁻³	Policiais de Transito	Fustinoni, <i>et al.</i> , 2005
95 µg.L ⁻¹	61 µg.m ⁻³	Frentistas	
1,08 µmol.L ⁻¹	4,07 ppb	Controle	
12,13 µmol.L ⁻¹	1,17 ppm	Trabalhadores fábrica sapatos	Kim <i>et al.</i> , 2006
171 µg.g ⁻¹ Cr	0,044 mg.m ⁻³	Frentistas	Carrieri <i>et al.</i> , 2006
114 µg.g ⁻¹ Cr	5,9 µg.m ⁻³	Motoristas taxi	Manini <i>et al.</i> , 2006
0,06 mg.g ⁻¹ Cr	8,1 µg.m ⁻³	Crianças área Rural	
0,12 mg.g ⁻¹ Cr	17,7 µg.m ⁻³	Crianças área Urbana	Ruchirawat <i>et al.</i> , 2007
41,8 µg.g ⁻¹ Cr	6,1 µg.m ⁻³	Policiais de Trânsito	Manini <i>et al.</i> , 2008

Cr = creatinina.

4.2.5 Análise dos dados considerados *outliers*

A análise de *outliers* foi realizada considerando todas as amostras como válidas. Todos os dados classificados como *outliers* encontravam-se no limite superior da distribuição. Ao todo 15 resultados foram desconsiderados, 13 da primeira campanha e 2 da segunda, sendo dois resultados do Sítio 1, três do Sítio 2, cinco do Sítio 3 e cinco do Sítio 4.

Dentre os 15 voluntários que apresentaram resultados de ATTm *outliers*, cinco são fumantes, dois são pessoas que declararam conviver com fumantes. Todos os oito

voluntários restantes afirmaram consumir bebidas prontas, três relataram fazer uso de algum medicamento e nenhum deles relatou problemas de rim ou fígado. Desses oito, sete são do sexo feminino e apenas um do sexo masculino.

O maior valor de ATTM urinário encontrado foi de $1868 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ creatinina, sendo o único resultado maior que $1000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ creatinina dessa pesquisa. Este voluntário também participou da segunda campanha sendo que o valor encontrado foi de $468 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ creatinina. Apesar dos resultados encontrados para esse voluntário estarem bem acima das médias para as duas campanhas, não há indicativo para os altos teores nas informações dos questionários, pois o doador não é fumante, não convive com fumante, não faz uso de alimentos enlatados, não possui doenças relacionadas ao fígado e rim e não fazia uso de medicamento na primeira campanha, apesar dele declarar fazer uso de bebidas prontas. Esse alto valor de ATTM urinário pode ser atribuído a algum fator de característica própria do metabolismo deste indivíduo o que poderia ser mais bem definido através de uma avaliação mais detalhada e melhor explicada com ajuda de uma avaliação médica individualizada.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

O método otimizado e validado nessa pesquisa apresentou sensibilidade suficiente para quantificar baixas concentrações de ATTM urinário. O limite de detecção do método foi melhor do que muitos trabalhos encontrados na literatura.

Não foi encontrada diferença estatística com relação às concentrações de ATTM urinário ao se comparar os resultados das duas campanhas de amostragem, indicando que o fator sazonalidade não diferencia esses grupos. Mas, nessa pesquisa foi possível encontrar diferença estatística significativa entre os indivíduos avaliados (não expostos ocupacionalmente ao benzeno) com relação ao hábito de fumar (fumante e não fumantes) e quanto ao sexo (feminino e masculino). Também foi possível observar diferença estatística com relação ao teor de ATTM urinário dos indivíduos residentes em áreas sob influência das emissões da coqueria daqueles residentes em uma área que não sofre influência direta dessas emissões, ainda que esses resultados sejam suficientemente baixos quando comparados com vários resultados de grupos controle encontrados na literatura.

Os valores de concentração de ATTM urinário encontrados estão muito abaixo dos limites legais estabelecidos para exposição ocupacional, indicando que as leis ocupacionais, únicas existentes no Brasil em relação a níveis de exposição ao benzeno, não são sensíveis às concentrações de benzeno existentes em área não ocupacionais.

REFERÊNCIAS

- ABIQUIM, Associação Brasileira de Indústria Química, http://www.abiquim.org.br/pdfs/ele_50_impexp_2008.pdf (acessado em 20/04/2009).
- ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas. ABNT NBR ISSO/IEC 17025. Requisitos Gerais para Competência de Laboratório de Ensaio de Calibração, 2005.
- ALESSIO L, BERLIN A, TOFFOLETTO F, GHEZZI I. Reability of urinary creatinine as a parameter used to adjust of urinary biological indicators. *Int Arch Occup Environ Health*, v.55, p.99-106, 1985.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 899 de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.
- APREA, C., SCIARRA, G., BOZZI, N., PAGLIANTINI, M., PERICO, A., BAVAZZANO, P., LEANDRI, A., CARRIERI, M., SCAPELLATO, M. L., BETTINELLI, M., BARTOLUCCI, G. B., Reference Values of Urinary *Trans,trans*-muconic Acid: Italian Multicentric Study. *Arch Environ Contam Toxicol*, v.55, p.329–340, 2008.
- ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. 2007 CERCLA Priority List of Hazardous Substances That Will Be the Subject of Toxicological Profiles and Support Document, 2007.
- BARBIERI, A., SABATINI, L., ACCORSI, A., RODA, A., VIOLANTE, F. S., Simultaneous determination of *t,t*-muconic, *S*-phenylmercapturic and *S*-benzylmercapturic acids in urine by a rapid and sensitive liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry method. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*,v.18, p.1983–1988, 2004.
- BURATTI, M., FUSTINONI, S., COLOMBI, A., Fast liquid chromatography determination of urinary *trans, trans* muconic acid. *J Chromatogr B*, v.677, p.257-263, 1996.
- BUTHBUMRUNG, N., MAHIDOL, C., NAVASUMRIT, P., PROMVIJIT, J., HUNSONTI, P., AUTRUP, H., RUCHIRAWAT, M., Oxidative DNA damage and influence of genetic polymorphisms among urban and rural schoolchildren exposed to benzene. *Chemico-Biological Interactions*, v. 172, p. 185-194, 2008.
- CAPLETON, A. C., LEVY, L. S., An overview of occupational benzene exposures and occupational exposure limits in Europe and North America. *Chemico-Biological Interactions*, v.153–154, p.43–53, 2005.
- CARDOSO, M. H. W. M., NÓBREGA, A. W., ABRANTES, S., Efeito da resposta cromatográfica acentuada e induzida pela matriz: estudo de caso em tomates. *Revista Analytica*, nº34, p.48-55, 2008.

- CARRIERI, M., BONFIGLIO, E., SCAPELLATO, M. L., MACCÀ, I., TRANFO, G., FARANDA, P., PACI, E., BARTOLUCCI, G. B., Comparison of exposure assessment methods in occupational exposure to benzene in gasoline filling-station attendants. *Toxicology Letters*, v.162, p.146–152, 2006.
- CESTESB, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental, Ficha de Informação de Produto Químico – Benzeno. Disponível em:
http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=BE NZENO (acessado em 20/04/2009).
- CESTESB, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental. Disponível em :
http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/produtos/ECO_HELP.htm (acessado em 06/02/2009).
- CHAKROUN, R., FAIDI, F., HEDHILI, A., CHARBAJI, K., NOUAIGUI, H., LAIBA, M. B., Inhalant Abuse Detection and Evaluation in Young Tunisians. *J Forensic Sci*, v.53, n.1, 2008.
- CHANVAIVIT, S., NAVASUMRIT, P., HUNSONTI, P., AUTRUP, H., RUCHIRAWAT, M., Exposure assessment of benzene in Thai workers, DNA-repair capacity and influence of genetic polymorphisms. *Mutation Research*, v. 626, p. 79–87, 2007
- CNS, Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde. Resolução nº 196. de 10 de outubro de 1996. Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.
- COCCO, P., TOCCO, M. G., IBBA, A., SCANO, L., ENNAS, M. G., FLORE, C., RANDACCIO, F. S., *Trans,trans* -Muconic acid excretion in relation to environmental exposure to benzene. *Int Arch Occup Environ Health*, v.76, p.456–460, 2003.
- COSTA, Maria de Fátima Barroso da. Estudo da Aplicabilidade do Ácido *trans,trans*-Mucônico Urinário como Indicador Biológico de Exposição ao Benzeno. 126 folhas. Tese de Doutorado em Saúde Pública apresentada à Escola Nacional de Saúde Pública, 2001.
- COSTA, M. A. F. da, COSTA, M. F. da., Benzeno: uma questão de saúde pública. *Interciencia*, v. 27, n 4, p. 201-204, 2002.
- COUtrim, M. X., Desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação de indicador biológico de exposição ao benzeno. Tese de Doutorado. Instituto de Química, USP, São Paulo 1998.
- COUtrim, M. X., CARVALHO, L. R. F. DE, ARCURI, A. S. A., Avaliação dos métodos analíticos para a determinação de metabólitos do benzeno como potenciais biomarcadores de exposição humana ao benzeno no ar. *Química Nova*, v.23, n.5, p.653-663, 2000.

- DUCOS, P., GAUDIN, R., ROBERT, A., FRANCIN, J. M., MEIRE, C., Improvement in HPLC analysis of urinary trans,trans muconic acid, a promising substitute for phenol in assessment of benzene exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v.62, p.529-534, 1990.
- EPAQS, Expert Panel on Air Quality Standards: Benzene, 1994. Disponível em: <http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20060715141954/http://www.defra.gov.uk/environment/airquality/aqs/index.htm#fr> (acessado em 17/06/09).
- EUROPEAN PARLIAMENT, DIRECTIVE 2008/50/EC. Official Journal of the European Union, 11/6/2008, p.L 152/1 – 44.
- FUNDACENTRO, Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho, Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho / Ministério do Trabalho. Benzeno – Subsídios Técnicos à Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho. 2 ed. São Paulo: FUNDACENTRO: FUNDUNESP, 1995.
- FUNDACENTRO, Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho, Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho / Ministério do Trabalho. Acordo e Legislação sobre o Benzeno: 10 anos. São Paulo: FUNDACENTRO, 128 p., 2005.
- FUSTINONI, S., BURATTI, M., CAMPO, L., COLOMBI, A., CONSONNI, D., PESATORI, A. C., BONZINI, M., FARMER, P., GARTE, S., VALERIO, F., MERLO, D. F., BERTAZZI, P. A., Urinary *t,t*-muconic acid, *S*-phenylmercapturic acid and benzene as biomarkers of low benzene exposure. *Chemico-Biological Interactions*, v.153–154, p.253–256, 2005.
- IARC. International Agency for Research on Cancer, Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk to humans. Overall Evaluations of Carcinogenicity: an Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42. Lyon, France, 1987.
- IARC. International Agency for Research on Cancer, Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Some Industrial Chemicals and Dyes, vol. 29. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 1982.
- ICH, International Conference on Harmonization. Disponível em: <http://www.ich.org> (acessado em outubro/ 2008).
- ICH, International Conference on Harmonization. Guidance for Industry - Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, 1997.
- ICSC, International Chemical Safety Cards, Benzene, 2003. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/icsc/icsc/eics0015.htm> (acessado em 19/04/2009).
- INMETRO, Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial – Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos. DOQ-CGCRE-008, 2007.

- HARRIS, D.C., Análise Química Quantitativa. Sexta edição. Rio de Janeiro: Editora LTC, 2005.
- HIRABAYASHI, Y., YOON, B., LI, G., FUJII-KURIYAMA, Y., KANEKO, T., KANNO, J., INOUE, T., Benzen e-induced hematopoietic toxicity transmitted by AhR in wild-type mouse and nullified by repopulation with AhR-deficient bone marrow cells: Time after benzene treatment and recovery. *Chemosphere*, v.73, p. 290-294, 2008.
- JOHNSON, E. S., LANGARD, S., LIN, Y., A critique of benzene exposure in the general population. *Science of the Total Environment*, v.374, p.183–198, 2007.
- KIM, S., VERMEULEN, R., WAIDYANATHA, S., JOHNSON, B. A., LAN, Q., ROTHMAN, N., SMITH, M. T., ZHANG, L., LI, G., SHEN, M., YIN, M., RAPPAPORT, S. M., Using urinary biomarkers to elucidate dose-related patterns of human benzene metabolism. *Carcinogenesis*, v.27, n.4, p.772-781, 2006.
- KIRKELEIT, J., RIISE, T., BRATVEIT, M., MOEN, B. E., Increased risk of acute myelogenous leukemia and multiple myeloma in a historical cohort of upstream petroleum workers exposed to crude oil. *Cancer Causes Control*, v.19, p.13–23, 2008.
- KOUNIALIA, A., CIOLELLA, A., GONZALEZ-FLESCA, N., DUJARDINA, R., GEHANNON, J., BOIS, F. Y., Environmental benzene exposure assessment for parent–child pairs in Rouen, France. *The Science of the Total Environment*, v.308, p.73–82, 2003.
- LANÇAS, F. M., Extração em fase sólida. 1ª Edição, Ed. Rima, São Carlos-SP, 2004a, 93 páginas.
- LANÇAS, F. M., Validação de Métodos Cromatográficos de Análise. 1ª Edição, Ed. Rima, São Carlos-SP, 2004b, 62 páginas.
- LAPPONI, J. C., Estatística usando excel. Quarta edição. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2005.
- LEE, B., NEW, A., KOK, P., ONG, H., SHI, C., ONG, C., Urinary trans,trans Muconic Acid Determined by Liquid Chromatography: application in biological monitoring of benzene exposure. *Clinical Chemistry*, v.39, p.1788-1792, 1993.
- LEE, B. L., ONG, H. Y., ONG, Y. B., ONG, C.N., A sensitive liquid chromatographic method for the spectrophotometric determination of urinary trans,trans-muconic acid. *Journal of Chromatography B*, v.818, p.277–283, 2005.
- LIN, L., CHIUNG, Y., SHIH, J., SHIH, T., LIAO, P., Validation of an online dual-loop cleanup device with an electrospray ionization tandem mass spectrometry-based system for simultaneous quantitative analysis of urinary benzene exposure biomarkers *trans,trans*-muconic acid and *S*-phenylmercapturic acid. *Analytica Chimica Acta*, v.555, p.34–40, 2006.

- MACHADO, J.M.H., COSTA, D.F., CARDOSO, L.M., ARCURI, A., Alternativas e processos de vigilância em saúde do trabalhador relacionados à exposição ao benzeno no Brasil. *Ciência e Saúde Coletiva*, v.8, n. 4, p.913-921, 2003.
- MANINI, P., ANDREOLI, R., NIESSEN, W. M. A., Liquid chromatography–mass spectrometry in occupational toxicology: A novel approach to the study of biotransformation of industrial chemicals. *Journal of Chromatography A*, v.1058, p.21–37, 2004.
- MANINI, P., PALMA, G., ANDREOLI, R., POLI, D., MOZZONI, P., FOLESANI, G., MUTTI, A., APOSTOLI, P., Environmental and biological monitoring of benzene exposure in a cohort of Italian taxi drivers. *Toxicology Letters*, v.167, p.142–151, 2006.
- MANINI, P., PALMA, G., ANDREOLI, R., POLI, D., PetYX, M., CORRADI, M., MUTTI, A., APOSTOLI, P., Biological monitoring of low benzene exposure in Italian traffic policemen. *Toxicology Letters*, v.181, p.25–30, 2008.
- MARRUBINI, G., COCCINIB, T., MANZO, L., Direct analysis of urinary *trans,trans*-muconic acid by coupled column liquid chromatography and spectrophotometric ultraviolet detection: method applicability to human urine. *Journal of Chromatography B*, v.758, p.295–303, 2001.
- MARTINS, I., SIQUEIRA, M. E. P. B., Determinação do ácido *trans,trans*-mucônico em urina: validação de um método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.38, n.2, p.205-213, 2002.
- MARRUBINI, G., COCCINIB, T., MAESTRI, L., MANZO, L., Effect of sorbic acid administration on urinary *trans,trans*-muconic acid excretion in rats exposed to low levels of benzene. *Food and Chemical Toxicology*, v.40, p.1799–1806, 2002.
- MELIKIAN, A.A., QU Q., SHORE R., Personal exposure to different levels of benzene and its relationships to the urinary metabolites S-phenylmercapturic acid and *trans,trans*-muconic acid. *Journal of Chromatography B*, v.778, p.211–221, 2002.
- MENEZES, M., BALBÃO, M. S., SIQUEIRA, M. E. P. B DE, MARTINS, I., Influência do hábito de fumar na excreção urinária do ácido *trans, trans*-mucônico. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.44, n.3, 2008.
- MIKHEEV, M. I., Toward1 WHO-recommended occupational exposure limits. *Toxicology Letters*, v.77, p.183-187, 1995.
- MDIC, Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Disponível em <http://aliceweb.desenvolvimento.gov.br/> (acessado em Abril/2009).
- MS, Ministério da Saúde. Risco Químico: atenção à Saúde dos trabalhadores expostos ao benzeno. Ed. do Ministério da Saúde, Brasília, DF, 2006.

- MS, Ministério da Saúde. Normas de Vigilância da Saúde dos Trabalhadores expostos ao Benzeno, 2003. Disponível em: <http://www.opas.org.br/saudedotrabalhador/Arquivos/Sala181.pdf> (acessado em 06/02/2009).
- MTE, Ministério do Trabalho e Emprego. Portaria nº 3214 de 08 de Junho de 1978. Disponível em: http://www.mte.gov.br/legislacao/portarias/1978/p_19780608_3214.pdf (acessado em : 13/02/2009).
- MTE, Ministério do Trabalho - Secretária de Segurança e Saúde no Trabalho. Portaria nº 14, de 20 de dezembro de 1995. Brasília, 22 de dez de 1995, p. 21.865 e 21.866.
- MTE, Ministério do Trabalho e Emprego. Portaria nº 34, de 20 dez. 2001. Diário Oficial, Brasília, 27 de dez. de 2001. p. 260-261.
- NAVASUMRIT, P., CHANVAIVIT, S., INTARASUNANONT, P., ARAYASIRI, M., LAUHAREUNGPANYA, N., PARNLOB, V., SETTACHAN, D., RUCHIRAWAT, M., Environmental and occupational exposure to benzene in Thailand. *Chemico-Biological Interactions* v.153–154, p.75–83, 2005.
- NEGRI, S., BONO, R., MAESTRI, L., GHITTORI, S., IMBRIANI, M., High-pressure liquid chromatographic–mass spectrometric determination of sorbic acid in urine: Verification of formation of *trans,trans*-muconic acid. *Chemico-Biological Interactions*, v.153–154, p.243–246, 2005.
- NIOSH, National Institute for Occupational Safety and Health. Pocket Guide to Chemical Hazards. Publicação No. 2005-149, 2007.
- NIOSH, National Institute for Occupational Safety and Health. Criteria for a recommended standard: Occupational Exposure to Benzene. Publication No. NIOSH 74-137, 1974.
- NIOSH, National Institute for Occupational Safety and Health. Revised Recommendation for an Occupational Exposure Standard for Benzene, 1976.
- NIOSH, National Institute for Occupational Safety and Health. Registry of Toxic Effects of Chemical Substances: Benzene, 2009. Disponível em: <http://www.cdc.gov/niosh/rtecs/cy155cc0.html> (acessado em: 10/06/2009).
- PAULA, F.C. S de, SILVEIRA, J. N., JUNQUEIRA R.G., LEITE, E. M. A., Avaliação do ácido *trans, trans*-mucônico urinário como biomarcador de exposição ao benzeno. *Rev Saúde Pública*, v.37, n.6, p.780-785, 2003.
- PAULA, F.C. S de, SILVEIRA, J. N., LEITE, E. M. A., Validação do método de Ducos modificado para a determinação do ácido *trans,trans*-mucônico urinário, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.39, n.1, p.63-69, 2003.
- Perfil do Município de Ipatinga – 2006. Disponível em: <http://perfil.ipatinga.mg.gov.br/> (acessado em Março/2009).

- RAY, M. R., ROYCHOUDHURY, S., MUKHERJEE, S., LAHIRI, T., Occupational benzene exposure from vehicular sources in India and its effect on hematology, lymphocyte subsets and platelet P-selectin expression. *Toxicology and Industrial Health*, v.23, p.167–175, 2007.
- RIBANI, M., COLLINS, C. H., BOTTOLI, C. B. G., JARDIM, I. C. S. F., MELO, L. F. C., Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. *Química Nova*, v.27, n.5, p.771-780, 2004.
- RIVEDAL, E., LEITHE, E., The benzene metabolite trans,trans-muconaldehyde blocks gap junction intercellular communication by cross-linking connexin 43. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.232, p.463–468, 2008.
- ROC, Report on Carcinogens - Eleventh Edition, 2004. Disponível em: <http://ntp.niehs.nih.gov> (acessado em maio de 2009).
- ROMA-TORRES, J., TEIXEIRA, J. P., SILVA, S., LAFFON, B., CUNHA, L. M., MÉNDEZ, J., MAYAN, O., Evaluation of genotoxicity in a group of workers from a petroleum refinery aromatics plant. *Mutation Research*, v.604, p.19–27, 2006.
- RUCHIRAWAT, M., SETTACHAN, D., NAVASUMRIT, P., TUNTAWIROON, J., AUTRUP, H., Assessment of potential cancer risk in children exposed to urban air pollution in Bangkok, Thailand. *Toxicology Letters*, v.168, p.200–209, 2007
- RUPPERT, T., SCHERER, G., TRICKER, A.R., RAUSCHER, D., ADLKOFER, F., Determination of urinary *trans,trans*-muconic acid by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, v.666, p71–76, 1995.
- RUPPERT, T., SCHERER, G., TRICKER AR., ADLKOFER F., Trans,trans-muconic acid as a biomarker of non-occupational environmental exposure to benzene. *Int Arch Occup Environ Health* 1997;69:247–51.
- SCHERER, G., ENGL, J., URBAN, M., GILCH, G., JANKET, D., RIEDEL, K., Relationship between machine-derived smoke yields and biomarkers in cigarette smokers in Germany. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.47, p.171–183, 2007.
- SCHETTGEN, T., MUSIOL, A., ALT, A., KRAUS, T., Fast determination of urinary *S*-phenylmercapturic acid (*S*-PMA) and *S*-benzylmercapturic acid (*S*-BMA) by column-switching liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, v.863, p.283-292, 2008.
- SCHROIJEN, C., BAEYENS, W., SCHOETERS, G., HOND, E. D., KOPPEN, G., BRUCKERS, L., NELEN, V., MIEROOP, V. D., BILAU, M., COVACI, A., KEUNE, H., LOOTS, I., KLEINJANS, J., DHOOGHE, J., LAREBEKE, N. V., Internal exposure to pollutants measured in blood and urine of Flemish adolescents in function of area of residence. *Chemosphere*, v.71, p.1317–1325, 2008.

- SERENA, P., TAPPARO, A., BOMBI, G. G., Direct determination of *t,t*-muconic acid in human urine by two-dimensional liquid chromatography. *Analyst*, v.125, p.689–692, 2000.
- SINGH, R., WINN, L. M., The effects of 1,4-benzoquinone on c-Myb and topoisomerase II in K-562 cells. *Mutation Research*, v.645, p.33–38, 2008.
- SNYDER, R., WITZ, G., GOLDSTEIN, B. D., The Toxicology of Benzene. *Environmental Health Perspectives*, v.100, p.293-306, 1993.
- SNYDER, R., HEDLI, C.C., An Overview of Benzene Metabolism, *Environmental Health Perspectives*, v.104, n.6, p.1165-1171, 1996.
- SØRENSEN, M., SKOV, H., AUTRUP, H., HERTEL, O., LOF, S., Urban benzene exposure and oxidative DNA damage: influence of genetic polymorphisms in metabolism genes. *The Science of the Total Environment*, v.309, p.69–80, 2003
- USEPA, United States Environmental Protection Agency. National Air Toxics Program: The Integrated Urban Strategy. v.EPA-453/R-99-007, Carolina do Norte, 2000.
- USEPA, United States Environmental Protection Agency. Toxicological Review of Benzene, v.EPA/635/R-02/001F, Washington, DC, 2002.
- USEPA, United States Environmental Protection Agency. Emission Factor Documentation for AP-42 - Section 12.2: Coke Production, Final Report. v.EP-D-06-118, Research Triangle Park, 2008.
- VIOLANTE, F. S., SANGUINETTI, G., BARBIERI, A., ACCORSI, A., MATTIOLI, S., CESARI, R., FIMOIGNARI, C. PATRIZIA HRELIA, P., Lack of correlation between environmental or biological indicators of benzene exposure at parts per billion levels and micronuclei induction. *Environmental Research* v.91, p.135–142, 2006.
- WAIDYANATHA S., ROTHMAN, R., LI, G., SMITH, M. T., YIN, S., RAPPAPORT, S. M., Rapid determination of six urinary benzene metabolites in occupationally exposed and unexposed subjects. *Analytical Biochemistry*, v.327, p.184–199, 2004.
- WAN, J., WINN, L.M., In utero exposure to benzene increases embryonic c-Myb and Pim-1 protein levels in CD-1 mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v.228, p.326–333, 2008.
- WEAVER, V. M., BUCKLEY, T., GROOPMAN, J.D.G., Lack of Specificity of *trans,trans*-Muconic Acid as a Benzene Biomarker after Ingestion of Sorbic Acid-preserved Foods. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, v. 9, p.749–755, 2000.
- WHO, World Health Organization. Air Quality Guidelines - Second Edition. Copenhagen, Ed. WHO, 2000.

- WHO, World Health Organization, Environmental health criteria 150. Geneva, Ed. WHO, 1993. Disponível em: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc150.htm> (acessado em 19/04/2009).
- WHO, World Health Organization, Biological Monitoring of Chemical Exposure in Workplace: Guidelines. v.2, Geneva, 1996.
- WILHELM, M., EBERWEIN, G., HÖLZER, J., GLADTKE, D., ANGERER, J., MARCZYNSKI, B., BEHRENDT, H., RING, J., SUGIRI, D., RANFT, U., Influence of industrial sources on children's health – Hot spot studies in North Rhine Westphalia, Germany. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, v.210, p.591–599, 2007.
- WIWANITKIT, V., SUWANSAKSRI, J., SOOGARUN, S., A Note on Urine Trans, Trans Muconic Acid Level Among a Sample of Thai Police: Implication for an Occupational Health Issue. *Yale Journal of Biology and Medicine*, v.76, p.103-108, 2003.
- WIWANITKIT, V., SUWANSAKSRI, J., SOOGARUN, S., Monitoring of urine trans, trans-muconic acid level among smokers and non-smokers. *Respiratory Medicine*, v.99, p.788–791, 2005.

ANEXO I



Primeira Via: Arquivo de Pesquisa

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do Projeto: “Avaliação da Influência das Emissões da Indústria Siderúrgica na Exposição Não-Ocupacional ao Benzeno”.

Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO.

Orientador da Pesquisa: Prof. Dr. Maurício Xavier Coutrim

Mestranda: Lorena Giacomini Martins

A Universidade Federal de Ouro Preto tem por objetivo realizar atividades de ensino, pesquisas e criar tecnologia em várias áreas.

O(a) Sr.(Sra.) está sendo convidado(a) a participar como voluntário(a) de uma pesquisa científica desenvolvida pelo programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) com a colaboração de empresas da região. O estudo prevê a participação da população desta cidade. O(A) Sr.(Sra.) poderá recusar-se a participar da pesquisa sem que este fato lhe cause qualquer constrangimento. Os investigadores obrigam-se a não revelar sua identidade em qualquer publicação resultante deste estudo. Os exames e procedimentos aplicados são gratuitos.

Antes de assinar este termo, o(a) Sr.(Sra.) deve informar-se plenamente sobre o mesmo, fazendo todas as perguntas que achar necessário. É importante conhecer as informações a seguir.

O Benzeno é uma substância comprovadamente cancerígena. Ele é constituinte do petróleo, é utilizado como solvente e como matéria prima nas indústrias químicas. Ele está presente em toda parte, mas principalmente nos parques petroquímicos, de refino de petróleo, nas companhias siderúrgicas, nas usinas de álcool anidro, na gasolina e na fumaça do cigarro. Não apenas os trabalhadores dessas áreas, mas também a população em geral, está sujeita aos riscos da exposição a este agente químico.



O objetivo desta pesquisa é avaliar a exposição humana da população em geral ao benzeno atmosférico, em regiões próximas de indústrias siderúrgicas. Para tal será determinada a concentração de ácido mucônico (AM), substância que indica contaminação por benzeno, na urina de 200 pessoas moradoras de diferentes bairros desta cidade. Com os resultados se propõe avaliar a concentração média de AM da população por bairro. Portanto, para realizar essa pesquisa, pedimos sua colaboração para:

- responder o questionário em anexo;
- recolher a urina, no frasco que lhe foi entregue, para determinar a concentração do AM urinário.

O procedimento de coleta de urina não acarretará qualquer risco, e o(a) senhor(a) mesmo estará realizando a coleta de aproximadamente 50ml de amostra (volume do frasco coletor). O material fornecido pelo(a) senhor(a) será utilizado exclusivamente para o desenvolvimento desta pesquisa e será descartado imediatamente após seu término. O(A) senhor(a) poderá desistir de participar da pesquisa a qualquer momento. Para tanto é só entrar em contato com a UFOP nos contatos abaixo listados.

Não existe uma legislação que estipule uma concentração máxima de AM na urina de pessoas expostas ao benzeno, a não ser o caso de trabalhadores (Portaria 34/2001) onde se estabelece um valor de referência. Apesar disso, nos casos em que forem encontrados valores de AM acima desse valor de referência os responsáveis por essa pesquisa se comprometem em prestar ao doador a assistência necessária.

Os resultados deste estudo serão amplamente divulgados e poderão contribuir para o estabelecimento dos valores de referência para a população em geral, além de fornecer subsídios, junto aos órgãos competentes, quanto ao controle da qualidade do ar deste município. Estes resultados não serão usados para nenhuma outra finalidade além dos objetivos desta pesquisa.



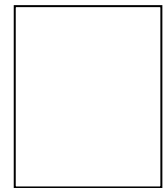
Dados do Voluntário:

Nome: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Assinatura: _____ ou



Telefones de Contato:

Comitê de ética em Pesquisa (CEP) – UFOP: (31) 3559-1367

Pesquisadores: (31) 3559-1713

Cidade:

Data:

ANEXO II



QUESTIONÁRIO N^o.....

HORÁRIO:

NOME:

SEXO: M F

DATA E CIDADE DE NASCIMENTO:

1. Características do local residencial:

- () urbana
- () periferia
- () rural

2. Avaliação da intensidade do tráfego de veículos na zona da residência:

- () muito elevada
- () elevada
- () moderada
- () baixa
- () rara

3. Presença de incineradores na zona de residência:

- () SIM () NÃO

4. Presença de centrais elétricas, carvão, petróleo, óleo combustível perto de sua casa ?

- () SIM () NÃO

5. Possui exposição a produtos químicos (Óleo , Graxa , Gasolina , etc.) em sua atividade profissional ?

- () SIM () NÃO

Quais Produtos:

6. Possui exposição a produtos químicos (óleo , Graxa , Gasolina , etc.) em atividades fora do serviço ?

() SIM () NÃO

Quais Produtos:

7. Qual foi sua última refeição e quanto tempo faz que você a fez?

8. Sua alimentação é de que tipo?

- () Mista (Carnes , arroz , feijão , verduras , legumes)
() Vegetariana (Somente verduras , legumes e cereais)
() Dietética (dieta para colesterol , diabetes , perda de peso , etc.)

9. Você consome alimentos enlatados ou semi prontos?

() SIM () NÃO

10. Quais outras bebidas você consome?

- () Sucos prontos
() Refrigerantes
() Outras bebidas prontas

11. Você fuma?

() SIM () NÃO

Quantos cigarros por dia?

- () < 5 () > 20 Quantos? _____
() 5 - 10
() 11 - 20
() 20

Indicar eventual outro tipo de consumo de tabaco (charuto, cachimbo) indicando aproximadamente o consumo/dia :

_____ charuto/dia _____ g de fumo para cachimbo/dia

12. Convive com fumantes? Em casa ou no trabalho? Quantas horas por dia?

SIM NÃO

13. Consumo de bebidas alcoólicas :

Vinho Sim Não => Indicar quantidade/dia _____ Cálices

Aguardente Sim Não => Indicar quantidade/dia _____ Doses

Cerveja Sim Não => Indicar quantidade/dia _____ Latas ou _____ garrafas

Outra _____ => Indicar quantidade/dia _____

14. Consumo de outras bebidas:

Café SIM NÃO

Chá SIM NÃO

Outra SIM NÃO

Qual? _____

15. Faz uso regular de alguma medicação ?

SIM NÃO

Qual? _____

16. Possui alguma doença de Fígado ou de Rim?

SIM NÃO

Qual? _____

ANEXO III

Comitê de Ética em Pesquisa

UFOP



Certificado

CEP/UFOP Nº.08/07

Certificamos que o projeto intitulado “ Avaliação da influência das emissões da Indústria siderúrgica na exposição não-ocupacional ao Benzeno ”, com registro CEP 2007/102 - CAAE 0014.0.238.000-07, sob Coordenação do Prof. Mauricio Xavier Coutrim, foi considerado Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, Câmara Humana, em 26 de outubro de 2007.

Prof. Luís Carlos Crocco Afonso
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO IV

1ª CAMPANHA DE AMOSTRAGEM

CONCENTRAÇÃO DE ÁC. *TRANS,TRANS*-MUCÔNICO EM URINA

SÍTIO	Concentração ATTM ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Concentração Creatinina (g.L^{-1})	Concentração ATTM ($\mu\text{g.g}^{-1}$ creatinina)
Sítio 1	93,9	1,74	53,8
Sítio 1	21,6	1,64	13,2
Sítio 1	87,1	1,77	49,1
Sítio 1	174,9	1,77	98,6
Sítio 1	76,5	1,04	73,5
Sítio 1	49,5	1,11	44,6
Sítio 1	302,1	2,57	117,6
Sítio 1	88,5	0,69	128,4
Sítio 1	286,4	1,23	232,9
Sítio 1	19,7	2,62	7,5
Sítio 1	16,8	0,80	21,0
Sítio 1	73,9	0,72	102,9
Sítio 1	1303,9	2,16	604,4
Sítio 1	27,1	0,64	42,0
Sítio 1	69,2	1,83	37,9
Sítio 1	455,4	> Lim	S/RV
Sítio 1	63,9	< Lim	S/RV
Sítio 1	4,4	0,30	14,6
Sítio 1	91,1	1,63	55,8
Sítio 1	48,9	0,70	70,1
Sítio 2	112,5	1,49	75,8
Sítio 2	56,5	2,69	21,0
Sítio 2	65,9	2,65	24,9
Sítio 2	259,5	2,04	127,4
Sítio 2	219,7	> Lim	S/RV
Sítio 2	116,8	2,59	45,0
Sítio 2	96,1	2,75	35,0
Sítio 2	< LQ	1,06	1,0
Sítio 2	136,2	0,93	146,0
Sítio 2	152,9	1,37	112,0
Sítio 2	54,5	2,10	26,0
Sítio 2	12,5	0,47	26,6
Sítio 2	702,7	2,06	340,6
Sítio 2	53,0	1,03	51,7
Sítio 2	31,3	1,03	30,4
Sítio 2	76,5	1,01	75,7
Sítio 2	126,7	1,48	85,6
Sítio 2	4,2	1,83	2,3
Sítio 2	29,3	1,05	27,8
Sítio 2	58,4	1,28	45,6
Sítio 2	11,0	1,34	8,2
Sítio 2	19,2	1,98	9,7
Sítio 2	165,2	1,54	107,1
Sítio 2	399,9	1,83	218,4
Sítio 2	104,7	1,31	79,8

1ª CAMPANHA DE AMOSTRAGEM (Continuação)

CONCENTRAÇÃO DE ÁC. *TRANS,TRANS*-MUCÔNICO EM URINA

SÍTIO	Concentração ATTM ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Concentração Creatinina ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Concentração ATTM ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ creatinina)
Sítio 2	97,3	1,40	69,4
Sítio 2	15,6	0,49	31,9
Sítio 3	26,8	0,98	27,3
Sítio 3	18,7	1,47	12,8
Sítio 3	92,6	0,49	190,5
Sítio 3	26,5	< Lim	S/RV
Sítio 3	93,3	< Lim	S/RV
Sítio 3	9,6	0,77	12,5
Sítio 3	52,2	2,95	17,7
Sítio 3	400,2	0,55	722,9
Sítio 3	42,8	2,23	19,1
Sítio 3	92,6	0,94	98,8
Sítio 3	92,2	0,76	121,5
Sítio 3	344,8	0,54	639,9
Sítio 3	109,2	0,35	316,0
Sítio 3	20,7	1,03	20,1
Sítio 3	64,5	1,40	46,2
Sítio 3	10,5	< Lim	S/RV
Sítio 3	38,8	0,70	55,3
Sítio 3	50,8	1,78	28,6
Sítio 3	43,4	1,52	28,5
Sítio 3	38,6	1,12	34,5
Sítio 3	< LQ	0,88	1,0
Sítio 3	10,4	2,13	4,9
Sítio 3	< LQ	0,92	1,0
Sítio 3	25,2	0,53	47,1
Sítio 3	48,6	0,30	162,0
Sítio 3	319,6	1,59	201,3
Sítio 3	17,8	0,57	31,3
Sítio 3	37,4	2,57	14,5
Sítio 4	109,9	2,85	38,6
Sítio 4	83,7	1,05	79,8
Sítio 4	195,9	2,55	76,8
Sítio 4	22,8	0,33	68,0
Sítio 4	28,1	1,11	25,4
Sítio 4	139,4	1,79	78,0
Sítio 4	27,7	0,30	92,3
Sítio 4	523,7	1,61	324,7
Sítio 4	2190,9	1,17	1867,5
Sítio 4	144,6	2,14	67,6
Sítio 4	31,4	0,85	36,9
Sítio 4	604,8	1,59	379,9
Sítio 4	146,7	1,87	78,5
Sítio 4	368,4	> Lim	S/RV

1ª CAMPANHA DE AMOSTRAGEM (Continuação)CONCENTRAÇÃO DE ÁC. *TRANS,TRANS*-MUCÔNICO EM URINA

SÍTIO	Concentração ATTM ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Concentração Creatinina ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Concentração ATTM ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ creatinina)
Sítio 4	63,5	0,72	88,3
Sítio 4	34,2	0,91	37,5
Sítio 4	296,2	1,35	219,6
Sítio 4	34,3	0,90	38,1
Sítio 4	8,5	0,60	14,2
Sítio 4	165,9	1,08	153,1
Sítio 4	15,9	0,78	20,5
Sítio 4	8,3	0,89	9,3
Sítio 4	36,4	0,74	49,5
Sítio 4	6,7	0,48	13,8
Sítio 4	85,3	1,47	58,1
Sítio 4	136,9	1,19	115,4
Sítio 4	58,3	0,50	117,3

Legenda: < LQ = concentração de ATTM menor do que o Limite de Quantificação ($0,35 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
< Lim = concentração de creatinina inferior a $0,3 \text{ g/L}$
> Lim = concentração de creatinina superior a $3,0 \text{ g/L}$
S/RV = sem valor válido

2ª CAMPANHA DE AMOSTRAGEM

CONCENTRAÇÃO DE ÁC. *TRANS,TRANS*-MUCÔNICO EM URINA

SÍTIO	Concentração ATTM ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Concentração Creatinina ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Concentração ATTM ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ creatinina)
Sítio 1	31,8	0,80	39,8
Sítio 1	10,0	< Lim	S/RV
Sítio 1	233,8	1,83	127,6
Sítio 1	38,7	2,45	15,8
Sítio 1	102,8	0,67	152,5
Sítio 1	< LQ	2,24	1,000
Sítio 1	< LQ	0,54	1,000
Sítio 1	88,8	2,83	31,3
Sítio 1	11,9	1,42	8,4
Sítio 1	41,7	1,63	25,5
Sítio 1	16,3	0,88	18,4
Sítio 1	30,1	2,61	11,5
Sítio 1	< LQ	1,34	1,000
Sítio 1	21,7	1,09	19,9
Sítio 1	60,2	0,82	73,8
Sítio 1	203,1	1,67	121,9
Sítio 1	202,6	1,84	110,0
Sítio 1	32,0	0,40	80,1
Sítio 1	190,9	1,45	131,7
Sítio 1	191,0	1,31	146,1
Sítio 1	693,2	> Lim	S/RV
Sítio 1	221,8	1,22	181,1
Sítio 1	193,6	1,97	98,1
Sítio 1	194,6	0,98	198,1
Sítio 1	61,8	1,43	43,1
Sítio 1	16,8	0,26	65,3
Sítio 1	45,8	0,97	47,4
Sítio 1	32,0	0,55	58,2
Sítio 1	75,4	0,67	113,2
Sítio 1	17,9	0,49	36,4
Sítio 2	30,8	0,76	40,3
Sítio 2	89,1	2,17	41,1
Sítio 2	60,9	1,12	54,3
Sítio 2	357,2	0,89	403,3
Sítio 2	96,8	2,69	35,9
Sítio 2	98,4	1,02	96,6
Sítio 2	130,0	1,88	69,3
Sítio 2	202,5	2,08	97,3
Sítio 2	17,7	0,75	23,5
Sítio 2	73,6	0,43	172,5
Sítio 2	189,2	1,41	134,6
Sítio 2	68,0	0,78	86,8
Sítio 2	150,0	1,62	92,9
Sítio 2	536,7	2,67	200,7

2ª CAMPANHA DE AMOSTRAGEM (Continuação)

CONCENTRAÇÃO DE ÁC. *TRANS,TRANS*-MUCÔNICO EM URINA

SÍTIO	Concentração ATTM ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Concentração Creatinina (g.L^{-1})	Concentração ATTM ($\mu\text{g.g}^{-1}$ creatinina)
Sítio 2	104,5	1,26	83,1
Sítio 2	114,1	1,46	78,3
Sítio 2	52,9	1,47	36,1
Sítio 2	206,7	1,07	192,4
Sítio 2	141,5	2,06	68,8
Sítio 2	66,8	1,22	54,6
Sítio 2	72,5	1,01	72,0
Sítio 2	61,8	1,22	50,8
Sítio 2	135,8	1,19	114,1
Sítio 2	120,3	1,12	107,8
Sítio 2	81,3	1,37	59,5
Sítio 2	45,3	2,14	21,2
Sítio 2	96,0	1,72	55,9
Sítio 2	32,9	0,52	62,8
Sítio 2	118,8	1,89	62,8
Sítio 2	48,7	0,71	68,9
Sítio 2	56,3	0,58	96,6
Sítio 3	30,8	1,18	26,0
Sítio 3	28,4	1,49	19,0
Sítio 3	14,0	< Lim	S/RV
Sítio 3	159,8	1,62	98,4
Sítio 3	230,4	> Lim	S/RV
Sítio 3	54,3	1,61	33,8
Sítio 3	38,9	0,77	50,2
Sítio 3	12,3	> Lim	S/RV
Sítio 3	35,3	0,91	38,9
Sítio 3	16,4	0,68	24,0
Sítio 3	83,7	1,21	69,4
Sítio 3	8,8	0,87	10,1
Sítio 3	10,3	1,41	7,3
Sítio 3	29,0	1,57	18,4
Sítio 3	10,2	1,17	8,7
Sítio 3	10,5	0,78	13,5
Sítio 3	56,6	1,32	42,7
Sítio 3	< LQ	0,82	1,000
Sítio 3	15,0	< Lim	S/RV
Sítio 3	30,7	1,87	16,5
Sítio 3	61,9	2,50	24,8
Sítio 4	95,5	1,88	50,7
Sítio 4	56,5	0,84	67,2
Sítio 4	97,1	1,81	53,7
Sítio 4	48,2	< Lim	S/RV
Sítio 4	24,8	0,34	72,6
Sítio 4	27,4	0,71	38,7

2ª CAMPANHA DE AMOSTRAGEM (Continuação)

CONCENTRAÇÃO DE ÁC. *TRANS,TRANS*-MUCÔNICO EM URINA

SÍTIO	Concentração ATTM ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	Concentração Creatinina (g.L^{-1})	Concentração ATTM ($\mu\text{g.g}^{-1}$ creatinina)
Sítio 4	49,2	1,17	42,2
Sítio 4	116,8	0,75	155,9
Sítio 4	858,0	1,83	468,2

Legenda: < LQ = concentração de ATTM menor do que o Limite de Quantificação ($0,35\mu\text{g.L}^{-1}$)

< Lim = concentração de creatinina inferior a 0,3g/L

> Lim = concentração de creatinina superior a 3,0g/L

S/RV = sem valor válido