



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

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Ficha Catalográfica

# FOLHA DE APROVAÇÃO

## **DEDICATÓRIA**

## **AGRADECIMENTOS**

# SUMÁRIO

	LISTA DE FIGURAS	viii
	LISTA DE TABELAS	x
	LISTA DE NOTAÇÕES	xi
	RESUMO	xii
	ABSTRACT	xiv
	<b>CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	OBJETIVOS	2
1.1.1	Objetivo Geral	2
1.1.2	Objetivos Específicos	3
1.2	JUSTIFICATIVA	3
	<b>CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>5</b>
2.1	BENZENO	5
2.1.1	Toxicidade	7
2.1.2	Metabolismo	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
	<b>CAPÍTULO 3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>22</b>
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	26
3.1.3.1	Quantificação do Ácido <i>trans,trans</i> -mucônico	26
	<i>Método de Extração</i>	27
	<i>Método Cromatográfico</i>	29
3.1.4	Validação do Método	31
	<i>Interferência da Matriz Biológica</i>	32
	<i>Linearidade e Faixa de Trabalho</i>	32
	<i>Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)</i>	33
	<i>Precisão</i>	34
	<i>Recuperação</i>	34
3.1.5	Quantificação do ATTM	35
3.1.5.1	Determinação de Creatinina	35
	<b>CAPÍTULO 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES</b>	<b>38</b>
4.1	OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO MÉTODO ANALÍTICO	38
4.1.1	Separação e Identificação do ATTM	38
4.1.2	Interferência da Matriz Biológica	39
4.1.3	Linearidade e Faixa de Trabalho	41
4.1.4.	Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ)	42
4.1.5	Precisão	43
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	51

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
	<b>CAPÍTULO 5. CONCLUSÕES</b>	64
	<b>REFERÊNCIAS</b>	65
	<b>ANEXO I</b>	76
	<b>ANEXO II</b>	80
	<b>ANEXOS III</b>	84
	<b>ANEXOS IV</b>	86

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1	Diferentes formas de representação do benzeno.	5
Figura 2.2	Principais Vias Metabólicas do Benzeno.	10
Figura 3.1	Mapa político da cidade de Ipatinga-MG.	24
Figura 3.2	Direção e velocidade dos ventos.	25
Figura 3.4	Cartuchos utilizados na extração do AM.	28
Figura 3.5	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> .	40
Figura 4.2	Comparação entre Curvas Analíticas confeccionadas em água e em pool de urina.	41
Figura 4.3	Cromatograma ampliado mostrando a linha de base e picos considerados ruídos com suas respectivas áreas	42
Figura 4.4	Boxplot 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	51
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	Boxplot 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. (Legenda: F sem OL -Fumantes sem <i>outliers</i> . NF sem OL – Não Fumantes sem <i>outliers</i> ).	58
Figura 4.15	Teste de variância entre Fumantes e Não fumantes, desconsiderando os <i>outliers</i> apenas do grupo Não Fumantes (Legenda: NF sem OL – Fumantes sem <i>outliers</i> ).	58
Figura 4.15	Teste de variância entre resultados de ATTM urinário ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ de creatinina) de voluntários do sexo feminino e masculino fumantes.que são não fumantes.	60
Figura 4.16	Teste de variância entre resultados de ATTM urinário ( $\mu\text{g.g}^{-1}$	60

de creatinina) de voluntários do sexo feminino e masculino  
fumantes.que são fumantes

## LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1	Indicadores Biológicos de Exposição ao Benzeno (IBE-Bz)	18
Tabela 2.1	Diferentes Metodologias de Determinação do ATTM	20
Tabela 3.1	Reagentes Utilizados	26
Tabela 3.2	Materiais e Equipamentos Utilizados	27
Tabela 3.3	Composição do equipamento de CLAE	29
Tabela 3.4	Condições de análise para separação dos picos de ATTM ppor CLAE-DAD	29
Tabela 4.1	Estatística descritiva para os resultados de LD e LQ, em $\mu\text{g.L}^{-1}$ , do método analítico otimizado	43
Tabela 4.2	Coefficientes de Variação obtidos no ensaio de precisão através de repetibilidade	43
Tabela 4.3	Resultados do ensaio de recuperação do método analítico	44
Tabela 4.4	Dados meteorológicos da cidade de Ipatinga referentes aos dois períodos de amostragem	45
Tabela 4.5	Caracterização dos voluntários quanto ao sexo e à exposição ao cigarro	46
Tabela 4.6	Estatística descritiva para os resultados de ATTM urinário das duas campanhas, em $\mu\text{g.g}^{-1}$ creatinina	46
Tabela 4.7	Estatística descritiva para os resultados de ATTM urinário das duas campanhas, em $\mu\text{g.g}^{-1}$ creatinina, sem <i>outliers</i>	48
Tabela 4.8	Exemplos de concentrações de ATTM urinário encontrados na literatura	50
Tabela 4.9	Estatística descritiva para os resultados de ATTM urinário ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ de creatinina) por sítio de amostragem	51
Tabela 4.10	Estatística 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 4.11	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 4.12	Estatística descritiva resultados de ATTM urinário ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ de creatinina) entre sexos, desconsiderando os dados <i>outliers</i>	59
Tabela 4.13	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	<i>American Conference of Governmental Industrial Hygienists</i>
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATRDR	<i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>
ATTM	Ácido <i>trans,trans</i> 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	<i>Consumer Product Safety Commission</i>
COVs	Compostos Orgânicos Voláteis
DAD	Detector por Arranjo de Diodos
EFS	Estração em Fase Sólida
EPAQS	<i>Expert Panel on Air Quality Standards</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fundacentro	Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho
HPAs	Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos
IARC	International Agency for Research on Cancer
ICSC	<i>International Chemical Safety Cards</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
IBE	Indicador Biológico de Exposição
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MAC	<i>Maximum Allowable Concentrations</i>
MAK	<i>Maximale Arbeitsplatz Konzentration</i>
MDIC	Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior
MPT	Média Ponderada no Tempo
MTE	Ministério do Trabalho e Emprego
MS	Ministério da Saúde
NIOSH	<i>National Institute for Occupational Safety and Health</i>
OEL	<i>Occupational Exposition Limit</i>
OSHA	<i>Occupational Safety and Health Administration</i>
PPB	Partes por Bilhão
PPM	Partes por Milhão
SECEX	Secretaria de Comércio Exterior
STEL	<i>Short-term Exposure Limit</i>
TLV-TWA	<i>Threshold Limit Value – Time Weighted average</i>
TRK	<i>Technische Richtkonzentrationen</i>
USEPA	<i>United States Environmental Protection Agency</i>
UV-vis	Ultravioleta Visível
VRT	Valor de Referência Tecnológico
WHO	<i>World Health Organization</i>

## RESUMO

O benzeno, substância comprovadamente carcinogênica, é um composto onipresente na natureza. Seus efeitos tóxicos crônico 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 da cidade de Ipatinga, MG, que possui uma grande 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 recuperação, 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  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  creatinina. Não foi encontrada diferença estatística significativa com relação ao teor de ATTM urinário entre as duas campanhas, mas, ao nível de 95% de confiança, constatou-se diferença entre os resultados de indivíduos de sítio sob influência direta das emissões das coquearias daqueles do sítio considerado branco. Também foi evidenciada diferença estatística significativa entre fumantes e não fumantes ao nível 95% confiança.

**Palavras-chave:** *Benzeno, exposição não ocupacional, ácido trans, trans-mucônico, coquearias, cromatografia líquida de alta eficiência.*

## 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 (ATTM) urinary contents, biomarker exposure from benzene, among inhabitants Ipatinga-MG city, that has a big steel industry in the urban area. The ATTM was clean-up through apreconditioned ion-exchange (SAX) cartridge and it was determined by high performance liquid chromatography suing C18 column and UV-vis detection with arrays of diodes. The method was optimized and validated about linearity range, work range, precision and recovery, 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 ATTM concentration was determined from 193 urinary samples, collected in four different places in two sampling campaigns that occurred in rainy and dry weather periods. The mean ATTM concentration was  $59,2 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  creatinine. It wasn't found significant statistic difference between ATTM concentrations in the two sampling campaigns, but, with 95% security level, the difference statistic was noticed among the voluntary results of the place with direct influence from coke oven plants emission of the "white" place. The significant statistic difference also was noticed between smokers and non-smokers, in the 95% confidence level.

**Keywords:** Benzene, non-occupationally exposure, trans, trans-mucônic acid, coke oven plants, high performance liquid chromatography.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO

---

O benzeno, substância comprovadamente carcinogênica (ATRDR, 2007; WHO, 2003), é um excelente solvente orgânico que passou a ter seu uso bem difundido, principalmente com 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 coquearias das usinas siderúrgicas, mas essa produção vem sendo substituída pela produção nos parques petroquímicos e de refino de petróleo. Seus efeitos tóxicos crônico 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 fontes 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 coquearias das indústrias siderúrgicas e nas indústrias petroquímicas (ATRSD, 2007). As emissões nas siderúrgicas são evidentes principalmente durante o processo de coqueificação que ocorre nas coquearias, normalmente presentes nessas indústrias. Elas ocorrerem devido a vazamentos durante o processo de coqueificação e ainda durante o desenformamento, transporte e extinção 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 contaminação 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. Apesar de não existirem concentrações de exposição que sejam consideradas seguras para substâncias cancerígenas, vários órgãos governamentais e entidades voltadas à saúde do trabalhador estabelecem limites máximos de exposição a esta substância, 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, os limites em vigor foram determinados pela criação do Anexo 13-A da NR N<sup>o</sup>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 mg/m<sup>3</sup>) para indústrias siderúrgicas e 1ppm (3,2mg/m<sup>3</sup>) para as demais indústrias e atividades.

A pesar 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 avaliada a ocorrência de diferenças estatísticas no teor de ácido *trans,trans* mucônico (ATTM) urinário, indicador biológico de exposição ao benzeno, entre moradores da cidade de Ipatinga, MG, que possui uma grande siderúrgica na área urbana. O ATTM urinário foi determinado por extração em fase sólida (EFS) seguida de análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por UV-vis-DAD. O método foi otimizado e validado com relação à linearidade, faixa de trabalho, limites de detecção e quantificação, recuperação 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**

Verificar se há diferença estatística no teor de ácido *trans,trans*-mucônico urinário, indicador biológico de exposição ao benzeno, entre grupos de uma população

residente próxima à coquearias, fonte de emissão de benzeno, diferenciados pela localização geográfica em relação à fonte

### **1.1.2 Objetivos Específicos**

- Otimizar e validar método analítico de quantificação de ATTM urinário através de CLAE;
- Classificar a população amostrada em diferentes sítios de exposição, a fim de se tentar correlacionar possíveis variações encontradas nas concentrações de ATTM;
- Identificar possíveis fatores que pudessem interferir nos resultados de concentração de ATTM urinário, tais como, hábito de fumar, idade, sexo, alimentação, através da aplicação de um questionário;
- Realizar duas campanhas de amostragem de urina, em período de estiagem e em período chuvoso, para determinação de ATTM urinário.
- Avaliar estatisticamente os resultados de concentração de ATTM urinário utilizando a ferramenta Minitab.

## **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 a gases e vapores orgânicos de elevada toxicidade, dentre os quais se encontra o benzeno. A emissão desses compostos, previstas 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).

Sendo o benzeno uma substância comprovadamente carcinogênica (ATRDR, 2007; WHO, 2003), nenhum tipo de exposição a esse agente pode ser considerada segura. Ainda

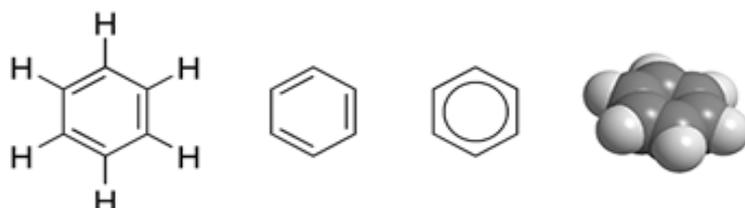
assim, a legislação brasileira permite limites de exposição ocupacional nas áreas de indústria siderúrgica de 2,5 ppm ( $8\text{mg}\cdot\text{m}^{-3}$ ) e não regulamenta sobre exposição não ocupacional. Considerando a difusão atmosférica das emissões de gases e vapores industriais, a população em geral que reside próximo a essas áreas pode estar sofrendo exposição elevada de poluentes como o benzeno. Ainda assim, a maioria dos estudos existentes sobre o assunto diz respeito à grupos expostos ocupacionalmente.

A cidade de Ipatinga-MG foi escolhida por ter desenvolvido-se no entorno de uma grande indústria siderúrgica que com o passar dos anos ficou completamente rodeada por bairros amplamente habitados. Para a quantificação do benzeno foi escolhido o ATTM urinário por ser um IBE sensível a baixas concentrações atmosféricas do benzeno e que é recomendado na 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 95,2 mmHg 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 do 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). Industrialmente é usado 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), 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, 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, mostra em sua pesquisa realizada com trabalhadores expostos ocupacionalmente que este grupo apresenta 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.

Há evidências de que 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 os efeitos tóxicos do benzeno (Rivedal e Leithe, 2008; Singh e Winn, 2008).

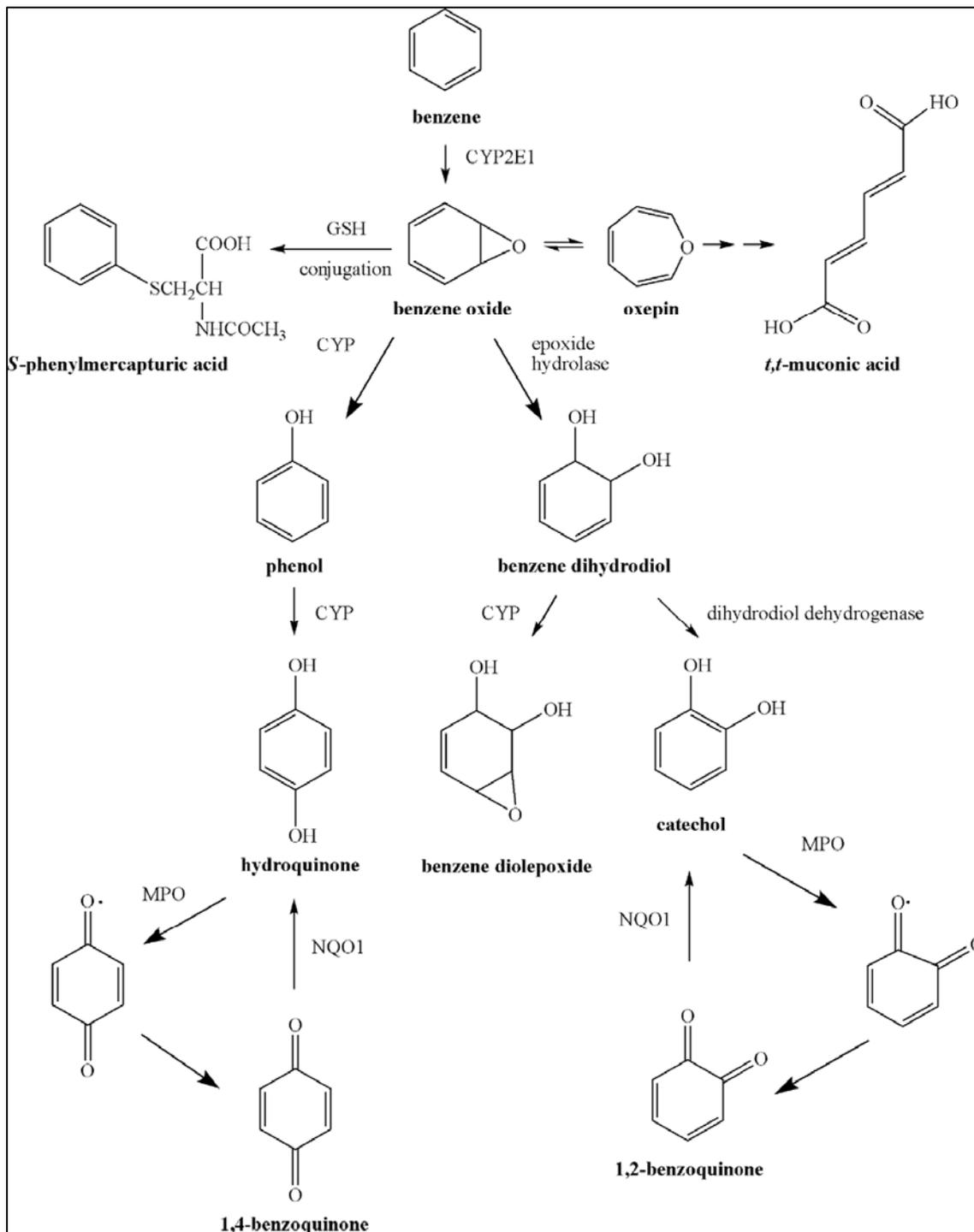
No Brasil, o quadro causado pela exposição ao benzeno é chamado de benzenismo. Segundo documento do Ministério da Saúde sobre vigilância de risco químico (MS, 2006), benzenismo é um conjunto de sinais, sintomas e complicações, causadas pela exposição aguda ou crônica ao benzeno. As complicações podem 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, prazo 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 criação de legislações específicas. Porém, as legislações existentes são essencialmente referentes a

limites de exposição ocupacional. Poucas são as referências e legislações que tratam da exposição não-ocupacional ao benzeno.

### 2.1.2 Metabolismo

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  $^{14}\text{C}$ . Parke e Williams (1953) *apud* Snyder e Hedli (1996), utilizaram-se desse artifício. Após administrarem [ $^{14}\text{C}$ ]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 contaminação 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 metabolização 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 and Hedli, 1996; WHO, 1993). 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, glutationa; MPO, mieloperoxidase; NQO1: quinona oxidorredutase).

### 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 ocorre emissão de gases e vapores dessa substância. Além dos processos industriais, ele também é liberado por processos de combustão, que podem ser naturais, como queimadas de florestas, 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 pode ser proveniente de diversas fontes, sendo elas ocupacionais ou não-ocupacionais. 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 contaminação 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 vão do seu processo de síntese 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 coqueiras, sujeitas às emissões de gases e vapores liberados em todo processo de coqueificação e também trabalhadores de refinarias de petróleo. Outros grupos de trabalhadores que são alvos de pesquisas quanto à contaminação por 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 em um processo chamado de coqueificação 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 de coqueificação 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, mas 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 ser contaminadas 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, 2008; Wiwanitkit, 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 9 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 contaminação por benzeno é bem difundida 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 contaminação.

## **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 de órgãos americanos. Cada país, dentro da suas características particulares relacionadas às necessidades e possibilidade, 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 ao 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 100 ppm (325 mg.m<sup>-3</sup>), sendo esse valor a concentração máxima de benzeno permitido no ar. No ano seguinte esse valor foi reduzido para 50 ppm (162.5 mg.m<sup>-3</sup>) (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 35 ppm (114 mg.m<sup>-3</sup>) em 1948, 25 ppm (82 mg.m<sup>-3</sup>) em 1957, 25 ppm como valor teto

(concentração que não pode ser excedida em nenhum momento da jornada de trabalho) em 1963 e 10 ppm ( $32,5 \text{ mg.m}^{-3}$ ) 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. Nesse contexto, 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 o nível de 1 ppm ( $3,3 \text{ mg.m}^{-3}$ ) como nível de exposição ocupacional seguro.

O surgimento do conceito de 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 0,1 ppm ( $0,33 \text{ mg.m}^{-3}$  / TLV-TWA) e 1 ppm (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 1 ppm (TLV-TWA) e 5 ppm ( $16,5 \text{ mg.m}^{-3}$  / STEL). Já o ACGIH recomenda como limites 0,5 ppm (TLV-TWA) e 2,5 ppm (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).

Vários países possuem suas próprias legislações, baseadas em fatos nacionais e em estudos internacionais, mas alguns utilizam como limites os valores de referência de

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 40, 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 mudança 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 2,5 ppm (7,98 mg.m<sup>-3</sup>) para as empresas siderúrgicas e 1,0 ppm (3,19 mg.m<sup>-3</sup>) para as demais indústrias, inclusive petroquímicas.

Em 2001, o Ministério do Trabalho e Emprego publicou a portaria, Portaria n° 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 5 ppb (16,2 µg.m<sup>-3</sup>) e que no futuro este valor deva ser reduzido para 1 ppb (3,2 µg.m<sup>-3</sup>). 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 3 ppb (9,6 µg.m<sup>-3</sup>) 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 µg.m<sup>-3</sup>, com decréscimos gradativos para alcançar concentração de 1 µg.m<sup>-3</sup> 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 contaminação 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 uma atividade enzimática, que em fluido biológico apresenta relação com a exposição ambiental a determinado agente tóxico. No caso do benzeno, são utilizados produtos da sua biodegradação, 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) apud 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 como IBE em pessoas expostas ocupacionalmente ao benzeno, mesmo que em baixas concentrações. Porém, 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).

Apesar de não ser um metabólito específico do benzeno, o ATTM urinário é um de seus metabólitos indicado e bastante utilizado como seu IBE. Vários autores desenvolveram diferentes metodologias de detecção 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 determinação do ATTM urinário. Entre esses métodos estão descritas várias técnicas cromatográficas, mas as mais utilizadas são as que envolvem 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 2.1.

Dentre as pesquisas existentes utilizando ATTM 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 entre adolescentes da região de Flandres na Bélgica. O objetivo era avaliar vários poluentes atmosféricos e tentar relacionar 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 analisados estava o benzeno, através do ATTM urinário. A concentração média do analito encontrada foi de 72 µg/g de creatinina, e não foi possível observar diferenças entre as microrregiões analisadas. Já Buthbumrung *et al.* (2008) encontraram valores médios de ATTM urinário significativamente maiores em crianças da área urbana de Bangkok, Tailândia (120 µg/g de creatinina), quando comparado com crianças da área rural (60 µg/g de creatinina).

Tabela 2.1: 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 <sup>-1</sup> )	Referência
CLAE	EFS com SAX <sup>(a)</sup>	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 <sup>(b)</sup>	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 <sup>(c)</sup>	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 <sup>(a)</sup>	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 <sup>(a)</sup>	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 <sup>(a)</sup>	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 <sup>(a)</sup>	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 <sup>(d)</sup>	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 ionica <sup>(e)</sup>	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 <sup>(a)</sup>	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 <sup>-1</sup>	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 <sup>(a)</sup>	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 <sup>(a)</sup>	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	Buthumrung <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=Eletrospray

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

NR= nao relatado THF= tetrahidrifurano 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 ortofosfórico 150mM/L (9:91 v/v) B= Acetonitrila/Ácido ortofosfórico 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, que ficam expostos às emissões veiculares, e encontraram elevação dos níveis de ATTM urinário dos 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 analito em crianças da área urbana (270 µg/g de creatinina) comparados com crianças de áreas rurais (80 µg/g de creatinina).

Cocco *et al.* (2003) avaliaram valores de ATTM urinário entre adultos não expostos ocupacionalmente, considerando diferenças entre fumantes e não-fumante e entre sexos. Ele encontrou aumento significativo da concentração de ATTM urinário entre fumantes (37,6 µg/g de creatinina em fumante e 15,6 µg/g de creatinina em não fumantes) e também entre mulheres, com valores basais médios de ATTM 25,4 µg/g de creatinina enquanto que entre homens este valor foi de apenas 9,2 µg/g de creatinina. Esta diferença também ficou evidente entre mulheres e homens fumantes.

Considerando a gravidade dos efeitos da exposição ao benzeno, e que existem diferenças significativas de concentrações de ATTM urinário mesmo entre grupos não expostos ocupacionalmente, verifica-se a grande necessidade de estudar-se a população em geral, principalmente grupos que podem ter algum fator de risco agravante, como a exposição a poluentes industriais específicos.

## CAPÍTULO 3

### MATERIAIS E MÉTODOS

---

#### 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 na cidade de Ipatinga-MG, 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, utilizando detector de absorção de ultravioleta visível com arranjo de diodos.

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 identificar.

Para atender as exigências da resolução, foi elaborado um termo de consentimento (anexo A), 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.

Outro item que precisa de aprovação, caso seja utilizado na pesquisa, é o questionário a ser aplicado aos voluntários. Como nesse projeto, algumas informações pessoais foram de grande importância para caracterização da população e para justificar ou eliminar a influência de alguns fatores como o hábito de fumar, alimentação e uso de medicamentos, também foi necessária a elaboração e submissão de um questionário (anexo B) para aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

Apenas após a aprovação, do projeto e seus termo de consentimento e questionário, que foi homologada pelo CEP da Universidade Federal de Ouro Preto, a partir do certificado CEP/UFOP N° 08/07 (anexo C), é que foi possível dar início à parte da pesquisa envolvendo amostras de urina.

### **3.1.2 AMOSTRAGEM**

O local selecionado para realização da amostragem foi a cidade de Ipatinga, situada na microrregião do Vale do Aço, região leste do estado de Minas Gerais, que foi escolhida por receber fortes emissões de uma grande indústria siderúrgica situada no perímetro urbano do município. A figura 3.1 mostra o mapa político da cidade, destacando a área da 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 expostos na figura 3.2. De acordo com o observado nesta figura, foram escolhidos bairros considerados diretamente afetados pelas emissões das coquearias da indústria

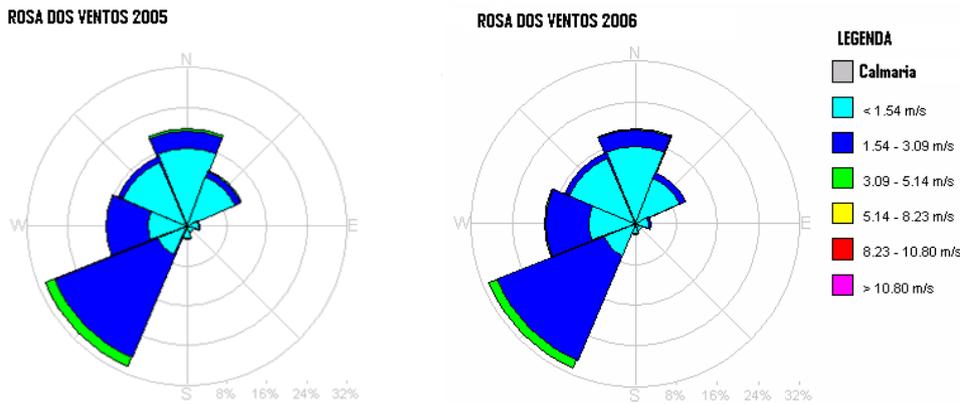
siderúrgica. Além disso, também foi proposto analisar a possível influência do tráfego de automóveis e caminhões que transitam pela cidade, principalmente em relação à rodovia que a corta. Assim, os locais de amostragens puderam ser divididos em quatro sítios distintos: (1) sob influência direta das coqueiras da siderúrgica, representado pelos bairros Águas e Cariru; (2) sob influência da rodovia, representado pelo bairro Horto; (3) sob influência das coqueiras e rodovia, representado pelo bairro Centro e (4) sem influência direta dessas duas possíveis fontes de contaminação, representado pelo bairro Cidade Nobre, considerado como o “branco”. Os sítios também podem ser visualizados na figura 3.1.



Fonte: Perfil do Município de Ipatinga, 2006, modificado.

Figura 3.1: Mapa político da cidade de Ipatinga-MG

Dentro de cada sítio, as amostras foram coletadas de forma aleatória. Os voluntários foram abordados 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, sexo, condições de saúde e para poder eliminar alguma possibilidade de interferência nos resultados.



Fonte: Dados cedidos pela Usiminas.

Figura 3.2: Direção e velocidade dos ventos.

Foram definidas duas campanhas de amostragem, sendo uma no verão e outra próxima ao inverno, 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.

A abordagem dos 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. Os voluntários eram abordados 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 coletor de urina, de polietileno, com capacidade para 50 mL de amostra. 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  $-20^{\circ}\text{C}$ , 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  $-20^{\circ}\text{C}$  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 pequenas modificações, 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 <sup>®</sup>	Condutividade = 0,065 $\mu$ S
Ácido Pírico	Grau PA, 100% pureza, JT Baker <sup>®</sup>
Hidróxido de Sódio	Grau PA, 100% pureza
Metanol	Grau Cromatográfico, JT Baker <sup>®</sup>
Ácido Acético	Grau Cromatográfico, JT Baker <sup>®</sup>
Ácido trans, trans-mucônico	Grau PA Aldrich <sup>®</sup> , $\geq 99\%$ de pureza

#### 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 e no comprimento de onda de detecção.

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

### ***Método de Extração***

Pelo fato da urina constituir-se de uma matriz biológica de composição muito diversificada, antes de serem injetadas no cromatógrafo foi necessário que as amostras passassem 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 de uma técnica de extração em fase sólida (EFS), que é uma técnica de separação líquido-sólido. O sistema comporta-se semelhantemente à uma cromatografia líquida utilizando-se uma pequena coluna aberta, denominada de cartucho (figura 3.4), 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. 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 3.5, através das seguintes etapas:



Figura 3.4: Cartucho utilizados na extração do ATTM.

- condicionamento: foram eluídos pelo cartucho 3 mL de metanol seguidos de 3 mL de água Milli Q;
- aplicação da amostra: aplicou-se 1ml de amostra (urina previamente filtrada em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  de poro). As amostras foram eluídas por um tempo de aproximadamente 3 minutos;
- remoção de interferentes (lavagem): eluiu-se pelo cartucho 3 mL 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 3 mL 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 *vial* devidamente identificado, pronto para ser levado ao equipamento de CLAE.

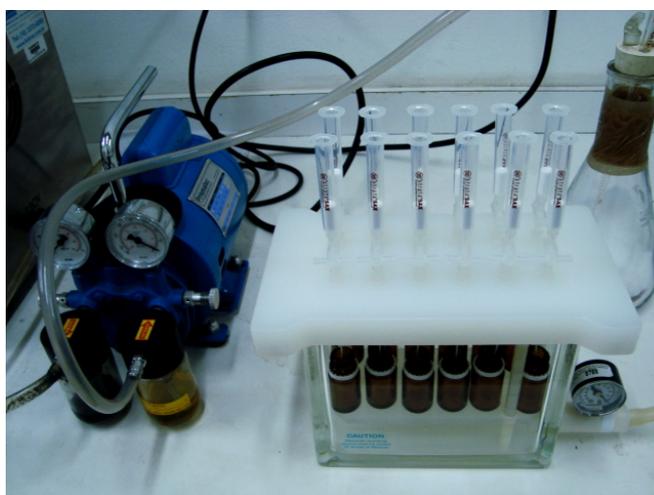


Figura 3.5: Sistema de extração a vácuo (*manifold*).

## Método Cromatográfico

O ATTM urinário foi quantificado em equipamento de CLAE marca Shimadzu, modelo 20A, conforme descrito na tabela 3.3. Para a separação utilizou-se uma coluna de fase reversa C18 (150 x 2,0 mm; 3,2  $\mu\text{m}$ ) acoplada a uma pré-coluna também C18 (4 x 3 mm). As condições cromatográficas 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
Software	LabSolutions

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

Sistema Cromatográfico	Descrição
CLAE	Shimadzu LC-DAD
Coluna	Shimadzu C18 (150 x 2,0mm; 3,2 $\mu\text{m}$ )
Pré-coluna	Phenomenex C18 (4 x 3 mm)
Vazão da Fase Móvel	0,2 ml.min <sup>-1</sup> (Metanol e Ácido Acético 1%)
Fase Móvel	Início: 10% Metanol mantido até 12 minutos Variação até 90% de metanol em 1 minuto 90% metanol : 10% Ácido Acético 1% 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 $\mu\text{L}$ (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  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ , 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 foi 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  $10 \text{ mg.L}^{-1}$ , e, por diluição, a partir dessa solução, as demais soluções padrão de menor concentração eram preparadas.

Como urina é uma matriz biológica muito complexa, foram construída e comparadas curvas analíticas, por método de calibração externa, em fase aquosa e 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 na causar diluição matriz. Depois de preparados, os padrões na matriz passaram pelo mesmo tratamento que as amostras: filtração por membrana  $0,22 \mu\text{m}$ , processo de extração em fase sólida e injeção no cromatógrafo. 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. O comprimento de onda utilizado para a leitura das áreas dos picos referentes aos padrões do ATTM foi de 264 nm. Sendo o cromatógrafo composto por um detector de arranjo de diodos (DAD), foi possível analisar vários comprimentos de onda diferentes e decidir qual deles apresentava maior sensibilidade 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  $\mu\text{g.L}^{-1}$  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 recuperação.

## ***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).

## ***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 nº 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.

### ***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

## ***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

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

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.

Depois de coletadas, as amostras foram armazenadas em freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) até o transporte à cidade de Ouro Preto, onde também permaneceram congeladas 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. O método utilizado foi o de redução do ácido pícrico pela creatinina em meio alcalino, formando ácido picrâmico, utilizado por Coutrim, 1998. A creatinina após originar o ácido picrâmico apresentou coloração vermelho alaranjada e foi determinada espectrofotometricamente a 525nm com o espectrofotômetro Bioespectro 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  $500 \text{ mg.L}^{-1}$  - pesou-se 126,30 mg de creatinina PA que foram dissolvidos em aproximadamente 50 mL de uma solução de ácido clorídrico (HCl)  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ . Transferi-se a solução para um balão volumétrico de 250 mL, adicionada de 2 mL de tolueno PA, como preservante, e aferiu-se o balão com a mesma solução de HCl  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ . 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 5,0 mg.L<sup>-1</sup> que foram descartadas após serem utilizadas.

- Ácido Pícrico 1% (p/v) – pesou-se 2,0 gramas 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 a foi filtrada para um balão volumétrico de 200 mL, que foi aferido com a mesma água. A solução foi armazenada em geladeira.
- Hidróxido de Sódio 10% (p/v) – pesou-se 10,0 gramas de hidróxido de sódio em pastilhas, que foram dissolvidos em aproximadamente 50 mL de Água Milli Q contida em um béquer de 150 mL 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 50,0 mL da solução de hidróxido de sódio 10% (p/v), com auxílio de uma pipeta volumétrica, e transferiu-os para balão volumétrico de 250 mL. 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 1,0 mL de urina para um balão volumétrico de 250 mL e ajustou-se o volume do balão com água Milli Q;
- b) transferiu-se uma alíquota de 5,0 mL da urina diluída para um tubo de ensaio. A ele adicionou-se 2,5 mL de solução de picrato alcalino e homogeneizou-se a solução resultante. Paralelamente, preparou-se uma solução com 5,0 mL de água Milli Q e 2,5 mL 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 525 nm, 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 e análise das amostras coletadas na cidade de Ipatinga-MG. Inicialmente estão abordados os dados referentes ao método otimizado e sua validação e, em seguida, os dados referentes às concentrações de ATTM urinário dos diferentes grupos amostrados.

Para auxiliar no tratamento dos dados foram utilizados 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  $\mu\text{m}$ ) e o método empregado utilizou coluna C18 (150 x 2,0 mm; 3,2  $\mu\text{m}$ ). 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 suportado por ela e para não haver 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.

Para identificação dos picos referentes ao ATTM, inicialmente foram realizadas análises de soluções aquosas de padrão para definir seu tempo de retenção. 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 de arranjo de diodos permitiu que fossem comparados os espectros de absorção UV-vis do ATTM na solução padrão e na amostra, auxiliando e conferindo confiança na identificação desses picos. Ainda assim, havendo necessidade, as amostras poderiam sofrer uma contaminação com padrão de ATTM, a fim de se confirmar qual dos picos apresentaria modificação no cromatograma. Os cromatogramas da Figura 4.1 demonstram como a identificação dos picos foi realizada. Através dos espectros de absorção UV-vis do ATTM na solução padrão foi possível definir o comprimento de onda de máxima absorção utilizado na detecção para obtenção dos cromatogramas, ou seja, 264nm.

Antes de se 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<sup>-1</sup> 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 ficou maior, 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 visíveis no cromatograma nem na área do pico. Outra condição testada foi a de utilizar ácido acético 3% e volume de 5 mL para lavagem do cartucho de extração. Essa medida acarretou em uma perda total do sinal referente ao ATTM, ou seja, nenhum pico foi detectado no cromatograma. O ATTM foi totalmente carregado e perdido durante o processo de lavagem sob essas condições. Dessa forma, optou-se por utilizar as condições já utilizadas na literatura científica de 3 mL de ácido acético 1% na etapa 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. Para a confecção dessa última, utilizou-se o mesmo tratamento de extração que as amostras.

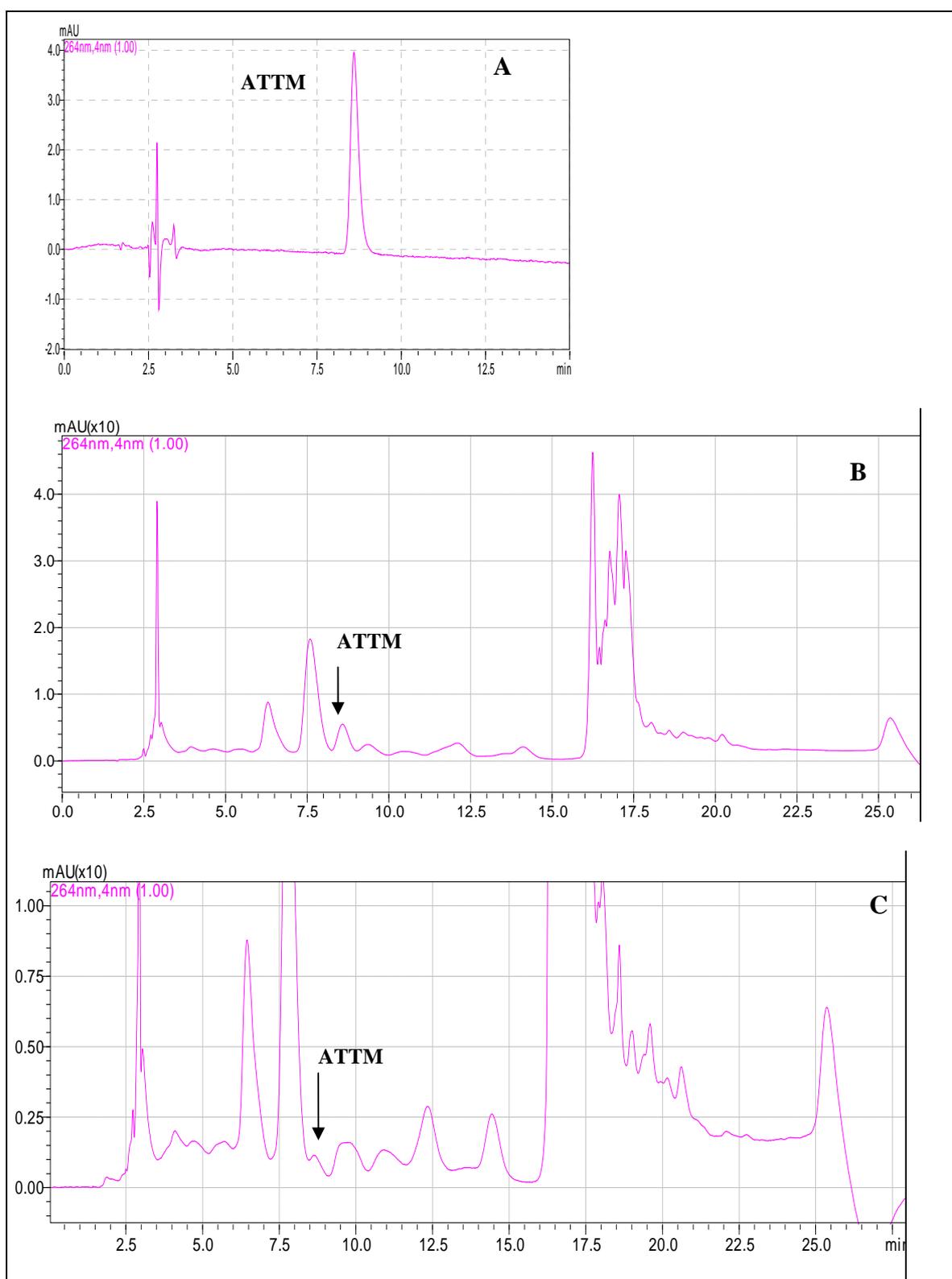


Figura 4.1 – Cromatogramas mostrando picos de ATTM em diferentes amostras: A) padrão de  $500 \mu\text{g.L}^{-1}$ , em fase aquosa, com tempo de retenção de 8,7 minutos; B) amostra fortificada com padrão de  $500 \mu\text{g.L}^{-1}$ ; e C) amostra *in natura*.

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.

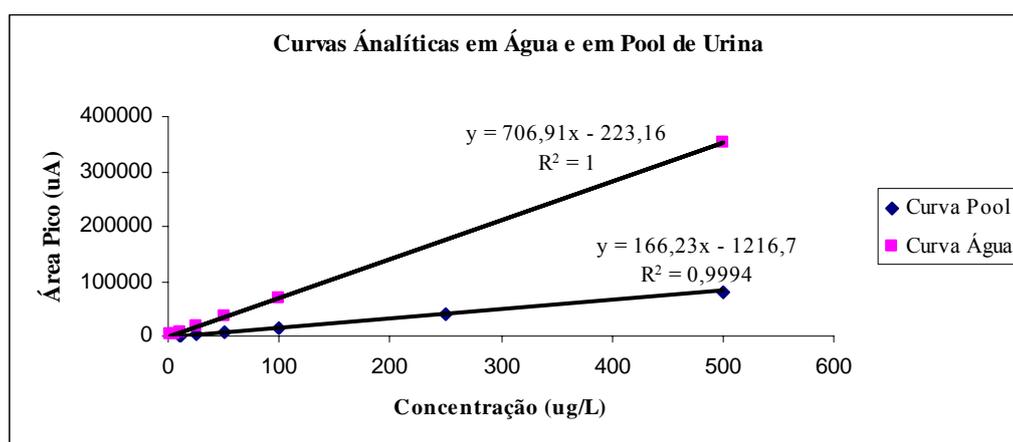


Figura 4.2 – Comparação entre Curvas Analíticas confeccionadas em água e em pool de urina.

#### 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  $\mu\text{g.L}^{-1}$  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).

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 6 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. Para quantificar essas amostra a curva foi estendida a concentrações superiores, acrescentando-se mais pontos à sua extremidade

de modo às concentrações do ATTM dessas amostras ficarem dentro do intervalo da curva analítica. Isso foi feito sem que a curva perdesse a linearidade.

#### 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, considerando para o LD a relação 3:1, e para o LQ a relação 10:1. Para essas determinações foram consideradas as áreas dos ruídos dos cromatogramas obtidos da injeção de cinco amostras 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. Para cada cromatograma foi calculada a média das três áreas selecionadas, e então, determinou-se a concentração de ATTM relacionada 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 4.1.

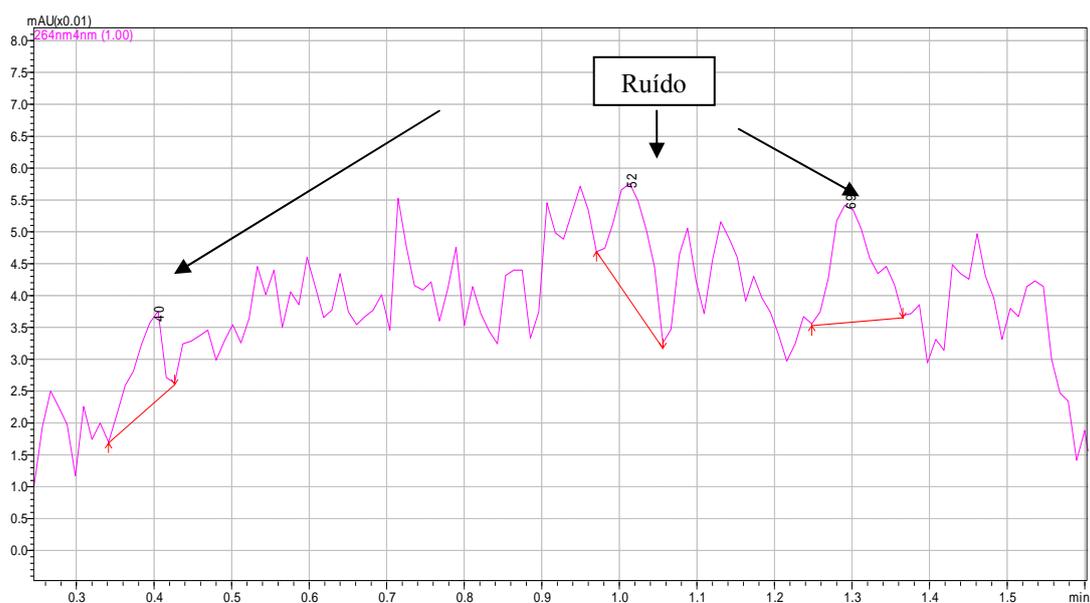


Figura 4.3 – Cromatograma ampliado mostrando a linha de base e picos considerados ruídos com suas respectivas áreas.

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

Tabela 4.1 – 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 da repetibilidade, de acordo com a equação 3.1, dos resultados 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 4.2, e estão dentro do limite aceitável de 20% de variação para precisão segundo Ribani *et al.* (2004).

Tabela 4.2 – 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 Recuperação

O estudo de recuperação do método 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 4.3. 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 trabalhos científicos de autores que utilizaram o mesmo método de extração para promover o *clean up* das amostras e citam porcentagens de recuperação elevadas, como o próprio 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 4.3 – 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 4.4. 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 4.5 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 mg.L<sup>-1</sup> ou menores que 0,3 mg.L<sup>-1</sup> 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, chegando um total de 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 µg.g<sup>-1</sup> de creatinina. A Tabela 4.6 mostra a estatística descritiva dos resultados de ATTm urinário válidos.

Tabela 4.4 – Dados meteorológicos da cidade de Ipatinga referentes aos dois períodos de amostragem.

DADOS METEOROLÓGICO DOS PERÍODOS DE AMOSTRAGEM							
DIA	Temperatura ( °C )				Umidade Relativa (%)	Precipitação (mm)	
	Mínima	Média	Máxima	Máx Sol		Diária	Acumulada
Primeira Campanha - Janeiro 2008							
10	20,1	23,6	28,1	31	62	0,4	15,8
11	21,2	26,3	31,4	38	63	3,2	19,1
12	21,9	26,1	30,6	39	63	0,0	19,1
13	22,9	26,1	31,2	41	63	0,0	19,1
14	21,2	25,5	29,7	39	63	0,0	19,1
15	20,3	24,5	30,7	40	63	0,0	19,1
16	22,2	26,0	30,6	38	63	0,0	19,1
17	22,6	25,1	32,1	37	64	2,3	21,4
Segunda Campanha - Maio 2008							
22	14,4	20,6	28,8	41	67	0,2	6,9
23	14,5	20,2	28,3	38	70	0,0	6,9
24	14,2	20,5	28,7	40	72	0,0	6,9
25	14,6	20,1	27,5	38	76	0,0	6,9
26	15,5	21,3	28,9	39	75	0,0	6,9
27	16,5	21,8	28,2	42	73	0,0	6,9
28	16,9	21,3	27,8	39	74	0,0	6,9
29	14,9	20,9	27,8	38	76	0,0	6,9

Fonte: Dados cedidos pela Usiminas

Tabela 4.5 – Caracterização dos voluntários quanto ao sexo e à exposição ao cigarro.

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

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

Tabela 4.6 – Estatística descritiva para os resultados de ATTM urinário das duas campanhas, em  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  creatinina

Dados	N	Média	Erro Padrão	Desvio Padrão	Valor Mínimo	1° Quartil	Mediana	3° Quartil	Valor Máximo
1 <sup>a</sup> Campanha	95	112	22,8	223	1,0	25,4	49,5	107	1868
2 <sup>a</sup> 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 o valor-p (*p value*) calculado para cada teste estatístico. Se o valor-p de um teste estatístico for menor que o seu alfa, deve-se rejeitar a hipótese nula, que nesse caso é a igualdade dos grupos testados.

Os dados relativos às duas campanhas de amostragem foram submetidos a teste de variância de acordo com o exposto na Figura 4.5 a seguir. O Teste de Levene para esse grupo de amostras apresentou valor-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.

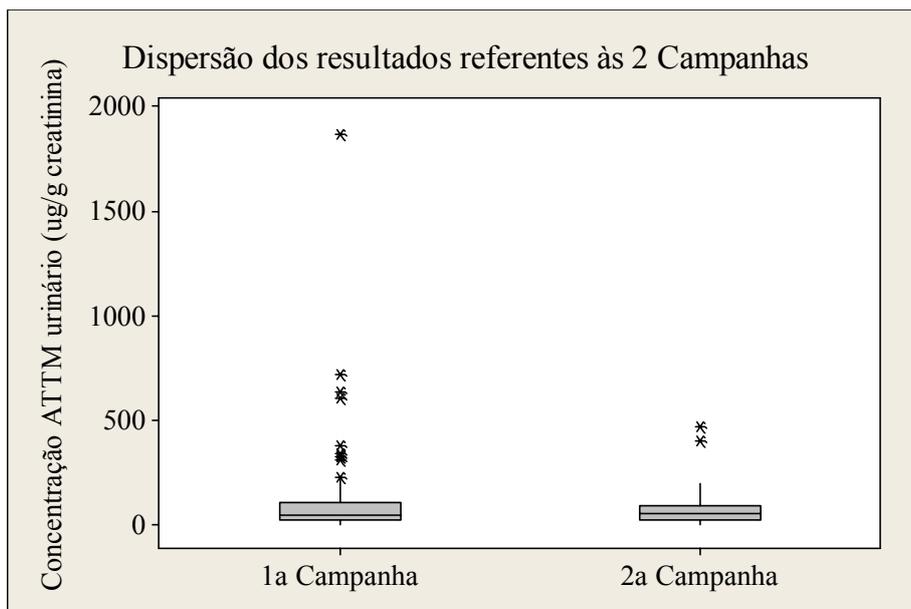


Figura 4.4 – Boxplot dos dados referentes às duas campanhas de amostragem.

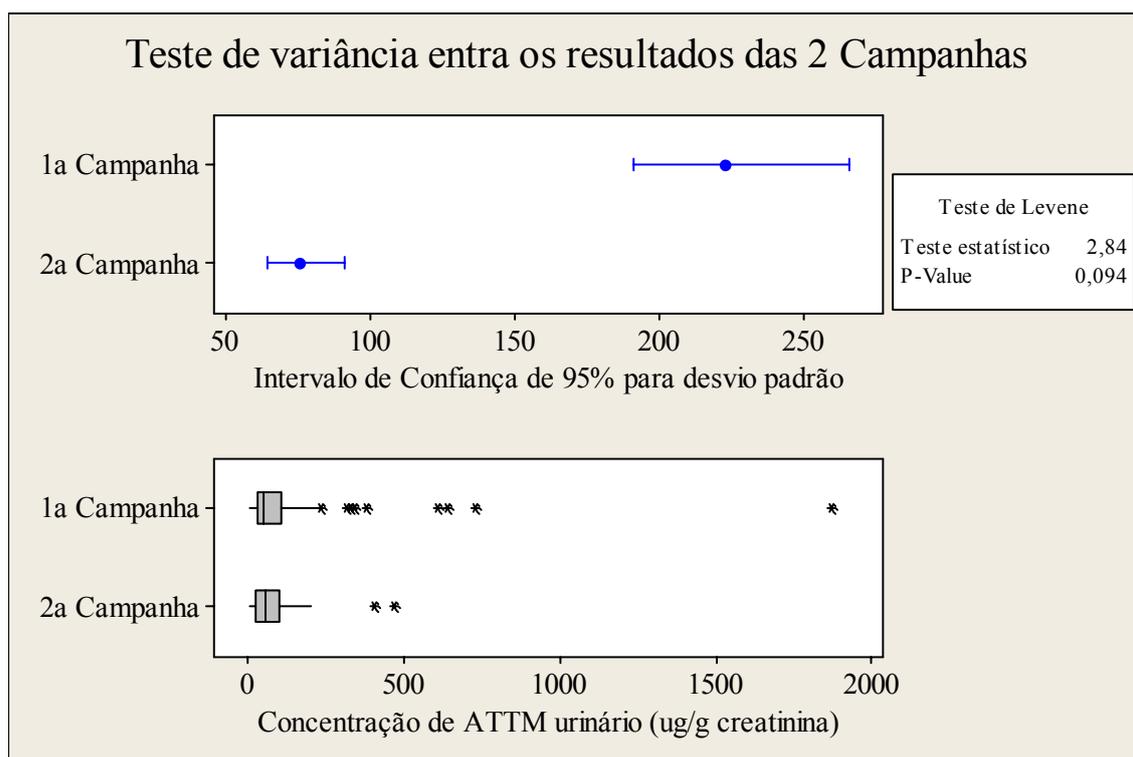


Figura 4.5 – Resultados do teste de variância realizado entre os dados das duas campanhas de amostragem

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 4.7 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 valor-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 não ter sido expressivamente superior que a mesma média para o período de estiagem, de forma que não houve lavagem da atmosfera como se esperava avaliar. Segundo comentários dos próprios voluntários, o período que compreendeu a primeira campanha de amostragem estava sendo considerado um período atípico em relação aos níveis de 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 4.7 – Estatística descritiva para os resultados de ATTM urinário das duas campanhas, em  $\mu\text{g.g}^{-1}$  creatinina, sem *outliers*.

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

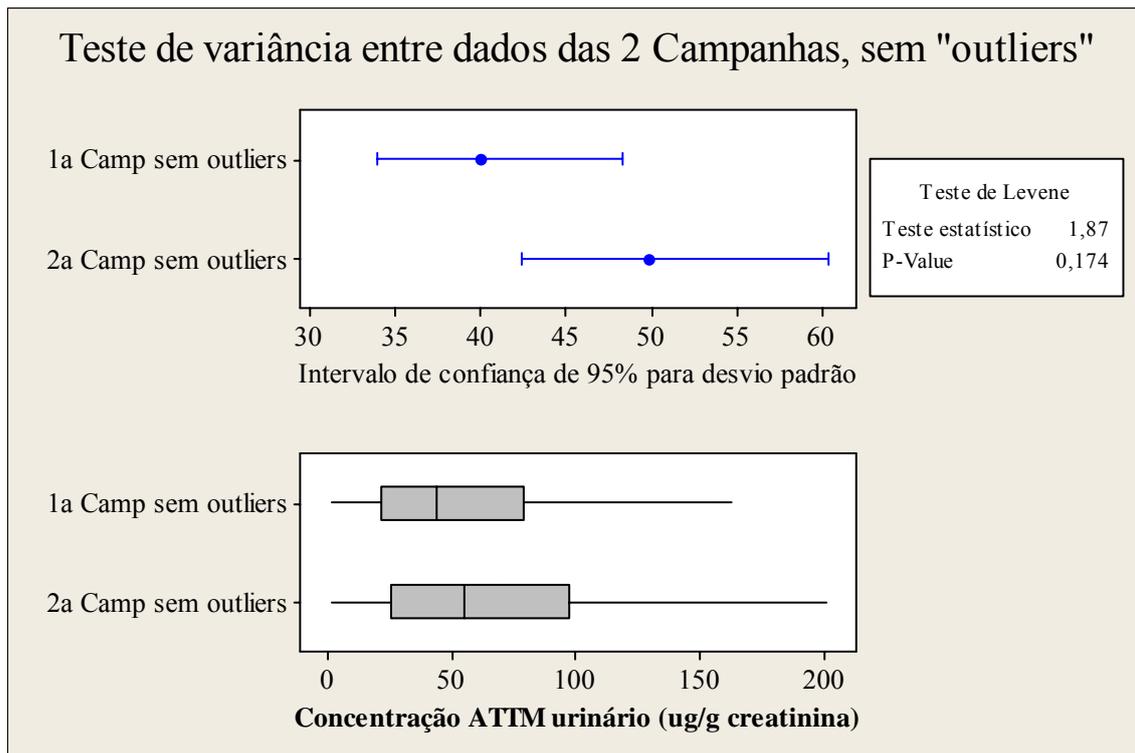


Figura 4.6 – Resultados do teste de variância realizado entre os dados das duas campanhas de amostragem sem os dados considerados *outliers*.

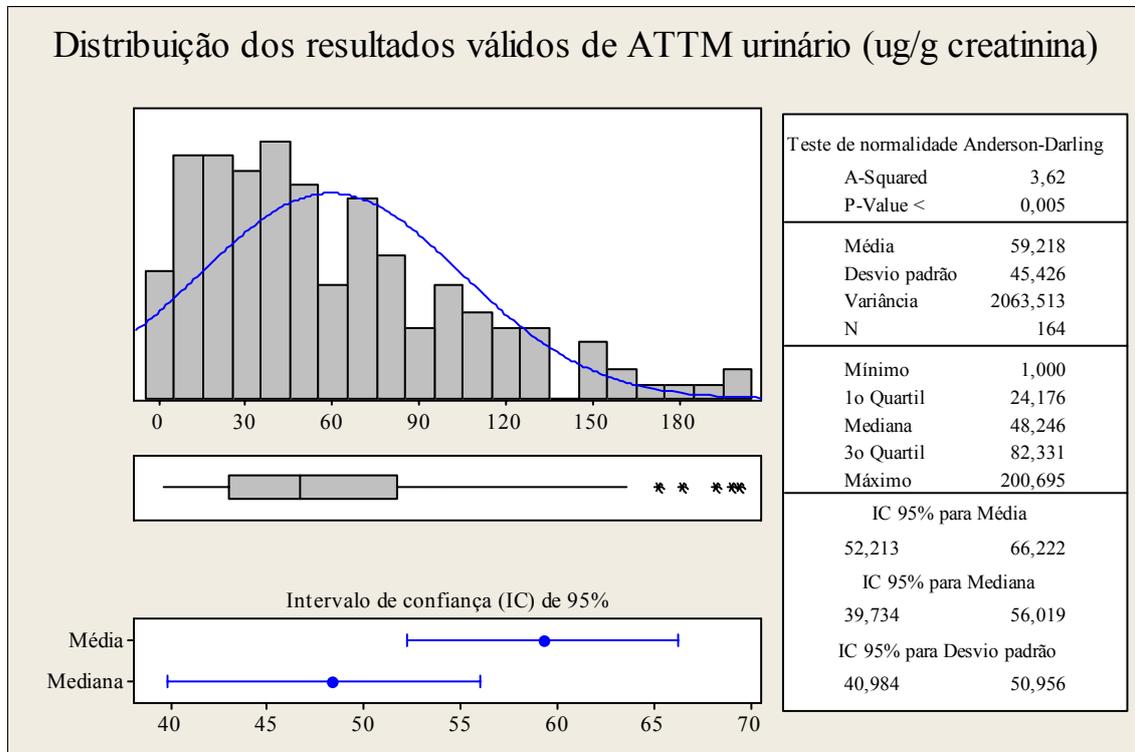


Figura 4.7 – Gráfico de distribuição dos resultados de ATTm urinário ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de creatinina) sem *outliers*.

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 ao cigarro. Os valores encontrados na literatura para esses grupos variam bastante, conforme exemplos mostrados na Tabela 4.8 a seguir. 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 a cigarro e outros fatores ambientais, localização de residência.

Tabela 4.8 – Exemplos de concentrações de ATTM urinário encontrados na literatura.

Grupo	Concentração ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ de creatinina)	Autor
Não Fumantes	10	Menezes et al. (2008)
Controle	39	Manini et al. (2008)
Crianças e adolescentes	88	Schroijsen et al. (2008)
Criança área urbana	120	Buthbumrung et al. (2008)
Criança área rural	60	
Controle	40	Chanvaivit et al. (2007)
Controle em área urbana	100	Lin et al. (2006)
Controle em área rural	40	
Não fumantes	240	Wiwanitkit et al. (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 4.9.

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 4.9 – 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	20,2	51,5	108	198
Sítio 2	54	68,5	6,2	45,2	1	34,2	62,8	93,8	200
Sítio 3	37	34,8	5,8	35,1	1	13,1	24,8	44,5	162
Sítio 4	29	63,4	7,0	37,8	9,34	37,8	58,1	79,2	156

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.

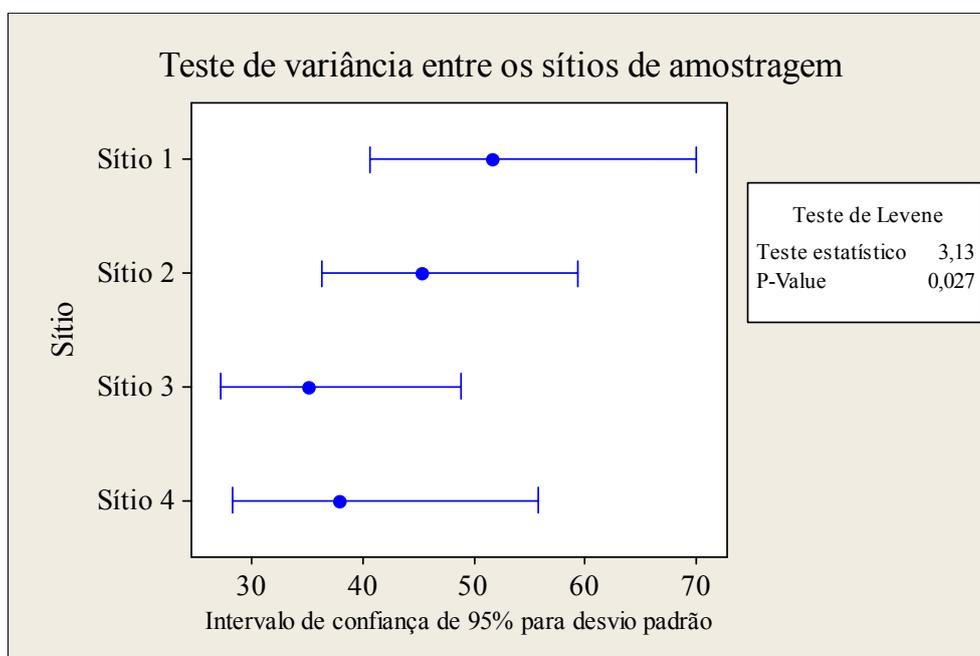


Figura 4.8 – Teste de variância para os resultados de ATTM urinário ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de creatinina) entre os diferentes sítios de amostragem.

O Teste de Levene entre os diferentes sítios de amostragem apresentou valor-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 por 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). Os dois autores estudaram diferentes sítios em uma mesma região e não conseguiram evidenciar diferenças estatísticas para os resultados de ATTm urinário. 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 utilizam como voluntários apenas crianças e adolescentes enquanto que nesse trabalho foram avaliados apenas indivíduos adultos.

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, a estatística descritiva básica foi refeita, conforme Tabela 4.10, e um novo teste de variância realizado, conforme gráfico da Figura 4.10.

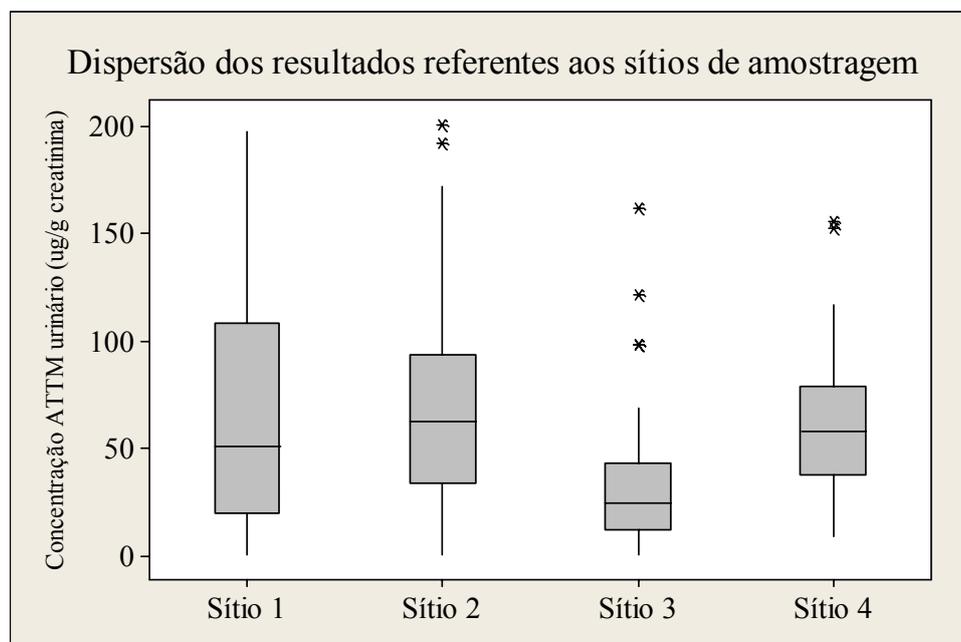


Figura 4.9 – Dispersão dos resultados de ATTm urinário ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de creatinina) para os diferentes sítios de amostragem, evidenciando os *outliers* de cada grupo.

Tabela 4.10 – Estatística Estatística descritiva para os resultados de ATTM urinário ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  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	20,2	51,5	108	198
Sítio 2	51	61,4	4,9	35,2	1	31,9	59,5	85,6	146
Sítio 3	32	23	2,6	14,9	1	12,5	53,7	33,1	55,3
Sítio 4	27	56,6	5,6	29,2	9,34	37,5	37,5	78	117

Sítio 1 = Com influência direta das coqueiras.

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

Sítio 3 = Com influência de tráfego automotivo.

Sítio 4 = Considerado como branco.

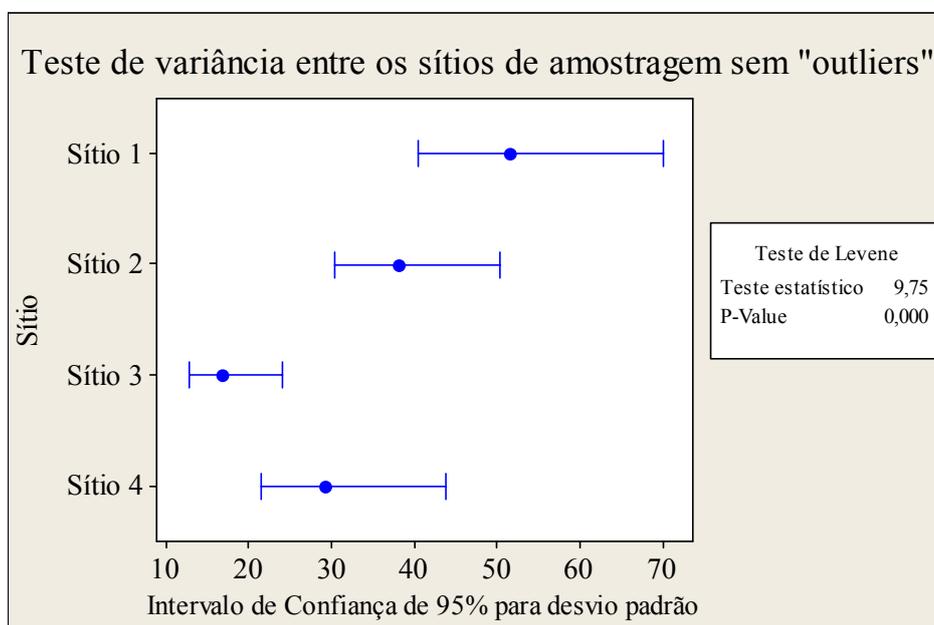


Figura 4.10 – Teste de variância para os resultados de ATTM urinário ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de creatinina) entre os diferentes sítios de amostragem, sem os dados *outliers*.

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. Devido a esse resultado, foram realizados testes de variância específicos entre os Sítios 1, 2 e 3 como o Sítio 4. Estes testes mostraram que, para intervalo de confiança de 95% ( $\alpha = 0,05$ ), tanto o Sítio 1 (valor-p=0,012) quanto o Sítio 3 (valor-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 (valor-p=0,270) não foi observada essa diferença.

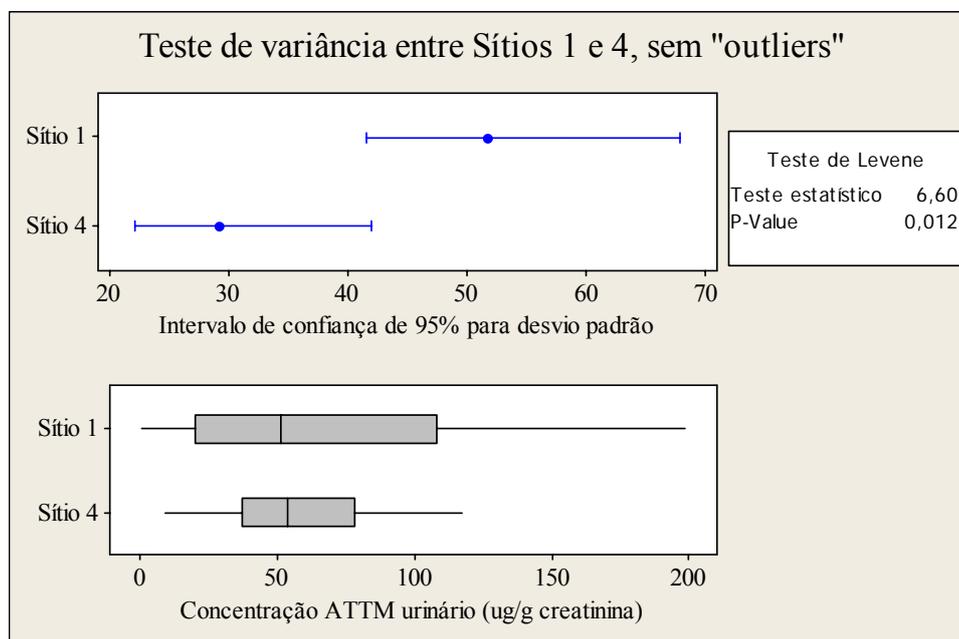


Figura 4.11 – Teste de variância entre os Sítios 1 e 4, sem os dados considerados *outliers*.

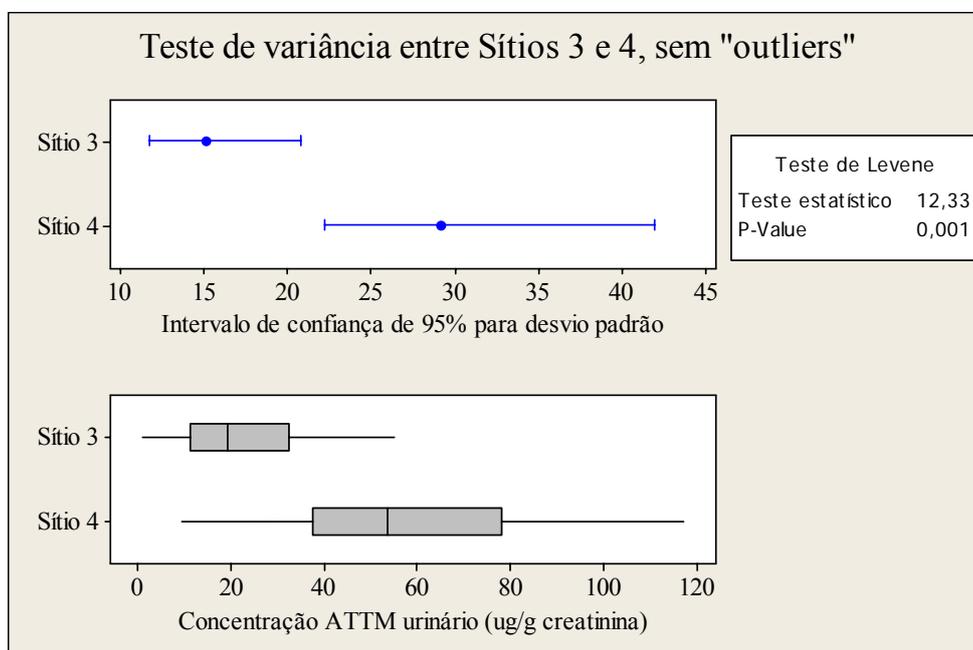


Figura 4.12 – Teste de variância entre os Sítios 3 e 4, sem os dados considerados *outliers*.

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 em volume muito menor. Isso mostra que as emissões das coqueiras atingem o Sítio 1 de forma muito mais efetiva que o Sítio 2, o que acabou sendo evidenciado pelos resultados de ATTM urinário dos 2 sítios, visto que a outra fonte que o atinge, emissões automotivas, não influenciou nos resultados de ATTM urinário para essa pesquisa, conforme pode ser visto em relação aos resultados encontrados para o Sítio 3.

O Sítio 3 foi o considerado sob 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 representou condição de elevação nas concentrações de ATTM urinário. Ao contrário, o que foi observado foi uma diferença estatística significativa entre o Sítio 3 e o Sítio 4, branco, de maneira inversa, da forma que os resultados encontrados para o branco foram maiores que os encontrados no sítio que se propunha avaliar as emissões automotivas. O Sítio 2, que recebe as emissões devido ao tráfego e também das coqueiras, não apresentou diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de ATTM urinário das amostras coletadas nesse sítio e aquelas de um sítio considerado branco, confirmando que para essa pesquisa as emissões automotivas não influenciaram nos resultados de ATTM urinário.

Na literatura científica é muito comum encontrar trabalhos que conseguem diferenciar grupos que recebem emissões de veículos, ou seja, expostos ao trânsito automotivo, de 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 expostos de forma direta à fonte considerada durante várias horas seguidas. Os Sítios 2 e 3 são áreas onde o trânsito de automóveis é mais acentuado que nos outros sítios, porém todos os 4 Sítios localizam-se 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 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 todos 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 4.11 e dos testes de variância nas Figuras 4.14 e 4.15 a seguir.

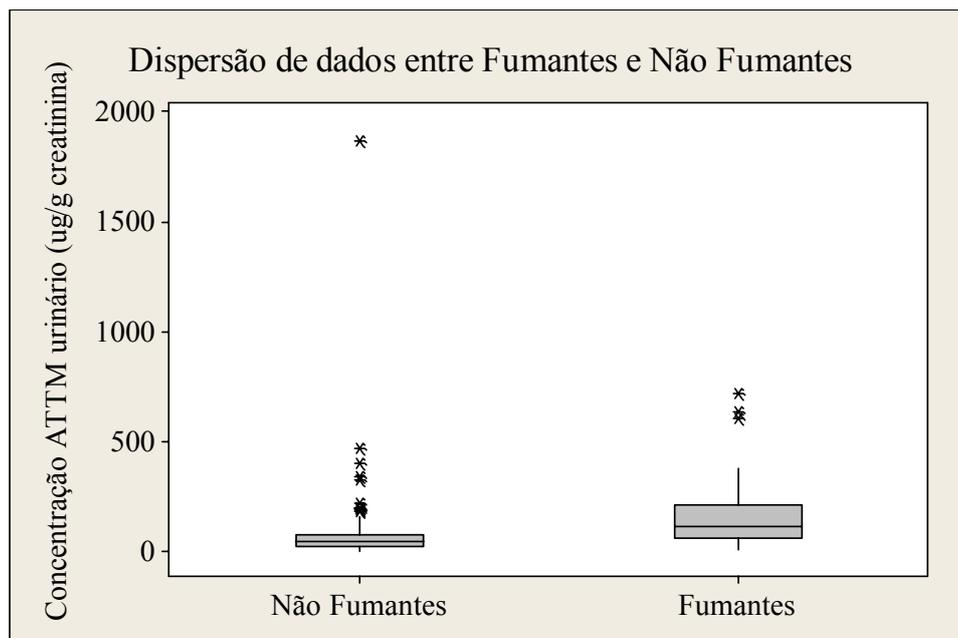


Figura 4.13: Boxplot dos dados agrupados em fumantes e não fumantes.

Tabela 4.11 – Estatística descritiva para os resultados de ATT<sub>M</sub> 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	1º Quartil	Mediana	3º Quartil	Valor Máximo
F	20	197	48,3	216	6,8	63,1	117	211	723
F sem OL	16	99,0	15,7	63,0	6,8	55,7	98,5	143	218
NF sem OL	126	48,2	3,14	35,2	1,0	20,4	39,4	68,3	153

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

Os resultados do Testes de Levene para as duas situações expostas na 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 o cigarro possui benzeno em sua composição. Esses resultados estão de acordo com resultados de inúmeros autores que também encontraram correlação entre concentrações de ATT<sub>M</sub> urinário e hábito de fumar (Manini *et al.*, 2008; Menezes *et al.*, 2008; Scherer *et al.*, 2007; Wiwanitkit, 2005, Coutrim, 1998).

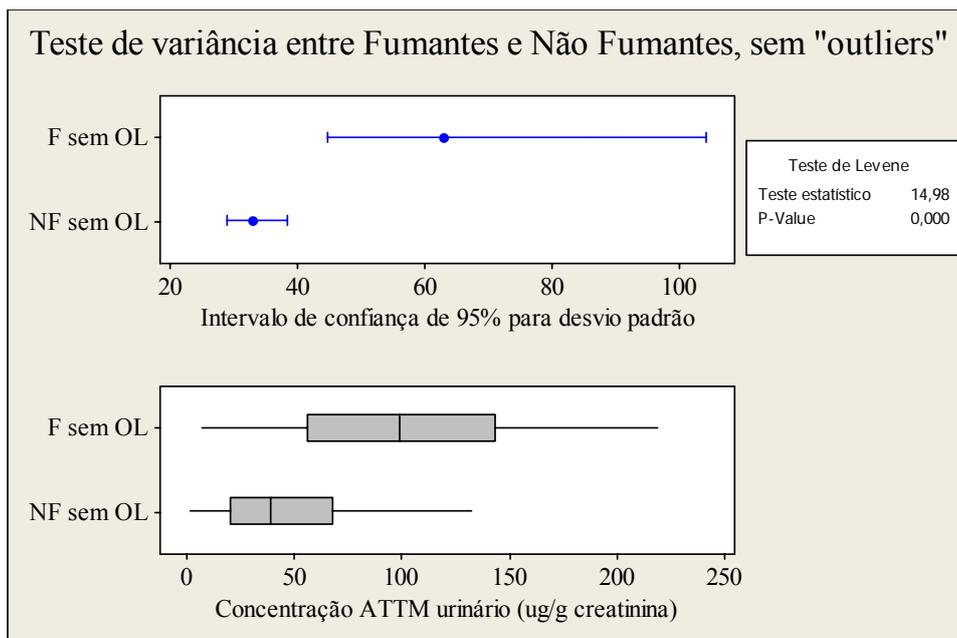


Figura 4.14 – Teste de variância entre Fumantes e Não Fumantes, desconsiderando todos *outliers* calculados para os dois grupos. (Legenda: F sem OL -Fumantes sem *outliers*. NF sem OL – Não Fumantes sem *outliers*).

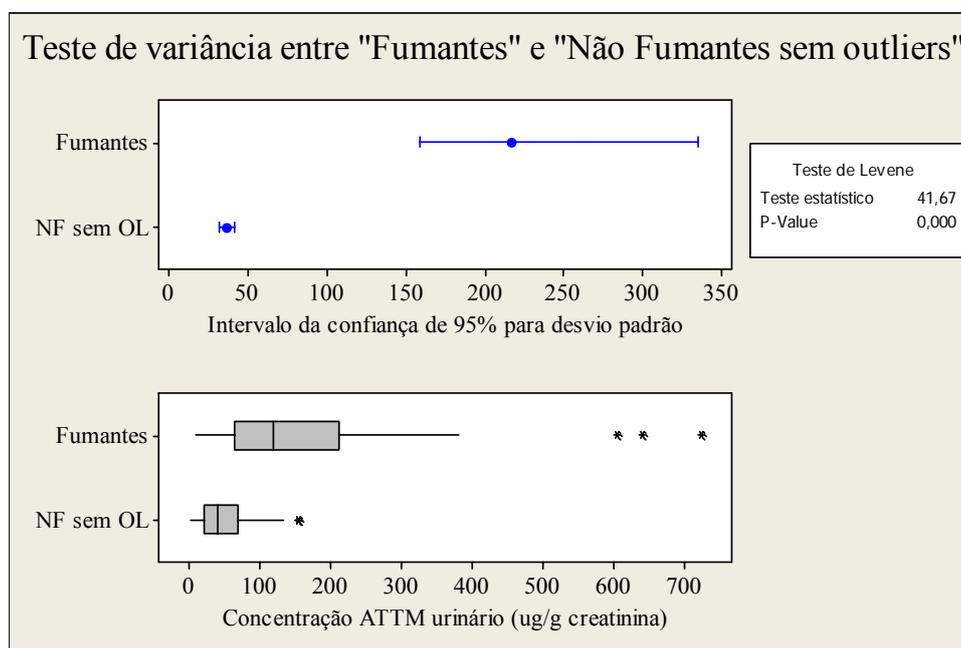


Figura 4.15 – Teste de variância entre Fumantes e Não fumantes, desconsiderando os *outliers* apenas do grupo Não Fumantes (Legenda: NF sem OL – Fumantes sem *outliers*).

### 4.2.3 Relação entre ATTM urinário e sexo

Também foi realizada uma comparação de resultados entre voluntários do sexo feminino e masculino para se avaliar se o sexo pode influenciar nas concentrações de ATTM urinário. Os resultados da estatística descritiva básica para esses grupos estão na Tabela 4.12. Foram realizados testes de variância entre os grupos Feminino e Masculino Não Fumantes, cujo valor-p=0,085, para intervalo de confiança de 95%, e entre os grupos Feminino e Masculino Fumantes,

Tabela 4.12 – Estatística descritiva resultados de ATTM urinário ( $\mu\text{g.g}^{-1}$  de creatinina) entre sexos, 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	80,7	166
MNF	26	48,3	5,7	33,6	1,0	21,0	39,9	69,4	133
F F	11	275	79,4	263	6,8	78,5	147	604	723
M F	9	101	24,2	72,7	11,3	35,7	94,1	162	218

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 a seguir, ao nível de confiança de 95% não foi encontrada diferença estatística significativa entre os sexos, nem considerando os fumantes. Porém, de acordo com os valores de p encontrados,  $p=0,085$  e  $p=0,074$  entre não fumante e fumantes respectivamente, é possível afirmar que essa diferença é significativa ao nível de confiança de 90% ( $\alpha = 0,10$ ).

Esses resultados confirmam pesquisas encontradas na literatura que também mostram essa tendência de maiores concentrações de ATTM urinário entre voluntários do sexo feminino. 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).

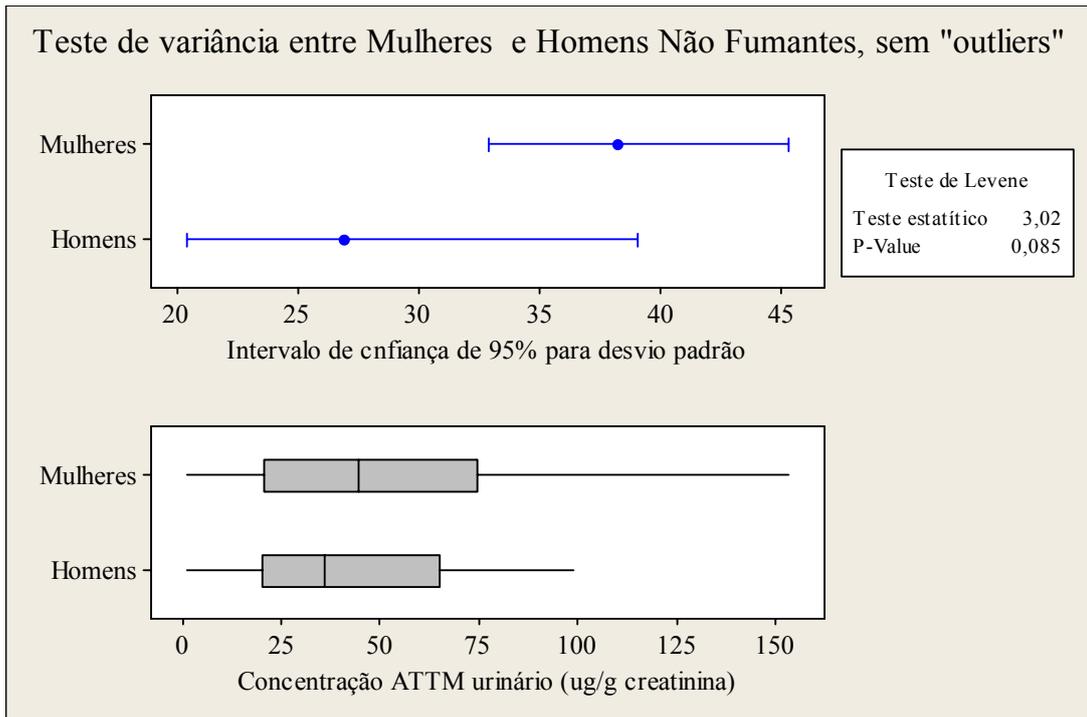


Figura 4.15 – Teste de variância entre resultados de ATTm urinário ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de creatinina) de voluntários do sexo feminino e masculino fumantes.que são não fumantes.

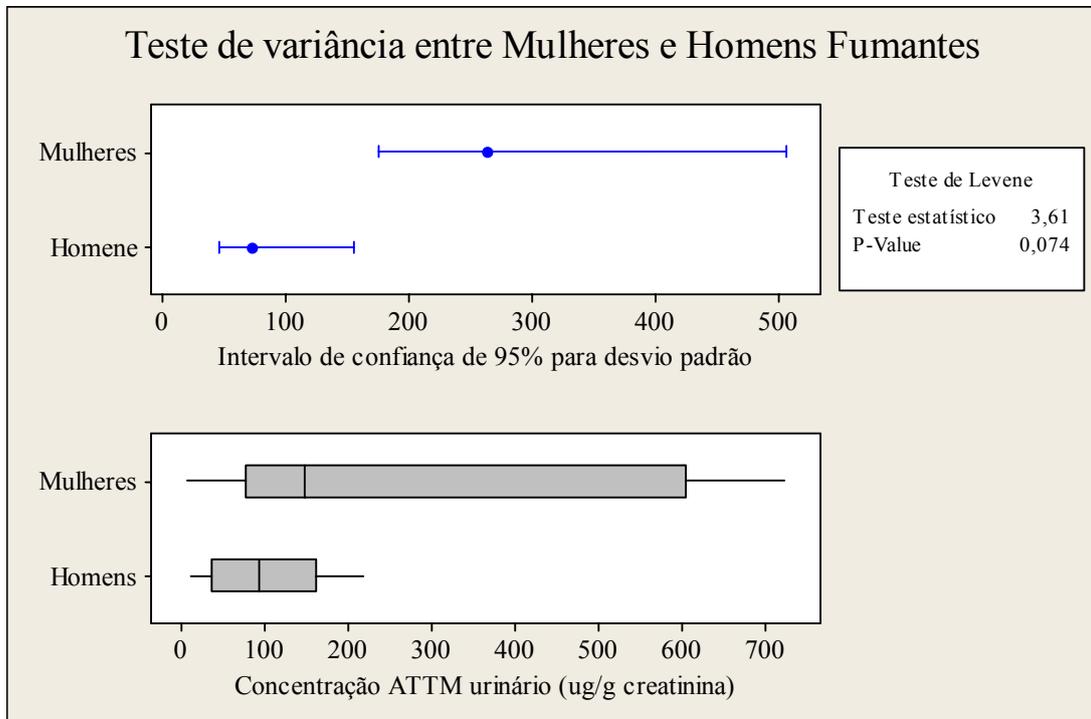


Figura 4.16 – Teste de variância entre resultados de ATTm urinário ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de creatinina) de voluntários do sexo feminino e masculino fumantes.que são fumantes.

#### **4.2.4 Relação entre ATTM urinário e benzeno atmosférico**

Nessa pesquisa não foi possível fazer avaliação de concentrações de benzeno atmosférico. 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 duas concentrações. 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 de benzeno no ar com concentrações urinárias de ATTM. Para os cálculos ela recomenda admitir valor médio de creatinina de 1,2 mg de creatinina/L de urina. O menor valor de correlação existente nessa tabela é de 1,3 mg de ATTM/g creatinina (1,6 mg ATTM/L urina) correspondendo a 2,0 mg.m<sup>-3</sup> de benzeno no ar (0,6 ppm). Considerando os baixos valores de AMTT 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 4.13 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 4.13: 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 <sup>-1</sup> Cr	12,9 µg.m <sup>-3</sup>	Controle (monges e freiras)	
0,095 mg.g <sup>-1</sup> Cr	22,6 µg.m <sup>-3</sup>	Vendedor de Roupa	Navasumrit <i>et al.</i> , 2005
0,080 mg.g <sup>-1</sup> Cr	28,2 µg.m <sup>-3</sup>	Vendedor de Rua	
52 µg.L <sup>-1</sup>	6 µg.m <sup>-3</sup>	Controle	
147 µg.L <sup>-1</sup>	22 µg.m <sup>-3</sup>	Policiais de Transito	Fustinoni, <i>et al.</i> , 2005
95 µg.L <sup>-1</sup>	61 µg.m <sup>-3</sup>	Frentistas	
1,08 µmol.L <sup>-1</sup>	4,07 ppb	Controle	Kim <i>et al.</i> , 2006
12,13 µmol.L <sup>-1</sup>	1,17 ppm	Trabalhadores fábrica sapatos	
171 µg.g <sup>-1</sup> Cr	0.044 mg.m <sup>-3</sup>	Frentistas	Carrieri <i>et al.</i> , 2006
114 µg.g <sup>-1</sup> Cr	5,9 µg.m <sup>-3</sup>	Motoristas taxi	Manini <i>et al.</i> , 2006
0,06 mg.g <sup>-1</sup> Cr	8,1 µg.m <sup>-3</sup>	Crianças área Rural	Ruchirawat <i>et al.</i> , 2007
0,12 mg.g <sup>-1</sup> Cr	17,7 µg.m <sup>-3</sup>	Crianças área Urbana	
41,8 µg.g <sup>-1</sup> Cr	6,1 µg.m <sup>-3</sup>	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 relacionada 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 encontrado pode ser atribuído a algum fator de característica própria do metabolismo deste indivíduo e essa verificação só é possível 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.

Não foi possível fazer correlações entre as concentrações de ATTM urinário e benzeno atmosférico porque nessa pesquisa não foram determinadas as concentrações desse último na zona de respiração dos voluntários. Porém, 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 BIBLIOGRÁFICAS

---

- ABIQUIM, Associação Brasileira de Indústria Química, [http://www.abiquim.org.br/pdfs/ele\\_50\\_impexp\\_2008.pdf](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=BENZENO](http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia/produtos/ficha_completa1.asp?consulta=BENZENO) (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](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 Dyestuffs, 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](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.

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 da Usiminas e da Fundação São Francisco Xavier. O estudo prevê a participação da população da cidade de Ipatinga. 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 da cidade de Ipatinga-MG. 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

Ipatinga, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

## **ANEXO II**



## QUESTIONÁRIO N<sup>o</sup>.....

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 (ug.L <sup>-1</sup> )	Concentração Creatinina (g.L <sup>-1</sup> )	Concentração ATTM (µg.g <sup>-1</sup> 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 (ug.L <sup>-1</sup> )	Concentração Creatinina (g.L <sup>-1</sup> )	Concentração ATTM (µg.g <sup>-1</sup> 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 ( $\text{g.L}^{-1}$ )	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 ( $\text{g.L}^{-1}$ )	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 0,3 g/L

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

S/RV = sem valor válido

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)