

BIBLIOTECA  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Universidade de São Paulo

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e  
Análises Toxicológicas

***PATRÍCIA MIRANDA DE FARIA***

***Avaliação da exposição ocupacional aos  
Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs) em  
uma usina de asfalto***

São Paulo

2003

17669

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e  
Análises Toxicológicas

*Avaliação da exposição ocupacional aos  
Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs)  
em uma usina de asfalto*

*Patrícia Miranda de Faria*

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientador:  
Prof. Dr. Henrique Vicente Della Rosa

São Paulo  
2003

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e  
Análises Toxicológicas

*Avaliação da exposição ocupacional aos  
Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs)  
em uma usina de asfalto*

*Patrícia Miranda de Faria*

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientador:  
Prof. Dr. Henrique Vicente Della Rosa

São Paulo  
2003

---

**Ficha Catalográfica**  
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e  
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

F224a Faria, Patricia Miranda de  
Avaliação da exposição ocupacional aos hidrocarbonetos  
aromáticos policíclicos (HAPs) em uma usina de asfalto /  
Patricia Miranda de Faria. -- São Paulo, 2003.  
162p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises  
Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Della Rosa, Henrique Vicente

1. Toxicologia ocupacional 2. Análise toxicológica 3.  
Hidrocarboneto : Toxicologia I. T. II. Della Rosa, Henrique  
Vicente, orientador.

615.902 CDD

*Patrícia Miranda de Faria*

*Avaliação da exposição ocupacional aos  
Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs)  
em uma usina de asfalto*

Comissão Julgadora  
da  
Tese para obtenção do grau de Doutor

---

Prof. Dr. Henrique Vicente Della Rosa

Orientador/Presidente

---

Prof. Dr. Sérgio Colacioppo  
1º examinador

---

Profa. Dra. Lys Esther Rocha  
2º examinador

Profa. Dra. Silvia Berlanga M. Barros  
3º examinador

---

Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento  
4º examinador

São Paulo, 12 de agosto de 2003.

*“Cada pessoa, em sua existência, pode ter duas atitudes: construir e plantar. Os construtores podem demorar anos em suas tarefas, mas um dia terminam aquilo que estavam fazendo. Então param e ficam limitados por suas próprias paredes. A vida perde o sentido quando a construção acaba. Mas existem os que plantam. Estes às vezes sofrem com as tempestades, as estações e raramente descansam. Mas, ao contrário de um edifício, o jardim jamais para de crescer. E, ao mesmo tempo em que exige a atenção do jardineiro, também permite que, para ele, a vida seja uma grande aventura. Os jardineiros se reconhecerão entre si – porque sabem que na história de cada planta está o crescimento de toda a Terra”.*

---

***A Deus***

***Pela constante presença em minha vida***

***Ao Neto***

***Pelo exemplo de força e perseverança  
Por ser luz em minha vida***

***Todo o meu amor e gratidão***



*Aos meus pais Sinésio e Stella*

*Que me deram a vida e me indicaram os caminhos*

---

*Ao Prof. Dr. Henrique V. Della Rosa*

*Pela valiosa orientação,  
ensinamentos e confiança*

## AGRADECIMENTOS

A *Profa. Dra. Rosemary Custódio Pedroso* responsável pela orientação de Mestrado, pelo meu amadurecimento acadêmico;

A coordenadora do programa de pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, *Profa. Dra. Silvia Berlanga M. Barros* e à vice-coordenadora, *Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento*, pela oportunidade e apoio;

Aos professores do programa de pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, pelos ensinamentos recebidos;

Aos voluntários que participaram deste trabalho, pela valiosa colaboração;

Aos professores *Dr. Sérgio Colacioppo* e *Dra. Elizabeth de Souza Nascimento*, pelas sugestões dadas no exame de qualificação;

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela bolsa de estudos concedida;

A *Dra. Dulce Santana Bassi Argani*, *Odete de Souza Reis* e *Maria Aparecida Lhamas*, pela preciosa colaboração durante a coleta das amostras;

A todos os amigos e colegas da pós-graduação, pelos bons momentos que passamos juntos;

Aos Funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas (USP), *Roseli*,

*Márcia, Maria de Lurdes, Dalva e Helena*, não somente pelo auxílio técnico prestado como também pelo carinho e apoio;

A amiga *Simone*, pelo carinho, pela amizade e por estar sempre presente;

A amiga *Isarita*, pelas valiosas discussões e o apoio constante;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho de pesquisa;

*Os meus sinceros agradecimentos.*

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS .....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xviii
RESUMO.....	xxiii
ABSTRACT.....	xxiv
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1. Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos .....	5
2.1.1. Propriedades físico-químicas .....	5
2.1.2. Toxicidade dos HAPs .....	8
2.1.3. Toxicocinética e toxicodinâmica .....	11
<i>Carcinogenicidade</i> .....	17
2.1.4. Fontes de exposição aos HAPs .....	20
2.2. Asfalto .....	23
2.3. Pireno e 1-hidroxipireno .....	32
2.4. Aspectos analíticos dos HAPs .....	36
3. OBJETIVOS .....	38
<i>Específico</i> .....	38
<i>Geral</i> .....	38
4. PLANO DE TRABALHO .....	39
5. MATERIAL E MÉTODO .....	41
5.1. Material .....	41
5.1.1. Amostras .....	41
5.1.1.1. Amostras de urina .....	41
5.1.1.2. Amostras de ar.....	42
5.1.2. Equipamentos, vidrarias e acessórios.....	45
5.1.3. Padrões e enzima.....	47
5.1.4. Reagentes e solventes.....	48

5.1.5. Soluções-padrão e fase móvel.....	49
1-hidroxi pireno.....	49
Pireno.....	49
5.2. Casuística .....	50
Avaliação preliminar .....	50
População estudada .....	51
5.3. Método .....	52
5.3.1. Otimização das condições cromatográficas .....	52
5.3.2. Preparação das amostras .....	52
5.3.3. Validação de parâmetros analíticos para a determinação do 1-hidroxi pireno em amostras de urina e do pireno nos filtros e tubos adsorventes expostos ao ar respirável .....	55
5.3.3.1. Robustez .....	56
5.3.3.2. Especificidade ou efeito da matriz.....	57
5.3.3.3. Limite de detecção.....	58
5.3.3.4. Limite de quantificação.....	58
5.3.3.5. Recuperação .....	59
5.3.3.6. Linearidade e curva de calibração.....	61
5.3.3.7. Estudo de precisão inter e intra ensaio.....	61
5.3.3.8. Exatidão.....	62
5.3.3.9. Estabilidade.....	63
5.3.4. Determinação da gravidade específica e da creatinina urinária .....	64
5.3.5. Determinação do 1-hidroxi pireno em amostras de urina de trabalhadores de uma usina de asfalto.....	64
5.3.6. Determinação do pireno nos filtros e tubos adsorventes expostos ao ar respirável pelos trabalhadores na usina de asfalto .....	64
5.3.7. Análise Estatística .....	65
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
Avaliação preliminar .....	66

---

<i>População estudada</i> .....	70
6.1. Otimização das condições cromatográficas .....	76
6.2. Preparação das amostras .....	87
6.3. Validação de parâmetros analíticos para a determinação do 1- hidroxipireno em amostras de urina e do pireno nos filtros e tubos adsorventes expostos ao ar respirável pelos trabalhadores na usina de asfalto .....	89
6.3.1. Robustez.....	89
6.3.2. Especificidade ou efeito da matriz.....	92
6.3.3. Limite de detecção e quantificação .....	94
6.3.4. Recuperação.....	98
6.3.5. Linearidade e curva de calibração.....	99
6.3.6. Estudo de precisão inter e intra ensaios .....	104
6.3.7. Exatidão.....	107
6.3.8. Estabilidade.....	108
6.4. Determinação da gravidade específica e da creatinina urinária .....	110
6.5. Determinação do 1-hidroxipireno em amostras de urina de trabalhadores de uma usina de asfalto.....	113
6.6. Determinação do pireno nos filtros e tubos adsorventes expostos ao ar respirável pelos trabalhadores na usina de asfalto .....	117
6.7. Análise estatística .....	122
7. CONCLUSÕES .....	129
8. RECOMENDAÇÕES .....	130
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	131
10. ANEXOS .....	157
Anexo I .....	158
Anexo II .....	161

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Fórmula estrutural de alguns HAPs .....	06
FIGURA 2 - Principais vias de biotransformação dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos .....	14
FIGURA 3 - Via de biotransformação do benzo(a)pireno com a formação de diol epóxido .....	18
FIGURA 4 - Regiões determinantes para a carcinogenicidade dos HAPs. M: região metabólica; E: região de atividade eletrofílica; L: região de destoxificação e K: região ambígua .....	19
FIGURA 5 - Esquema de destilação em uma torre de refino de petróleo com destaque a produção de asfalto .....	25
FIGURA 6 - Tanque isolado termicamente para o armazenamento de CAP, distribuído pela Petrobrás .....	26
FIGURA 7 - Silo térmico para armazenamento do asfalto produzido e para o abastecimento de caminhões utilizados no transporte do produto para a pavimentação.....	27
FIGURA 8 - Fórmula estrutura e peso molecular do pireno.....	32
FIGURA 9 - Bomba portátil (A) acoplada a uma resina adsorvente XAD (B) seguida de cassete opaco contendo o filtro de teflon (C).....	43
FIGURA 10 - Cassete opaco aberto (B e F) a fim de visualizar o seu conteúdo constituído de suporte (C), anel de separação (D) e filtro 37mm de PTFE (E) .....	44



FIGURA 11 - Local de liberação do asfalto produzido para o caminhão de distribuição. Ponto fixo no lado esquerdo do caminhão (local da cabine de controle). .....	45
FIGURA 12 - Fluxograma do método para a determinação de 1-hidroxi-pireno em amostras de urina (JONGENEELLEN, F.J. et al., 1987).....	54
FIGURA 13 - Fluxograma do método para a determinação do pireno coletado nos filtros e tubos adsorventes expostos ao ar respirável pelos funcionários da usina de asfalto (NIOSH, 1998).....	55
FIGURA 14 - Instalações prediais da usina de asfalto. ....	67
FIGURA 15 - Oficina mecânica, com portões localizados no lado esquerdo da figura. ....	69
FIGURA 16 - Galpão para depósitos de agregados asfálticos (pedras e pedregulhos), matéria-prima para a produção do asfalto.....	70
FIGURA 17 - Curva de calibração de solução-padrão de 1-hidroxi-pireno com detecção em DAD - UV (nm).....	77
FIGURA 18 - Curva de calibração de solução-padrão de 1-hidroxi-pireno com detecção em FLD (%F).....	78
FIGURA 19 - Cromatogramas representando o pico do 1-hidroxi-pireno nos diversos comprimentos de onda. DAD 242nm (azul), DAD 288 (vermelho), DAD 388 (verde) e FLD com $t_r = 8,042$ min (rosa), na concentração de 2,5 ng/mL. ....	80
FIGURA 20 - Cromatogramas em DAD - separação do naftaleno (NF) com tempo de retenção ( $t_r$ ) em 8,863 min. (1) e 1-OHP com $t_r$ em 9,383 min. (2) e em FLD - pico do 1-OHP com $t_r$ em 9,464 (3). Fluxo: 0,7 mL/min. Eixo y = %F e eixo x = minutos .....	81
FIGURA 21 - Cromatogramas em DAD - separação do naftaleno (NF) com tempo de retenção ( $t_r$ ) em 7,569 min. (1) e 1-OHP com $t_r$ em 7,986 min. (2) e	

- em FLD - pico do 1-OHP com tr em 8,059 (3). Fluxo: 0,8 mL/min. Eixo y = %F e eixo x = minutos ..... 81
- FIGURA 22 - Cromatogramas em DAD - separação do naftaleno (NF) com tempo de retenção (tr) em 6,541 min. (1) e 1-OHP com tr em 6,691 min. (2) e em FLD - pico do 1-OHP com tr em 6,769 (3). Fluxo: 0,9 mL/min. Eixo y = %F e eixo x = minutos ..... 82
- FIGURA 23 - Cromatograma representando os picos de naftaleno (1) na concentração de 1,0 ug/mL e 1-OHP na concentração de 120 ng/mL por DAD (2) e por FLD (3). ..... 84
- FIGURA 24 - Cromatograma representando o pico do naftaleno (1) na concentração de 1,0 ug/mL por DAD e o pico do 1-OHP na concentração de 80ng/mL detectado por FLD (2) ..... 84
- FIGURA 25 - Cromatograma representando o pico 1-OHP com tempo de retenção (tr) em 8,042 min., fluxo: 0,8 mL/min, detector de fluorescência e concentração de 2,5 ng/mL. Eixo y = %F e eixo x = minutos ..... 85
- FIGURA 26 - Cromatograma representando o pico do pireno, em solução de acetonitrila na concentração de 0,1075 µg/mL, detectado por DAD A 230nm (azul), DAD B 270nm (vermelho), DAD C 254nm (verde) e FLD (rosa). Eixo y = %F e eixo x = minutos..... 87
- FIGURA 27 - Cromatograma representando o pico do 1-hidroxipireno em amostra adicionada na concentração de 2,0 ng/mL (vermelho) em contraste a uma amostra de urina sem adição do analito (azul), com tempo de retenção aproximado de 8 minutos. Eixo y = %F e eixo x = minutos ..... 88
- FIGURA 28 - Cromatograma representando o pico do pireno em solução de acetonitrila na concentração de 0,1075 µg/mL (vermelho) e solução de acetonitrila sem adição de padrão (azul). Eixo y = %F e eixo x = minutos ... 88

FIGURA 29 – Aparelho para extração do 1-OHP em amostras de urina.....	90
FIGURA 30 – Picos de 1-OHP nas concentrações de 0,5 (azul) e 1,0 ng/mL (vermelho) com eluição gradiente – Bomba A (metanol 40%) e Bomba B (metanol 100%), como descrito na Tabela 10, porém com a mistura a 3 minutos e tempo final de corrida em 8 minutos.....	91
FIGURA 31 – Picos de 1-OHP nas concentrações de 2 (azul) e 5ng/mL (vermelho) com eluição isocrática de metanol 100%.....	91
FIGURA 32 – Pico do pireno na concentração de 0,215µg/mL com eluição isocrática de acetonitrila 70%.....	92
FIGURA 33 – Representação gráfica do estudo de especificidade mostrando as curvas de calibração em metanol (azul ♦) e em urina (rosa ■).....	93
FIGURA 34 – Amostra de urina sem adição de padrão (azul), amostra de urina adicionada de 0,5 ng/mL (vermelho), representando o limite de detecção com valor de ruído > que 2 a 3x o ruído do branco, e amostra de urina adicionada de 1,0ng/mL (verde), representando o limite de quantificação.....	96
FIGURA 35 – Solução de acetonitrila adicionada de 0,005µg/mL (azul), representando o limite de detecção, adicionada de 0,01µg/mL (vermelho) e solução adicionada de 0,02µg/mL (verde), representando o limite de quantificação.....	97
FIGURA 36 - Estudo de linearidade instrumental realizado na faixa de 2 a 200ng 1-OHP/mL de metanol com detecção de fluorescência. ....	100
FIGURA 37 - Curva de linearidade do método para a determinação do 1-OHP em amostras de urina, na faixa de 0,2 a 200,0ng/mL.....	101
FIGURA 38 - Curva de linearidade do método para a determinação do 1-OHP em amostras de urina, na faixa de 0,2 a 40,0ng/mL.....	102

- FIGURA 39 - Curva de linearidade do método para a determinação do pireno em solução de acetonitrila, na faixa de 0,005 a 1,075 $\mu\text{g}/\text{mL}$ . ..... 103
- FIGURA 40 - Curva de calibração do pireno na faixa de 0,005 a 0,1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . .....118
- FIGURA 41 - Cromatogramas representando uma solução-padrão de pireno em acetonitrila (0,02  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e uma amostra após a extração do pireno nos filtros e tubos adsorventes expostos ao ar respirável pelos trabalhadores na usina de asfalto (0,007  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). .....120
- FIGURA 42 - Amostra de uma solução de acetonitrila adicionada com uma solução-padrão de pireno. Concentração final 0,005  $\mu\text{g}$  de pireno/ $\text{mL}$  de acetonitrila .....122
- FIGURA 43 - Representação gráfica do estudo estatístico Mann-Whitney – não pareado e não paramétrico – aplicado para as variáveis de fumante e não fumante por meio da média e desvio padrão. A diferença foi considerada significativa ( $P < ,0001$ ). .....123
- FIGURA 44 - Representação gráfica do estudo estatístico Mann-Whitney – não pareado e não paramétrico -- aplicado na ocupação A em relação a ocupação B por meio da média e desvio padrão. A diferença foi considerada significativa ( $P < 0,0001$ ). .....125
- FIGURA 45 - Demonstração gráfica do estudo estatístico Pearson aplicado na para verificar a correlação entre pireno e 1-OHP. O valor de  $P = 0,06$  sugere uma fraca correlação positiva. ....127

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Propriedades físicas e outras informações sobre asfalto, fumos de asfalto e tintas à base de asfalto .....	28
TABELA 2 - Concentração de vapores HPAs no ar em refinarias, em atividades de pavimentação e em atividades de impermeabilização .....	29
TABELA 3 - Estudos de toxicidade aguda e crônica realizados após exposição ao pireno .....	33
TABELA 4 - Controles de qualidade nas concentrações do limite de quantificação (LQ), concentração baixa (CB), concentração média (CM) e concentração alta (CA) para o 1-OHP e para o pireno.....	56
TABELA 5 - Característica da população avaliada, para a determinação de 1-hidroxi pireno em amostras de urina.....	72
TABELA 5 - Característica da população avaliada, para a determinação de 1-hidroxi pireno em amostras de urina (continuação).....	73
TABELA 5 - Característica da população avaliada, para a determinação de 1-hidroxi pireno em amostras de urina (continuação).....	74
TABELA 5 - Característica da população avaliada, para a determinação de 1-hidroxi pireno em amostras de urina (continuação).....	75
TABELA 5 - Característica da população avaliada, para a determinação de 1-hidroxi pireno em amostras de urina (continuação).....	76
TABELA 6 - Condições cromatográficas otimizadas para a análise do 1-OHP e do pireno.....	79

TABELA 7 - Resultados do tempo de retenção do 1-hidroxipireno (1-OHP) em relação ao naftaleno (PI), denominado tempo de retenção relativo (trr). 83	83
TABELA 8 - Composição da fase móvel em eluição gradiente para a determinação do 1-OHP e do pireno.....	85
TABELA 9 - Valores do coeficiente angular/inclinação da reta (a) e do ponto de intersecção no eixo x, denominado intercepto (b), para as curvas de calibração construídas em metanol e urina.....	93
TABELA 10 - Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do 1-OHP obtido pelo cálculo do desvio-padrão (DP1) do intercepto com o eixo do y (b) de várias curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. ....	95
TABELA 11 - Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do 1-OHP obtido pelo cálculo do desvio-padrão (DP2) de um apropriado número de amostras do branco de urina (método) e metanol (instrumental). Análise realizada com a média das áreas de 10 replicatas. ....	95
TABELA 12 - Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), obtido obedecendo aos critérios de precisão e exatidão descritos, e utilizados no método para a determinação de 1-OHP em amostras de urina.....	96
TABELA 13 - Limite de quantificação (LQ), obtido obedecendo ao critério de precisão e exatidão descrito, e LD utilizado no método para a determinação do pireno em amostras de ar .....	97
TABELA 14 - Porcentagem de recuperação (R) do 1-OHP adicionado às amostras de urina.....	98
TABELA 15 - Porcentagem de recuperação (R) do pireno adicionado nos filtros em concentrações conhecidas.....	99

TABELA 16 – Eficiência de desorção (ED) dos tubos adsorventes adicionados com concentração conhecida de pireno. Resultado expresso em porcentagem (%).	99
TABELA 17 - Dados obtidos na análise do 1-OHP, em estudo para construção de curva de calibração, através da técnica de HPLC acoplada a um detector de fluorescência.	102
TABELA 18 – Coeficiente de variação inter e intra ensaio das concentrações urinárias de 1-hidroxipireno. Análise em seis replicatas e durante cinco dias. Cálculo ANOVA.	105
TABELA 19 – Coeficiente de variação inter e intra ensaio das concentrações urinárias de 1-hidroxipireno. Análise em seis replicatas e durante cinco dias. Cálculo baseado em CHASIN et al., 1999.	105
TABELA 20 – Coeficiente de variação inter e intra ensaio das concentrações do pireno. Análise em seis replicatas e durante cinco dias. Cálculo ANOVA.	106
TABELA 21 – Coeficiente de variação inter e intra ensaio das concentrações do pireno. Análise em seis replicatas e durante três dias. Cálculo baseado em CHASIN et al., 1999.	106
TABELA 22 – Estudo de exatidão com amostras de urina adicionadas de padrão de 1-OHP.	107
TABELA 23 – Estudo de exatidão com amostras adicionadas de padrão de pireno.	107
TABELA 24 - Estudo de estabilidade com amostras, adicionadas de padrão nas concentrações de 2, 20 e 30ng/mL, analisadas no tempo zero e após 5 dias mantidas a temperatura ambiente (~22oC)	108

TABELA 25 - Estudo de estabilidade com amostras, adicionadas de padrão nas concentrações de 2, 20 e 30ng/mL, analisadas no tempo zero e após 60 dias armazenadas em geladeira (-4oC) .....	108
TABELA 26 - Estudo de estabilidade com amostras, adicionadas de padrão nas concentrações de 2, 20 e 30ng/mL, analisadas no tempo zero e após 30, 120 e 360 dias armazenadas em freezer (-20oC). Os resultados estão descritos como % de inexatidão .....	109
TABELA 27 - Valores de gravidade específica e da creatinina urinária dos trabalhadores da usina de asfalto. ....	111
TABELA 27 - Valores de gravidade específica e da creatinina urinária dos trabalhadores da usina de asfalto (continuação).....	112
TABELA 27 - Valores de gravidade específica e da creatinina urinária dos trabalhadores da usina de asfalto (continuação).....	113
TABELA 28 - Valores, em concentração ( $\mu\text{g/L}$ ) e corrigidos pela creatinina ( $\mu\text{g/g}$ de creatinina), do 1-hidroxipireno urinário em trabalhadores de uma usina de asfalto.....	114
TABELA 28 - Valores, em concentração ( $\mu\text{g/L}$ ) e corrigidos pela creatinina ( $\mu\text{g/g}$ de creatinina), do 1-hidroxipireno urinário em trabalhadores de uma usina de asfalto (continuação).....	115
TABELA 28 - Valores, em concentração ( $\mu\text{g/L}$ ) e corrigidos pela creatinina ( $\mu\text{g/g}$ de creatinina), do 1-hidroxipireno urinário em trabalhadores de uma usina de asfalto (continuação).....	116
TABELA 29 - Valores de 1-OHP obtidos em diversos trabalhos publicados na literatura, especificando o local de exposição .....	116

---



TABELA 30 - Valores obtidos na determinação do pireno em amostras de ar do ambiente de uma usina de asfalto, análise realizada com amostrador pessoal .....	119
TABELA 31 - Valores obtidos na determinação do pireno em amostras de ar do ambiente de uma usina de asfalto, análise realizada com ponto fixo .....	119
TABELA 32 - Valores de média, desvio padrão e número de pontos analisados (n), pelo teste de Mann-Whitney -- não pareado e não paramétrico -- aplicado para as variáveis de fumante e não fumante .....	123
TABELA 33 - Valores de média, desvio padrão e número de pontos analisados (n) pelo teste Mann-Whitney -- não pareado e não paramétrico -- aplicado para as variáveis de ocupação A e B .....	124

## RESUMO

As informações sobre os efeitos adversos dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) na saúde humana são de grande importância científica e social. O seu alto potencial carcinógeno, especialmente no que se refere ao câncer de pulmão, e, em alguns casos, câncer de pele e da bexiga, é demonstrado por meio de diversos estudos epidemiológicos. Tais estudos somados ao fato de que os HAPs possam ser encontrados em diversos ambientes de trabalho, afetando diretamente vários trabalhadores expostos, demonstram a relevância deste trabalho. É preciso considerar ainda que a detecção precoce de uma exposição constitui-se, à luz dos atuais conhecimentos, em um importante fator de prevenção de riscos químicos ocupacionais. Diante disso, propõe-se a realização de um plano de avaliação ambiental por meio do pireno e a avaliação biológica através do 1-hidroxi pireno urinário, principal produto de biotransformação do pireno. Essas avaliações oferecem aos médicos, em particular aos médicos do trabalho, e à sociedade científica em geral, uma alternativa de um novo marcador biológico, o 1-hidroxi pireno, já preconizado pela ACGIH (2003), o qual poderá ser normatizado pelos órgãos competentes do Governo Federal, abrangendo o Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO) da NR-7, a ser aplicado em diversas indústrias do país.

## ABSTRACT

Information about the adverse effects of the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in human health has great importance, both scientifically and socially. Their high carcinogen potential, especially regarding lung cancer, and in some cases, skin and bladder cancer, is shown in several epidemiological surveys. Such surveys, and the fact that the PAHs may be found in several work environment; affecting directly several exposed workers, show the relevance of the current paper. It is still necessary to consider that the early detection of an exposure constitutes, at the light of the current knowledge, an important factor in the prevention of occupational chemical risks. Due to this fact, the conduction of an environmental assessment by means of the pyrene and the biological evaluation by means of the urinary 1-hidroxi-pyrene, the main product of pyrene biotransformation. Such assessments grant to doctor, specially to Occupational and Industry doctor, and to the scientific community as a whole, an alternative of a new biomarker, the urinary 1 hidroxi-pyrene, already acclaimed by the ACGIH (2003), that may be regulated by the competent agencies and enclosing the Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO) of the NR-7 to be used in several companies around the country.

## 1. INTRODUÇÃO

A saúde e a segurança do trabalhador são uma das maiores preocupações da saúde ocupacional. O ser humano, como se sabe, dedica, no mínimo, 65% do tempo de sua vida ao trabalho, que é um importante meio de realização e desenvolvimento de sua auto-estima. Por meio do trabalho o ser humano pode manifestar suas potencialidades, participar, realizar, cooperar, produzir e viver de maneira digna (MICHEL, O.R., 2000).

Devido à grande urbanização e industrialização no mundo, o ser humano foi e continua exposto a inúmeros agentes químicos, tanto no ambiente de trabalho como no seu macro-ambiente. Essa inevitável exposição criou a necessidade de estudos minuciosos quanto aos seus efeitos sobre a saúde e quanto às medidas de prevenção a essa exposição (WUNSCH FILHO, V., 1995).

A avaliação ideal acerca das medidas de prevenção é uma atividade que deve ser repetida sistematicamente, constituindo o que se chama de monitorização, definida “como atividade sistemática, contínua ou repetitiva, relacionada à saúde, com o propósito de conduzir, se necessário, ações corretivas” (BERLIN, A., YODAIKEN, R.E., LOGAN, D.C., 1982).

A monitorização ambiental e biológica tem como finalidade primordial proteger a saúde do trabalhador, prevenindo doenças ocupacionais (BERLIN, A., YODAIKEN, R.E., LOGAN, D.C., 1982; HATJIAN, B.A., *et al.*, 1995; QUE HEE, S.S., 1993; LEPERA, J.S., 1997). Tais procedimentos de monitorização requerem estudos prévios de reconhecimento e avaliação frente a padrões existentes, para posterior proposta de controle, ou seja, um conjunto de ações destinadas a eliminar,

---

quando possível, ou reduzir, a exposição ocupacional a um nível aceitável e compatível com a manutenção e promoção da saúde.

Com isso, pode-se dizer que as monitorizações ambiental e biológica são mecanismos de grande utilidade para avaliar a exposição ocupacional a substâncias químicas em geral (AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS (ACGIH), 2002, 2003).

Para o conhecimento dos níveis de exposição e para a avaliação do risco é essencial a determinação das concentrações ambientais dos agentes químicos por meio de uma monitorização do ar do ambiente de trabalho, para estimar a exposição e o risco à saúde e comparar os resultados com referências apropriadas (LAUWERYS, R.R., 1996; TOPPING, M.D., WILLIAMS, C.R., DEVINE, J.M., 2000; ACGIH, 2003). No entanto, apenas essa monitorização ambiental não permite uma avaliação completa da exposição ocupacional (FISCHER, F.M., GOMES, J.R., COLACIOPPO, S., 1989).

Estudos experimentais realizados em animais de laboratório e com voluntários, relacionados aos agentes químicos e seus produtos de biotransformação, tornaram possível definir as relações entre a exposição, a absorção, a biotransformação, a acumulação e a excreção de algumas substâncias exógenas. Por meio destes estudos da interação entre um organismo vivo e os agentes químicos, verificou-se que a resposta do organismo depende da concentração alcançada pelas substâncias ou de seus produtos de biotransformação nos sítios de ação, produzindo ou não o efeito nocivo. Tal concentração depende das propriedades físico-químicas da substância, das condições de exposição (tempo e frequência) e das características do organismo em questão (AZEVEDO, F.A., DELLA ROSA, H. V., LEYTON, V. O., 1982; FISCHER, F.M., GOMES, J.R., COLACIOPPO, S.,

---

1989; DELLA ROSA, H.V., SIQUEIRA, M.E.P.B., COLACIOPPO, S., 1991; DELLA ROSA, H.V., SIQUEIRA, M.E.P.B., FERNÍCOLA, N.A.G.G., 1996).

A monitorização biológica visando a prevenção de ocorrência de efeitos nocivos à saúde, utiliza-se da medida de determinantes apropriados em espécies biológicas coletadas dos trabalhadores no tempo especificado, objetivando, com isso, estimar a exposição ou o risco à saúde, quando comparados com uma referência apropriada (FISCHER, F.M., *et al.*, 1989; DELLA ROSA, H.V., *et al.*, 1991, 1996; REMPEL, D.M., *et al.*, 1991; ACGIH, 2003). O aludido determinante pode ser a própria substância química ou seus produtos de biotransformação (indicador de dose interna) ou até uma alteração bioquímica, uma alteração funcional ou estrutural, seja ela reversível e não nociva, produzida pela substância química (indicador de efeito). Assim, com base no determinante, na espécie biológica escolhida e no tempo de amostragem, os resultados obtidos podem indicar uma exposição recente, uma exposição média diária ou uma exposição crônica (FISCHER, F.M., *et al.*, 1989; ACGIH, 2002, 2003).

Vários trabalhos têm relatado efeitos adversos produzidos pelos HAPs, sendo muito destes efeitos relacionados ao desenvolvimento de câncer. Segundo a *International Agency for Research on Cancer* (IARC), seis HAPs são provavelmente cancerígenos para o homem. Considerando as propriedades toxicológicas e com o intuito de prevenir uma exposição ocupacional a estes compostos, propõe-se a realização de um plano de avaliação ambiental por meio do pireno e a avaliação biológica através do 1-hidroxipireno urinário. Essas avaliações oferecem aos médicos, em particular aos médicos do trabalho, e à sociedade científica em geral, uma alternativa de um novo marcador biológico, o 1-hidroxipireno, já preconizado pela ACGIH (2003), o qual poderá ser normatizado pelos órgãos competentes do Governo Federal, abrangendo o Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO) da NR-7, a ser aplicado em diversas indústrias do país.

---

A difusão destes compostos no ambiente, tanto ocupacional como geral, e a sua característica toxicológica (suspeita e evidência de carcinogenicidade) caracteriza a grande relevância do estudo do ponto de vista ambiental e biológico com a finalidade de **prevenção e promoção da saúde dos trabalhadores.**

Destarte, a monitorização do ambiente de trabalho complementada pela monitorização biológica são procedimentos fundamentais para a avaliação da exposição ocupacional a substâncias químicas em geral (ACGIH, 2002, 2003) e este trabalho, comprometido com os conceitos acima consignados, foi desenvolvido para uma classe de substâncias denominadas de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, conhecidos como HAPs.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1. Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAPs)

#### 2.1.1. Propriedades físico-químicas

O termo Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (*Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*) refere-se a uma classe de compostos orgânicos que contém dois ou mais anéis aromáticos fundidos, constituídos de átomos de carbono (C) e hidrogênio (H).



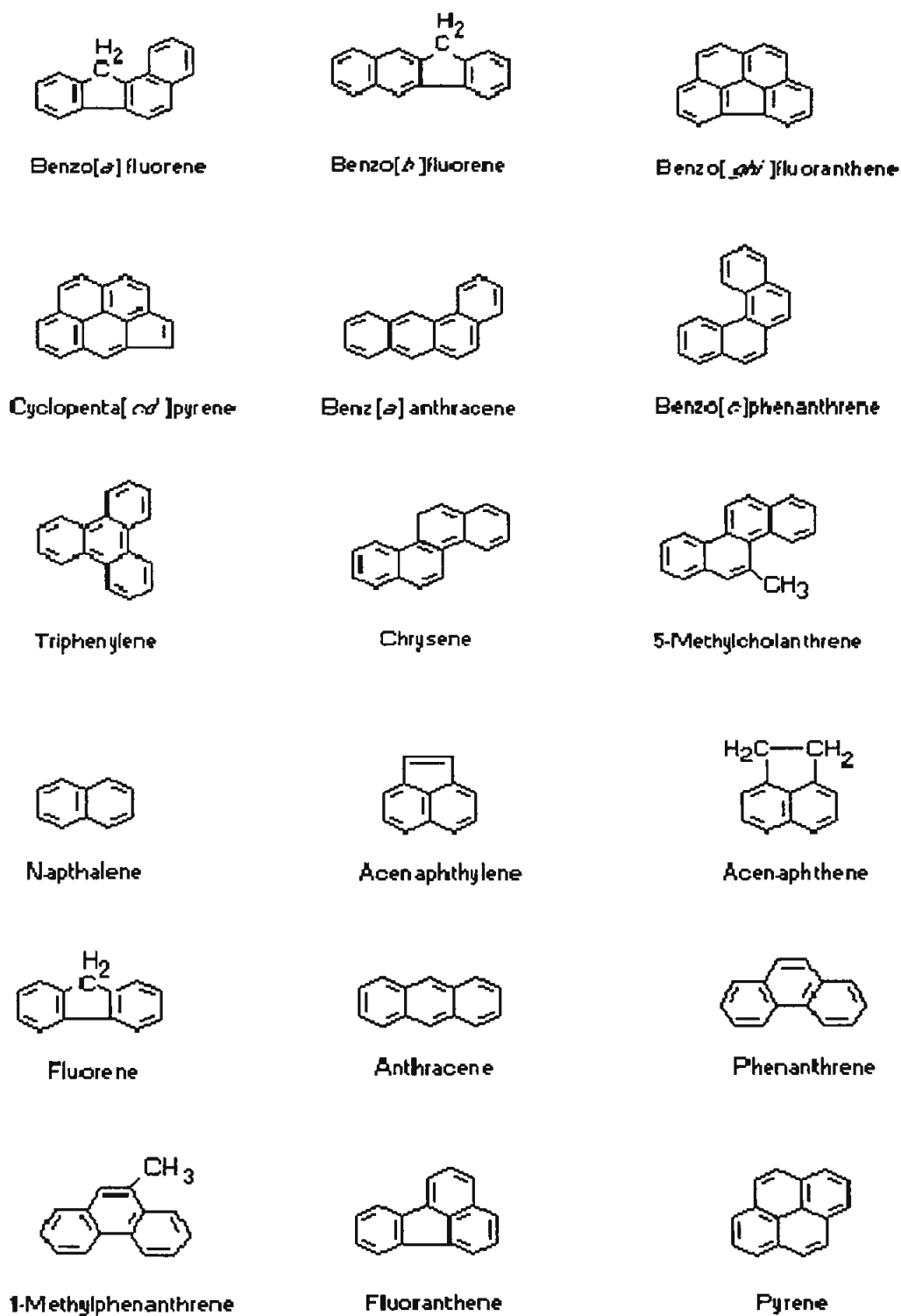


FIGURA 1 – Fórmula estrutural de alguns HAPs.

À temperatura ambiente, os HAPs são sólidos e suas características gerais e comuns são: os elevados pontos de fusão e ebulição, a baixa pressão de vapor e a pouca solubilidade em água, a qual tende a diminuir com o aumento da massa molecular. Os HAPs são solúveis em muitos solventes orgânicos, altamente lipofílicos e considerados quimicamente inertes (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC), 1983; UNITED STATES (ATSDR), 1995; FINLAYSON-PITTS, B.J., PITTS, J.N.Jr., 1997; WORLD OF HEALTH ORGANIZATION (WHO), 1998; FIALA, Z., *et al.*, 1999; SAMANTA, S.K., SINGH, O.V., JAIN, R.K., 2002).

São citadas pela *World Health Organization* – WHO – (1998) diversas revisões relativas a reações químicas e fotoquímicas dos HAPs na atmosfera. Sabe-se que após reações de fotodecomposição, na presença do ar e luz solar, são formados produtos oxidativos, incluindo quinonas e endoperóxidos. Os HAPs reagem com óxidos de nitrogênio e sulfúricos, ácidos nítricos e sulfúricos, ozônio e radicais hidroxilas presentes na atmosfera.

De acordo com os relatos de BJORSETH, A. & RAMDAHL, T. (1985) os HAPs constituem uma classe de compostos formados a partir da decomposição térmica de materiais orgânicos que contenham carbono e hidrogênio e liberados no meio ambiente. Essa formação baseia-se em dois grandes mecanismos:

- Pirólise ou combustão incompleta;
- Processos de carbonização.

Os tipos de HAPs formados parecem depender mais das condições de combustão do que do tipo de material orgânico queimado. A quantidade de HAPs formada sob condições definidas de pirólise depende da temperatura

---

de reação e do material orgânico (BJORSETH, A., RAMDAHL, T., 1985; WHO, 1998).

Os HAPs não são formados apenas em altas temperaturas e chamas abertas. Vários processos de carbonização que ocorrem, por exemplo, durante a produção de óleo mineral e carvão, levam à formação de HAPs pelo decaimento de materiais biológicos e orgânicos a baixas temperaturas (inferior a 200°C) e alta pressão em um período superior a milhões de anos. Essa transformação é semelhante a pirólise, mas as reações são extremamente lentas devido à temperatura envolvida (BJORSETH, A., RAMDAHL, T., 1985; WHO, 1998).

### 2.1.2. Toxicidade dos HAPs

Os HAPs possuem toxicidade de moderada à baixa nas exposições agudas. Os valores de dose letal 50 (DL<sub>50</sub>) relatados são, geralmente, maiores que 100mg/kg após injeção intraperitonal ou intravenosa e maiores que 500mg/kg após a administração oral (BJORSETH, A., RAMDAHL, T., 1985; WHO, 1998).

Nos poucos estudos a curto prazo relatados – toxicidade aguda e sub-aguda -- foram observados efeitos no sistema hematopoiético (BJORSETH, A.; RAMDAHL, T., 1985; WHO, 1998). As doses de nenhum efeito adverso observado (NOAEL)\* e a menor dose em que o efeito adverso é observado (LOAEL)\*\* têm sido obtidas em estudos subcrônicos (de até 90 dias), utilizando a via oral como via de introdução. Os valores de NOAEL, baseados nos efeitos hematológicos, na hepatotoxicidade e na nefrotoxicidade,

---

\* NOAEL: *no-observed-adverse-effect level*.

\*\* LOAEL: *lowest-observed-adverse-effect level*.

variaram de 75 a 1000mg/kg de peso corpóreo por dia para os HAPs acenafteno, antraceno, fluoranteno, fluoreno e pireno, considerados não cancerígenos (BJORSETH, A., RAMDAHL, T., 1985; WHO, 1998).

Alguns estudos de irritação ocular e dérmica foram conduzidos, constatando-se a promoção de efeitos adversos sobre esses tecidos. Os efeitos dermatológicos adversos observados em animais após a exposição dérmica aguda, subaguda e subcrônica aos HAPs incluem a destruição das glândulas sebáceas, ulceração dérmica, hiperplasia, hiperqueratose e alterações no crescimento de células da epiderme (WHO, 1998).

A fotosensibilização de contato ou fototoxicidade (uma condição na qual a pele torna-se extremamente sensível à luz solar) tem sido relatada em estudos com animais expostos a diversos HAPs (CHEMINFO, 2002). Compostos fotodinâmicos podem gerar radicais aniônicos superóxidos na presença de luz ultravioleta. Na ausência de oxigênio, estes compostos agem como agentes fotoredutores. O principal efeito é um prejuízo dérmico (WHO, 1998). Os efeitos de fototoxicidade do benzo(a)pireno, benzo(a)antraceno, indeno(1,2,3-cd)pireno, fluoranteno e o perileno foram comparados, após tratamento de fibroblastos humanos com estes compostos seguido de irradiação com luz ultravioleta (<400nm) e uma boa correlação foi relatada entre os efeitos fotóxicos e o potencial carcinogênico para o benzo(a)pireno e o indeno(1,2,3-cd)pireno; o benzo(a)antraceno foi moderadamente tóxico, o fluoranteno foi fracamente tóxico e o perileno não foi considerado fototóxico (WHO, 1998).

Vários trabalhos têm relatado efeitos adversos produzidos pelos HAPs não relacionados ao desenvolvimento de câncer. De acordo com a publicação da WHO (1998), os HAPs afetam tecidos proliferativos como medula óssea, órgãos linfóides, gônadas e epitélio intestinal, porém o alvo parece ser os sistemas hematopoiético e linfóide, contudo, os estudos para toxicidade a

curto e a longo prazo visando outros efeitos adversos são ainda escassos. Os efeitos crônicos relatados em animais experimentais expostos consistem de leucocitose, alongamento do músculo flexor das pernas, excitação e espasmos musculares (WHO, 1998).

Estudos experimentais têm demonstrado outros efeitos adversos após uma exposição a longo prazo, como alterações no fígado, nos rins, nos pulmões, no sistema circulatório e no linfático (CHEMINFO, 2002; NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE - HAZARDOUS SUBSTANCES DATA BANK (HSDB), 2002; REGISTRY OF TOXIC EFFECTS OF CHEMICAL SUBSTANCES (RTECS), 2002). Quase todos os estudos realizados a longo prazo – toxicidade crônica – foram delineados visando avaliar o potencial carcinogênico dos HAPs. No entanto, esses estudos são comprometidos devido à complexidade da exposição.

Os HAPs podem atravessar a barreira placentária e induzir efeitos adversos no embrião e no feto. O benzo(a)antraceno, o benzo(a)pireno, o dibenzo(ah)antraceno e o naftaleno foram relatos como embriotóxicos (WHO, 1998).

A mutagenicidade tem sido investigada intensivamente para esta classe de compostos. Os únicos compostos que não são considerados mutagênicos são o naftaleno, o fluoreno e o antraceno, sendo que a evidência para alguns compostos é questionável devido a um limitado banco de dados. A mutagenicidade é estritamente dependente da ativação metabólica dos compostos precursores. O benzo(a)pireno tem sido extensivamente utilizado como um controle positivo em uma grande variedade de testes a curto prazo. É um composto ativo em diversos ensaios *in vivo* e/ou *in vitro* de *end-points*, os quais expressam eventos moleculares resultantes da exposição ao agente tóxico (BUCKER, M., *et al.*, 1979; WHO, 1998).

---

Muitos trabalhos na área de carcinogenicidade têm sido relatados e, à luz dos conhecimentos atuais, os resultados são negativos em carcinogenicidade para o fluoreno, o antraceno, o pireno, o perileno e o benzo(ghi)perileno. As evidências para classificação destes compostos como cancerígenos são questionáveis baseadas em estudos não muito confiáveis ou não delineados corretamente. Segundo a IARC, seis HAPs são provavelmente cancerígenos para o homem: benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, dibenzo(a,h)antraceno e indeno(1,2,3-cd)pireno. Geralmente, o desenvolvimento de um tumor depende de inúmeros fatores, entre eles a via de administração, a frequência e o tempo de exposição ao agente. Tecido como a pele pode metabolizar os HAPs, tornando-se, assim, órgão alvo, e os metabólitos formados no fígado podem alcançar vários alvos no organismo por meio da via circulatória (IARC, 1983, 1987; MASTRANGELO, G., *et al.*, 1997; WHO, 1998; GOLDMAN, R., *et al.*, 2001).

### 2.1.3. Toxicocinética e toxicodinâmica

Estudos de absorção, distribuição, biotransformação e excreção são essenciais na avaliação da segurança de substâncias químicas. Esses estudos servem de base para se interpretar todos os outros estudos toxicológicos (KLAASSEN, C.D., 1990; MEDINSKY, M.A., KLASSEN, C.D., 1996; PARKINSON, A., 1996; ROZMAN, K.K., KLASSEN, C.D., 1996; OGA, S., 1996).

Todos os aspectos de absorção, biotransformação, ativação e excreção do benzo(a)pireno têm sido exhaustivamente estudados e publicados na literatura, no entanto, há pouca informação de muitos outros HAPs como o

pireno, objeto de estudo neste trabalho, particularmente, em humanos (PHILLIPS, D.H., 1983; WHO, 1998).

Os HAPs são compostos lipofílicos, solúveis em solventes orgânicos, geralmente destituídos de grupos polares e ionizáveis. As principais formas de introdução e absorção dos HAPs se dão pelos tratos respiratório, gastrintestinal e pela via cutânea. Podem, portanto, ser absorvidos através do trato respiratório após a inalação de aerossóis e/ou material particulado que contenham os HAPs, do trato gastrintestinal após a ingestão de água e/ou alimentos contaminados e por via cutânea como resultado do contato com materiais relacionados aos HAPs (WHO, 1998). Os HAPs são rapidamente absorvidos por via respiratória. A quantidade absorvida é influenciada pelo tamanho da partícula em que estão depositados os HAPs e pelo veículo. Estudos realizados com animais de experimentação demonstraram a absorção de 50 a 80% da dose aplicada de HAPs marcados dissolvidos em solvente orgânico. Esta absorção foi reduzida em 20% quando partículas sólidas foram incluídas no material aplicado. A absorção oral de benzo(a)pireno e de outros HAPs varia com a lipossolubilidade do composto e do veículo no qual é administrado (WHO, 1998). Diversos trabalhos compilados e publicados pela WHO (1998) indicam que a absorção pela pele é um importante fator na estimativa total de exposição a esses compostos. A absorção via dérmica pode variar de 25 a 95%.

Em estudos de distribuição, realizados com roedores, os HAPs e seus produtos de biotransformação foram encontrados em quase todos os tecidos e, particularmente naqueles ricos em lipídeos. Os níveis encontrados dependem de numerosos fatores, que incluem o tipo de HAP, a via de administração, o veículo, o tempo após o tratamento em que o tecido é avaliado e a presença ou ausência de indutores ou inibidores do metabolismo desses hidrocarbonetos no organismo. Os estudos têm demonstrado que os níveis detectados ocorrem em quase todos os órgãos internos, que os órgãos

ricos em tecido adiposo podem servir de depósito e que o trato gastrointestinal contém altos níveis de HAPs e seus metabólitos, mesmo quando administrados por outras vias, como resultado do *clearance* mucociliar e excreção hepatobiliar (WHO, 1998).

A biotransformação dos HAPs para compostos solúveis em água é complexa. Geralmente, o processo envolve a epoxidação de duplas ligações, uma reação catalisada pelo citocromo P450 mono-oxigenase dependente, um re-arranjo ou hidratação de epóxidos a fenóis ou dióis, respectivamente, e a conjugação do derivado hidroxilado. Esse sistema enzimático, ao oxidar os HAPs, produz epóxidos, principalmente diol-epóxidos, altamente reativos, que ao formar adutos com o DNA podem ser os iniciadores de tumores (WEINSTEIN, I.B.; JEFFREY, A.M.; JENNETTE, K.W.; BLOBSTEIN, S.H.; HARVEY, R.G.; HARRIS, C., *et al.*, 1976; CLAYTON, G.D., CLAYTON, F.E., 1993-1994; MASTRANGELO, G., *et al.*, 1997; WHO, 1998; GOLDMAN, R., *et al.*, 2001; NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE – INTEGRATED RISK INFORMATION SYSTEM (IRIS), 2002). Os hidrocarbonetos são primeiramente oxidados para formar os metabólitos da fase I, incluindo os metabólitos primários, como os epóxidos, os fenóis e os dihidrodióis, e, então, os metabólitos secundários, como os diol-epóxidos, os tetrahidrotetróis e os fenóis epóxidos. Os metabólitos da fase I são então conjugados com glutatona, sulfato ou ácido glicurônico para formar os metabólitos da fase II, os quais são muito mais polares e solúveis em água (MASTRANGELO, G., *et al.*, 1997; WHO, 1998; GOLDMAN, R., *et al.*, 2001).



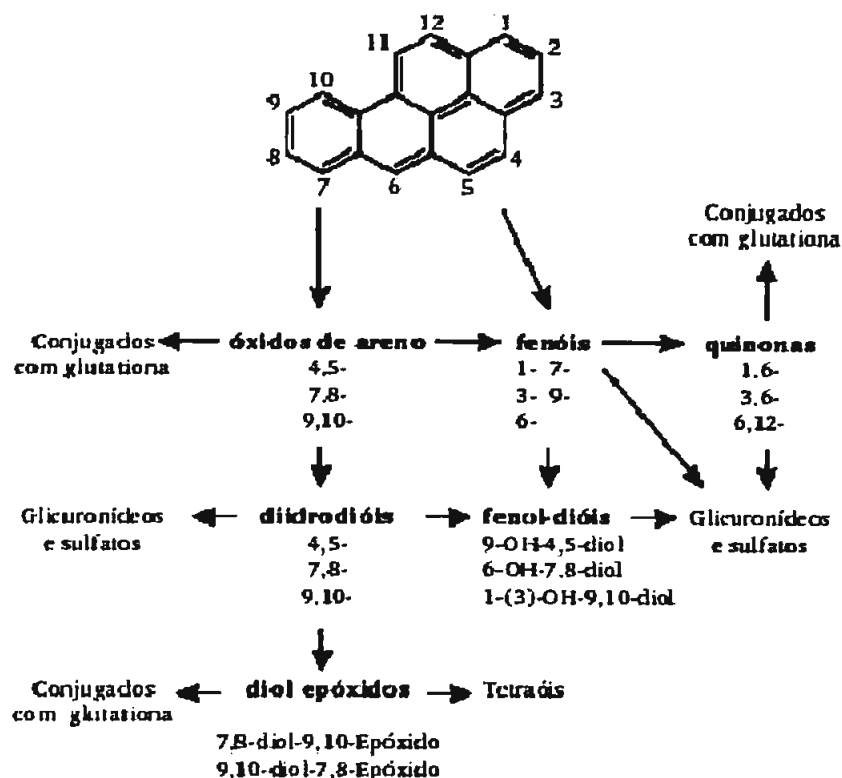


FIGURA 2 – Principais vias de biotransformação dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Fonte: WHO, 1998

Atenção particular tem sido dada ao metabolismo dos HAPs em tecidos de humanos, que podem estar expostos por meio da alimentação e do ambiente, pois estes são alvos potenciais para o desenvolvimento de câncer (WHO, 1998). As células examinadas incluem as dos brônquios, do cólon, as células mamárias, os queratinócitos, os monócitos e os linfócitos. O metabolismo dos HAPs pelos macrófagos pulmonares em humanos tem recebido atenção, pois estes parecem ser responsáveis pela incidência de câncer nos brônquios de fumantes (MASTRANGELO, G., *et al.*, 1997; WHO, 1998; GOLDMAN, R., *et al.*, 2001).

Embora os mesmos tipos de metabólitos sejam formados pelos HAPs em diversas preparações celulares e tissulares, o nível e a razão de formação

destes metabólitos dependem do tipo de tecido e célula que estão sendo estudados e a espécie e a linhagem do animal nos quais os sistemas de metabolização foram preparados. Em populações heterogêneas, como a humana, a razão de metabolismo depende do indivíduo do qual os tecidos ou células serão preparados. Uma variação de 75 vezes na ativação de hidrocarbonetos foi relatada em estudos com brônquios humanos, e variações similares foram observadas entre células mamárias e macrófagos (CERNIGLIA, C.E., 1984; WEIS, L.M., *et al.*, 1998; WHO, 1998; STEGEMAN, J.J., *et al.*, 2001).

Os citocromos (CYP) P450 são uma superfamília de hemoproteínas que catalisam a oxidação de várias moléculas endógenas tão bem como xenobióticos, incluindo os HAPs. Dezenas de genes do CYP-P450 têm sido organizados em famílias e subfamílias de acordo com sua estrutura de cadeias polipeptídicas e quanto a sua especificidade de ação. Alguns CYP pertencentes às famílias 1, 2 e 3 são particularmente importantes no metabolismo dos HAPs (OGA, S., 1996; WHO, 1998; STEGEMAN, J.J., *et al.*, 2001).

O CYP1A1 parece ser o único gene com capacidade metabólica em quase todos os HAPs. A indução deste sistema enzimático é controlada pelo receptor arila hidrocarbono (Ah), que pode ser ativado pelos HAPs e, neste caso, os HAPs e seus metabólitos podem regular seu próprio metabolismo pela indução deste gene (CYP1A1). Após a indução, este gene pode alcançar altos níveis na placenta, no pulmão e nas células sanguíneas periféricas.

Outro membro da família, o CYP1A2, também metaboliza os HAPs, todavia, sua capacidade de metabolização é aproximadamente 1/15 que o do CYP1A1. O gene CYP1A2 em humanos é muito ativo na formação de benzo(a)pireno 7,8-dihidrodiol e na formação de epóxidos a partir do 7,8-dihidrodiol, além de evidências de ativação do 7,12-

dimetilbenzo(a)antraceno a espécies mutagênicas. A expressão do CYP1A2 é também regulada pelo receptor Ah e, no fígado, por exemplo, o nível de CYP1A2 é maior que o do CYP1A1.

O citocromo da família 3A é um dos mais abundantes no fígado humano. Foi demonstrado em estudo que o CYP3A4 participa ativamente na hidroxilação hepática do benzo(a)pireno. Todos esses genes do citocromo P-450 discutidos são induzíveis e seus níveis de expressão podem ser aumentados por estímulo externo (WHO, 1998).

Alguns HAPs podem agir como substrato para o CYP1B e, o CYP2B mostrou ser capaz de metabolizar o benzo(a)pireno a 3 e 9-fenóis e trans-dihidrodióis, além de provavelmente estar envolvido no metabolismo do 7,12-dimetilbenzo(a)antraceno. Os níveis destes genes são extremamente baixos e, neste caso, têm importante papel no metabolismo dos HAPs apenas após a indução (WHO, 1998).

A subfamília CYP2C contém diversos membros e alguns são expressos em altos níveis no fígado. O CYP2C9 e o CYP2C8 metabolizam o benzo(a)pireno a 3 e 9-fenóis e trans-dihidrodióis e pode estar envolvida no metabolismo do 7,12-dimetilbenzo(a)antraceno e do benzo(a)pireno. Devido aos seus altos níveis no fígado parece ter importante papel no metabolismo hepático dos HAPs (WHO, 1998).

A maioria dos metabólitos dos HAPs é excretada com as fezes e a urina. A excreção urinária dos metabólitos dos HAPs tem sido mais extensivamente estudada em relação à excreção fecal, mas a importância da circulação enterohepática dos metabólitos tem levado ao aumento de pesquisas nesta área. Estudos detalhados do metabolismo e excreção dos HAPs em animais e em humanos são restritos, principalmente, a compostos mais simples. A maioria dos estudos é realizada *in vitro*, principalmente com

o naftaleno, o antraceno, o fenantreno, o pireno, o benzo(a)antraceno e o criseno (WHO, 1998).

### ***Carcinogenicidade***

O efeito de carcinogenicidade dos HAPs pode ser explicado por várias teorias. Uma delas sugere que a presença do grupo epóxido, do intermediário metabólico diol-epóxido, na região em baía do anel benzênico saturado, facilita a abertura deste anel, com formação do íon carbônio e deslocamento da energia (Figura 3). Este íon é um agente alquilante, responsável pelas reações com o DNA. Esta teoria é baseada na suposição de que os diol-epóxidos dos compostos precursores são os cancerígenos responsáveis pela reação dos grupos epóxidos eletrofílicos com os átomos de nitrogênio das purinas do DNA (WEINSTEIN, I.B., JEFFREY, A.M., JENNETTE, K.W., BLOBSTEIN, S.H., HARVEY, R.G., HARRIS, C., *et al.*, 1976; CLAYTON, G.D., CLAYTON, F.E., 1993-1994; MASTRANGELO, G., *et al.*, 1997; WHO, 1998; GOLDMAN, R., *et al.*, 2001; IRIS, 2002).

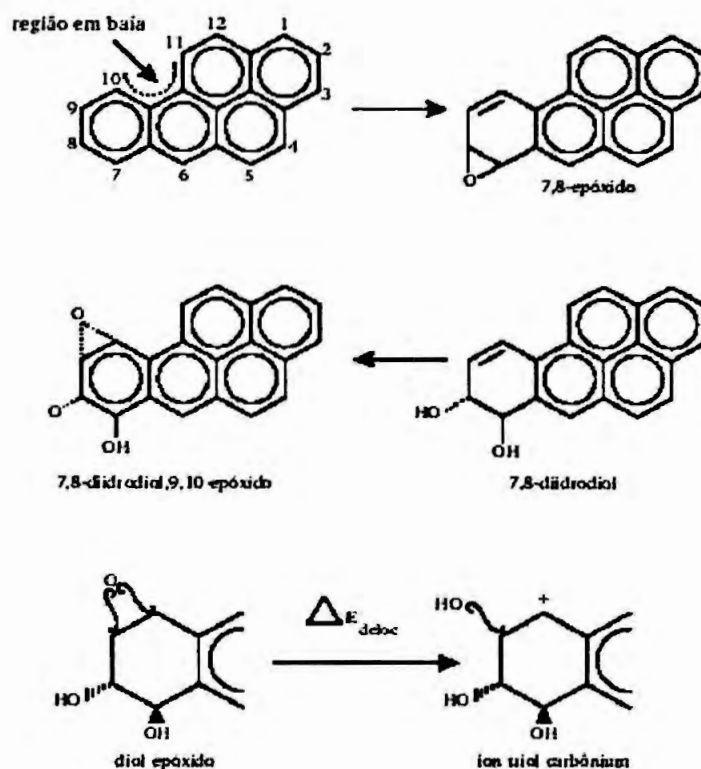
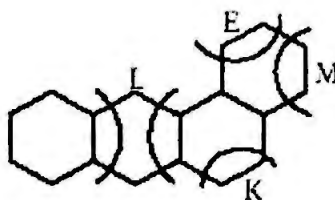


FIGURA 3 - Via de biotransformação do benzo(a)pireno com a formação de díol epóxido. Fonte: WHO, 1998

JERINA, D.M. *et al.* (1980) citado por WHO (1998) postulou a teoria eletrofílica bifuncional assumindo a formação de dois íons carbônios. O ângulo do anel, o anel subangular e a região ativa K (Figura 4) desempenham papéis decisivos no potencial carcinogênico. São requeridas duas regiões adjacentes ativas. Os HAPs com potencial de ionização relativamente baixo são ativados, via CYP-450, pela oxidação de um elétron (radical catiônico), enquanto os HAPs com potencial de ionização elevado são ativados por monoxigenação, formando os epóxidos na região em baía (ZANDER, M., 1980; HARVEY, R.G., GEACINTOV, N.E., 1988; WHO, 1998).



**FIGURA 4** – Regiões determinantes para a carcinogenicidade dos HAPs. M: região metabólica; E: região de atividade eletrofílica; L: região de destoxificação e K: região ambígua. Fonte: WHO, 1998

As várias teorias para o mecanismo de carcinogenicidade dos HAPs levam em conta a estrutura química e o potencial de ionização e são confirmadas experimentalmente por meio da detecção de correspondentes adutos de DNA nos HAPs que têm sido investigados. No entanto, não se pode afirmar que uma única teoria dê conta de explicar o mecanismo de ação de todos os HAPs (ZANDER, M., 1980; WEINSTEIN, I.B., JEFFREY, A.M., JENNETTE, K.W., BLOBSTEIN, S.H., HARVEY, R.G., HARRIS, C., *et al.*, 1976; HARVEY, R.G., GEACINTOV, N.E., 1988; CLAYTON, G.D., CLAYTON, F.E., 1993-1994; MASTRANGELO, G., *et al.*, 1997; WHO, 1998; GOLDMAN, R., *et al.*, 2001).

A maioria dos estudos conduzidos com os HAPs teve como escopo avaliar o potencial de carcinogenicidade. Estudos em diversas matrizes ambientais relevantes têm demonstrado que são os HAPs os agentes predominantemente responsáveis pelo seu potencial de carcinogenicidade (GRIMMER, G., 1983).

#### **2.1.4. Fontes de exposição aos HAPs**

Segundo as observações de APOSTOLI, P. *et al.*, (1996) há uma carência de dados sobre a exposição a tais compostos. Este fato foi atribuído à lacuna nos conhecimentos de toxicologia ocupacional e higiene industrial assim como da inexistência de instrumentos e métodos adequados de análise como os disponíveis até o referido momento (WHO, 1998). Efetivamente, ainda são limitadas as informações quantitativas sobre as emissões dos HAPs provenientes de fontes provocadas pelas atividades humanas, assim como das fontes naturais (GUERIN, M.R., 1978; BJORSETH, A., RAMDAHL, T., 1985; HARVEY, R.G., 1985; WILD, S.R., JONES, K.C., 1995; WHO, 1998). O Quadro 1 apresenta as principais fontes de HAPs, divididas em estacionárias e móveis.

## QUADRO 1 – Fontes de formação e exposição aos HAPs

---

### Fontes estacionárias

- ❖ Aquecimento residencial -- fornalhas, lareiras, fornos (madeira e carvão) e aquecedores a gás.

---

- ❖ Atividades industriais: produção de coque, negro de fumo, reforma catalítica de petróleo, produção de asfalto e óleos minerais, fundição de alumínio, ligas de ferro e aço, carburantes.

---

- ❖ Geração de calor e força. Usinas de geração de força pela queima de carvão ou óleo, estação de força de madeira ou turfa\* queimada, aquecedores comerciais e industriais.

---

- ❖ Queima de cigarro, fumaça de cigarro.

---

- ❖ Incineração e incêndio. Incineradores públicos e industriais, queima de lixo, queima florestal e incêndio na agricultura.

---

### Fontes móveis

- ❖ Automóveis a gasolina e a diesel. Queima de borracha de pneus. Tráfego marítimo e viário.

---

\* material fóssil, combustível formado por material vegetal

Estudos em diversas matrizes ambientais, tais como na combustão do carvão, na produção do alumínio, do coque, do asfalto, do alcatrão, do betume e do creosoto, bem como na refinação do petróleo, na produção de borracha, na exaustão dos motores de veículos, na produção de alimentos defumados, na produção e uso de negro de fumo e a fumaça de cigarro, entre outras, demonstram a presença dos HAPs. Estes compostos geralmente ocorrem em misturas complexas e, devido a este fato e às variações durante os processos de geração, ainda não é possível um detalhamento destas misturas (BJORSETH, A., RAMDAHL, T., 1985; WRBITZKY, R., *et al.*, 1995; APOSTOLI, P., *et al.*, 1996; MOEN, B.E., *et al.*, 1996; NIELSEN, P.S., *et al.*,



1996; HARA, K., *et al.*, 1997; FEUNEKES, F.D.J.R., *et al.*, 1997; WHO, 1998; BENTSEN, R.K., *et al.*, 1998, 2000; BROUWER, D.H., *et al.*, 2001).

Diante da extrema variabilidade de situações onde ocorre exposição ocupacional e, ainda, da ausência de métodos analíticos padronizados para a determinação destes compostos no ambiente, cria-se a necessidade de reconhecer e definir as diversas atividades de trabalho e as características da exposição, com o perfil dos HAPs presentes nesses locais, para, se possível, estabelecer com maior exatidão o risco ou situações de risco a eles correlacionados (BJORSETH, A., RAMDAHL, T., 1985; ANGERER, J., *et al.*, 1997; BRZEZNICKI *et al.*, 1997; GILBERT, N.L., VIAU, C., 1997; JONGENELEN, F.J., 1997; MIELYNSKA, D., *et al.*, 1997; PYY, L., *et al.*, 1997; BOUCHARD, M., VIAU, C., 1996, 1998; DELL'OMO, M., *et al.*, 1998; CHUANG, J.C., *et al.*, 1999).

Frente à certeza de uma ampla difusão das atividades de trabalho em que ocorre a exposição aos HAPs, entende-se que essa temática não tem sido tratada com a atenção necessária. Verificou-se nos anos 1980/1990, por meio de referências do banco de dados MEDLINE, um aumento sensível de publicações (aproximadamente 50 novos trabalhos/ano), relacionadas aos HAPs e seus produtos de biotransformação (APOSTOLI, P., *et al.*, 1996). Não obstante o crescente estudo em torno do assunto, inexistente uma padronização de procedimentos analíticos e do número de HAPs relatados, tornando confuso o termo "HAPs Total". Assim, a fim de reduzir estas incertezas, muitas medidas e estudos são necessários para diversas fontes de emissão.

Dentre as muitas atividades nas quais os trabalhadores estão sujeitos ao risco de exposição aos HAPs estão as usinas de asfalto (MALAIYAND, M., *et al.*, 1982; BURGAZ, S., 1992, 1998; ELOVAARA, E., *et al.*, 1995; WUNSCH FILHO, V., 1995; WHO, 1998; KARAKAYA, A., *et al.*, 1999; BONNET, P., *et*

*al.*, 2000; BRANDT, H., *et al.*, 2000; BURSTYN, I., 2000a, 2000b; IARC, 2001), que são enfocadas neste trabalho.

## 2.2. Asfalto

Os materiais betuminosos são constituídos por uma combinação de hidrocarbonetos, de cor, de dureza e volatilidade variáveis. Esses hidrocarbonetos são produzidos naturalmente ou por combustão, ou por ambos associados, encontrados freqüentemente acompanhados por derivados não-metálicos e solúveis em dissulfeto de carbono (CS<sub>2</sub>). Podem ser naturais ou provenientes do refino do petróleo ou da destilação do carvão. Aos materiais oriundos do refino do petróleo ou de origem natural dá-se o nome de asfalto de petróleo e aos oriundos da destilação do carvão dá-se o nome de alcatrão. Existe ainda certa indefinição no que diz respeito às diferenças entre betume e asfalto. Betume é uma mistura complexa de produtos de petróleo e o asfalto é uma mistura de betume e material mineral como pedras e areia. Alcatrão e piche são produtos da destilação de carvão. Habitualmente admite-se que o *betume* é a palavra genérica, englobando asfaltos e alcatrões. Da origem etimológica vê-se que, enquanto betume significa um corpo cujas características se enquadram nas do piche, o asfalto é qualificado como uma espécie de cimento estável que aglutina pedras e outros materiais (CONCAWE, 1992; BRITO FILHO, J.A., 1994; SENÇO, W., 1979; HEIKKILA, P., *et al.*, 2002).

Nas refinarias, o petróleo é submetido a diversos processos pelos quais se obtém grande diversidade de derivados: gás liquefeito de petróleo (GLP) ou gás de cozinha, gasolina, naftas, óleo diesel, gasóleos, querosenes de aviação e de iluminação, óleo combustível, **asfalto**, lubrificantes, solventes, parafinas, coque de petróleo e resíduos. As parcelas dos derivados

---

produzidos em determinada refinaria variam de acordo com o tipo de petróleo processado. Assim, petróleos mais leves dão maior quantidade de gasolina, GLP e naftas, que são produtos leves. Já os petróleos pesados resultam em maiores volumes de óleos combustíveis e asfaltos. No meio da cadeia estão os derivados médios, como o óleo diesel e o querosene (CONCAWE, 1992; BRITO FILHO, J.A., 1994; SENÇO, W., 1979; HEIKKILA, P., *et al.*, 2002).

A primeira etapa do processo de refino é a destilação atmosférica. Ela se realiza em torres de dimensões variadas, que possuem, ao longo da coluna principal, uma série de pratos perfurados em várias alturas, um para cada fração desejada. O petróleo é pré-aquecido e introduzido na metade da torre de destilação. Como a parte de baixo da torre é mais quente, os hidrocarbonetos gasosos tendem a subir e se condensar ao passarem pelos pratos. Nessa etapa, são recolhidos como derivados da primeira destilação, principalmente, gás, gasolina, nafta e querosene. Essas frações, retiradas nas várias alturas da coluna, ainda necessitam de novos processamentos e tratamentos, para se transformarem em produtos ou servirem de carga para outros derivados mais nobres (CONCAWE, 1992; BRITO FILHO, J.A., 1994; SENÇO, W., 1979; HEIKKILA, P., *et al.*, 2002).

As frações mais pesadas do petróleo, que não foram separadas na primeira destilação, descem para o fundo da torre e vão constituir o resíduo ou a carga para uma segunda destilação, onde recebem mais calor, agora sob vácuo. O sistema é mais complexo, mas segue o mesmo processo dos pratos que recolhem as frações menos pesadas, praticamente o óleo diesel e o óleo combustível. Na parte de baixo, é recolhido novo resíduo, que será usado para produção de **asfalto** ou como óleo combustível pesado (CONCAWE, 1992; BRITO FILHO, J.A., 1994; SENÇO, W., 1979; HEIKKILA, P., *et al.*, 2002).

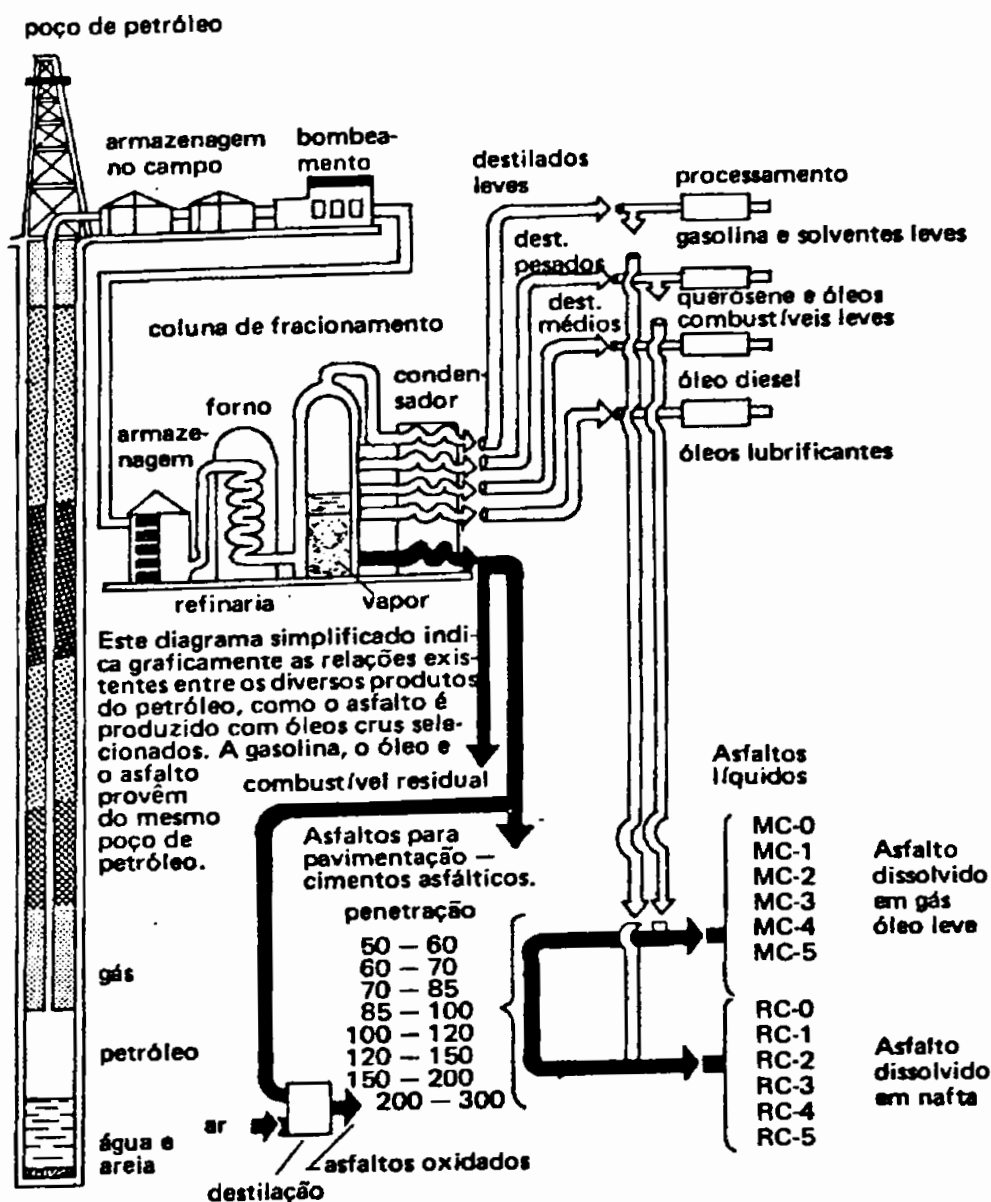


FIGURA 5 - Esquema de destilação em uma torre de refino de petróleo com destaque a produção de asfalto. Fonte: SENÇO, W., 1979

O cimento asfáltico de petróleo (CAP), subproduto na refinaria de petróleo, constitui-se na grande parcela de ligantes utilizados na pavimentação, como impermeabilizante e isolante. O CAP é produzido em refinarias a partir de diversos tipos de petróleo. A obtenção ocorre durante o

processo de destilação do petróleo sob pressão atmosférica ou sob pressão reduzida, seja na presença ou ausência de vapor. É armazenado a cerca de 150°C em tanques isolados termicamente (Figura 6). O CAP é um material escuro e semi-sólido cuja composição depende da complexidade química do petróleo original e o processo de manufatura envolvido na criação do produto final (PUZINAUSKAS, V.P., CORBETT, L.W., 1978; PUZINAUSKAS, V.P., 1980; REVAP, 1996).



**FIGURA 6** - Tanque isolado termicamente para o armazenamento do Cimento Asfáltico de Petróleo, distribuído pela Petrobrás

O petróleo consiste basicamente de compostos alifáticos, cicloalcanos, hidrocarbonetos aromáticos, compostos heterocíclicos contendo nitrogênio, oxigênio, enxofre e alguns metais como ferro, níquel e vanádio. Em termos de análise elementar, o CAP é constituído dos seguintes elementos: carbono,

de 79 a 88%, hidrogênio, de 7 a 15%, oxigênio até 8%, nitrogênio até 3% e enxofre até 6%. O CAP pode ser fracionado em quatro tipos de compostos de hidrocarbonetos, sendo as duas últimas frações constituídas de hidrocarbonetos aromáticos de núcleos condensados, denominados também de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos -- HAPs (SPEIGHT, J.G., 1992; REVAP, 1996).

A mistura do cimento asfáltico de petróleo (CAP) com o pó de pedra, composto de pedregulhos e areia, a uma temperatura do maçarico de aproximadamente 350°C origina a mistura asfáltica, mais conhecida como asfalto. O produto é acondicionado em caminhões, para uso imediato, ou em silo térmico, a uma temperatura que varia de 140 a 180°C (Figura 7).



**FIGURA 7** – Silo térmico para armazenamento do asfalto produzido e para o abastecimento de caminhões utilizados no transporte do produto para a pavimentação

A Tabela 1 apresenta um sumário das propriedades físicas, nomes químicos e sinônimos, números de CAS\* e do Registro de Efeitos Tóxicos de Substâncias Químicas (RTECS)\*\* para asfalto, fumos de asfalto e tintas à base de asfalto.

**TABELA 1 - Propriedades físicas e outras informações sobre asfalto, fumos de asfalto e tintas à base de asfalto.**

Informação geral	Asfalto	Fumos e vapores de asfalto	Tintas de asfalto
Número CAS	8052-42-4	-	-
Número RTECS	CI99000	-	-
Sinônimos	Betume, cimento de asfalto, emulsão de asfalto, asfalto de petróleo	Fumo de betume	Tinta de betume
Estado físico a temperatura ambiente	Sólido ou um líquido viscoso preto ou marrom escuro		Líquido viscoso preto ou marrom escuro
Solubilidade em água a 20°C	Insolúvel	Insolúvel	Insolúvel
Solubilidade em solvente orgânico	Parcialmente solúvel em solvente orgânico alifático e solúvel em dissulfeto de carbono	Parcialmente solúvel em solvente orgânico alifático e solúvel em dissulfeto de carbono	Parcialmente solúvel em solvente orgânico alifático e solúvel em dissulfeto de carbono

Fonte: HAWLEY'S, 1987; NIOSH, 2000

Os processos de fabricação do asfalto são efetuados em sistema fechado. A exposição humana aos vapores é restrita aos locais de carregamento, transporte e manutenção (limpeza dos tanques). Os fumos de asfalto, gerados a altas temperaturas, são provavelmente os responsáveis

\* *Chemical Abstract Service*

\*\* *Register Technical of Toxic Effects Chemical Substances (RTECS)*

pela produção dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs). Em uma usina de asfalto a quente, o produto final pode chegar a 180°C.

O *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) efetuou levantamentos em várias refinarias dos Estados Unidos da América com o propósito de medir concentrações de HAPs, oriundos dos vapores de CAP liberados no ar. A maioria dos HAPs detectada, cerca de 88%, é composta de dois anéis aromáticos. As informações, relativas à presença de cancerígenos em fumos de asfalto gerados em locais de trabalho nos Estados Unidos, são limitadas. Estudos epidemiológicos que tratam do risco de câncer em trabalhadores de usinas asfalto apresentam resultados limitados e inconclusivos (PARTANEN, T.J., BOFFETTA, P., 1994; NIOSH, 2000). A detecção ocasional de benzo(a)pireno e outros compostos policíclicos aromáticos reconhecidos como cancerígenos em fumos de asfalto gerados ocupacionalmente indica que, sob certas condições, estes compostos estejam presentes neste ambiente de trabalho (BURGAZ, S., *et al.*, 1992; NIOSH, 2000; HEIKKILA, P., *et al.*, 2002).

Estudo relatado na literatura indica que as maiores concentrações de HAPs no ar são encontradas durante as operações de impermeabilização e pavimentação, conforme observado na Tabela 2.

**TABELA 2** - Concentração de vapores HAPs no ar em refinarias, em atividades de pavimentação e em atividades de impermeabilização.

Local de trabalho	Total de HPA (mg/m <sup>3</sup> de ar)
REFINARIA	Não detectado
PAVIMENTAÇÃO	2 a 13
IMPERMEABILIZAÇÃO	10 a 112

Fonte: MALAIYANDI, M., *et al.*, 1982; REVAP, 1996



Em 1977 o NIOSH recomendou um limite de exposição (REL)\* de 5mg/m<sup>3</sup> como limite teto para fumos de asfalto medidos como particulado total. Este REL tinha a intenção de proteger trabalhadores contra os efeitos agudos destes fumos, incluindo a irritação das membranas do tecido conjuntivo, do trato respiratório e das mucosas. Em 1988, recomendou que os fumos de asfalto fossem considerados como potencial carcinogênico ocupacional, baseado em resultados de estudos experimentais. Nestes estudos os fumos condensados de asfalto gerados em laboratório induziram, em ratos, tumores malignos de pele (NIOSH, 2000). A *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* – ACGIH – tem adotado o valor de 0,5mg/m<sup>3</sup> como TLV-TWA\* para fumos de asfalto (ACGIH, 2002). Esse limite também se baseia nos efeitos irritantes (NORSETH, T., WAAGE, J., DALE, I., 1991; CHASE, R.M., *et al.*, 1994). Embora existam relatos desses efeitos, um estudo recente não foi capaz de demonstrar uma consistente associação entre função pulmonar ou incidência de sintomas e a exposição a fumos de asfalto (GAMBLE, J.F., NICOLICH, M.J., BARONE, N.J., *et al.*, 1999). Como existe essa divergência, novas pesquisas devem ser desenvolvidas com o escopo de esclarecer a ocorrência ou não dos efeitos adversos aos HAPs.

Os resultados de estudos epidemiológicos indicam que há um aumento do risco de câncer ocupacional, principalmente de pulmão, mas não há evidência suficiente que atribua este aumento aos fumos de asfalto isoladamente ou, concomitantemente, a outras exposições como carvão, alcatrão e asbesto. Os dados atuais são considerados insuficientes para a quantificação dos riscos agudos e crônicos da exposição aos fumos e aos vapores de asfalto. Desta forma, são necessários estudos adicionais em trabalhadores de usinas de asfalto para melhor caracterizar a exposição a HAPs e avaliar o risco de doenças crônicas, incluindo o câncer ocupacional (NIOSH, 2000; BURSTYN, I., 2000a e 2000b).

---

\* *Recommended Exposure Limit*

\* *Threshold Limit Value – Time Weighted average*

A IARC caracteriza diferentes HAPs como cancerígenos em humanos e animais de experimentação (IARC, 1983). O efeito carcinogênico é a razão primordial da preocupação científica em relação aos níveis destes compostos encontrados no ambiente de trabalho, como pode ser verificado por meio de diversos estudos epidemiológicos que demonstram um aumento na incidência de câncer em trabalhadores expostos (HUNTER, D., 1975; MORTELMANS, K., *et al.*, 1986; KATTYAR, S.K., *et al.*, 1993; OMLAND, O., 1994; KOICHI, M., *et al.*, 1996; VINEIS, P., *et al.*, 1996; POPP, W., *et al.*, 1997; KUBLIAK, R., *et al.*, 1999; IARC, 2001). Diversos estudos epidemiológicos demonstram uma associação entre o aumento do risco de câncer de pele e de pulmão em trabalhadores de usinas de asfalto e dos trabalhadores responsáveis pela pavimentação. Este risco parece estar associado à exposição ao asfalto ou betume, no entanto, esta associação pode ser confundida pela exposição concomitante com o carvão e o alcatrão, os quais contem muitos HAPs (HERRICK, R.F. *et al.*, 2000). Além disto, trabalhadores de atividades industriais onde os níveis dos HAPs no ar são altos, como gasodutos, fornalhas e em indústrias de alumínio, apresentam incidência elevada de câncer. A usina de asfalto é uma atividade caracterizada como cancerígena para humanos de acordo com a classificação IARC e, com isso, uma estratégia de monitorização é sugerida (IARC, 1983, 1984b, 1985; HATJIAN, B.A., *et al.*, 1995). Os fumos de asfalto são relatados na documentação dos limites de exposição adotados pela ACGIH como “Substâncias Químicas e Outros Assuntos em Estudo” (ACGIH, 2002).

A determinação destas substâncias pode ser realizada através da avaliação ambiental das misturas de HAPs e/ou de um único HPA envolvido.

### 2.3. Pireno e 1-hidroxi pireno

O pireno (CAS 129-00-0) é um dos compostos mais frequentes no grupo dos HAPs. Está presente no ambiente como resultado de processos pirolíticos e é considerado, pela Agência de Proteção Ambiental – EPA\*, junto com um grupo de 17 HAPs, um poluente prioritário. A estrutura deste composto, com quatro anéis aromáticos e de alto peso molecular (Figura 8), é encontrada em moléculas de outros HAPs com potencial de carcinogenicidade, embora, muitas fontes classifiquem o pireno como não-carcinogênico para humanos (IARC, 1984a, 1984b, 1987; WHO, 1998; NETTO, A.D.P., *et al.*, 2000; UNITED STATES (EPA U.S.), 2000; RAVELET, C., *et al.*, 2001; IRIS, 2002).

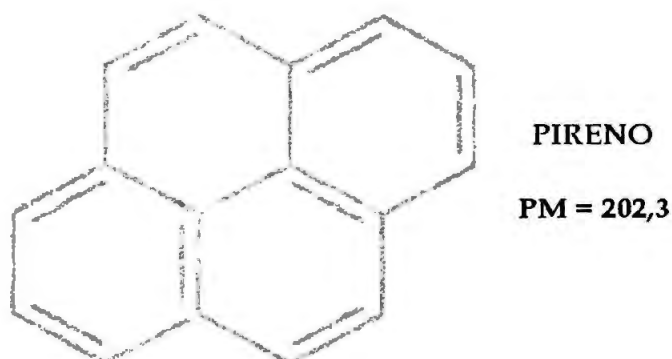


FIGURA 8 – Fórmula estrutural e peso molecular do pireno

Baseado na sua pressão de vapor ( $8,9 \times 10^{-5}$  mm Hg a  $25^{\circ}\text{C}$ ) o pireno pode ser encontrado na atmosfera sob a forma de vapor e adsorvido no material particulado. A exposição humana a este composto ocorre por meio da inalação da fumaça do cigarro, de poluentes atmosféricos,

---

\* *Environmental Protect Agency*

particularmente em áreas com tráfego pesado ou próximas de indústrias, e pela ingestão de água e alimento contaminados. A exposição ocupacional pode ocorrer através da inalação e contato dérmico deste composto no ambiente de trabalho onde o petróleo, o carvão e o alcatrão são utilizados, ou em locais onde processos de combustão são comuns como em plantas de coque, fundição de ferro e fábricas de alumínio. Os HAPs considerados pesados, com 4, 5 e 6 anéis, são mais persistentes no ambiente geral que outros com 2 e 3 anéis e tendem a gerar um potente impacto ambiental (IRWIN, R., *et al.*, 1997; GERDE, P., *et al.*, 1998; NETTO, A.D.P., *et al.*, 2000; IRIS, 2002).

Alguns valores obtidos de diversos estudos realizados com o pireno são apresentados na Tabela 3.

**TABELA 3 - Estudos de toxicidade aguda e crônica realizados após exposição ao pireno**

Estudo	Espécie animal	Via de introdução	Resultado	Efeito observado
Toxicidade aguda	Camundongos	Intraperitoneal	DL <sub>50</sub> 514mg/kg	-
Toxicidade aguda	Ratos	Oral	DL <sub>50</sub> 2700mg/kg	conjuntivite, excitação e contração muscular
Toxicidade aguda	Camundongos	Oral	DL <sub>50</sub> 800mg/kg	conjuntivite, excitação e contração muscular
Toxicidade aguda	Ratos	Respiratória	CL <sub>50</sub> 170 mg/m <sup>3</sup>	conjuntivite, excitação e contração muscular
Toxicidade crônica	Camundongos	Oral	DNEAO 75 mg/kg/day MDEAO 125 mg/kg/day	Efeitos renais -- patologia tubular renal e decréscimo no peso dos rins – Nefropatia

DL<sub>50</sub> = dose letal 50; CL<sub>50</sub> = concentração letal 50; DNEAO = dose de nenhum efeito adverso observado e MDEAO = menor dose em que o efeito adverso é observado.

Fonte: RTECS, 2002; HSDB, 2002

A fototoxicidade (aumento da sensibilidade dérmica na presença da luz) é relatada em uma grande variedade de organismos aquáticos e estudos com cobaias realizados com o pireno (IRWIN, R., *et al.*, 1997; WHO, 1998), todavia, não há informações suficientes de teratogenicidade e embriotoxicidade humana. Um estudo realizado com ratos não demonstrou a ocorrência de transferência placentária após a exposição a este composto (CHEMINFO, 2002). Os resultados inconsistentes de vários experimentos impedem a classificação do pireno como mutagênico (WHO, 1998).

Os HAPs estão geralmente associados com efeitos retardados como o câncer e, freqüentemente, são resultados de uma exposição a misturas complexas. No entanto, o pireno não tem sido tratado como um agente carcinogênico. De acordo com a EPA U.S. (2000) e a IARC é classificado como não-carcinogênico para humanos, caracterizado nos grupos D e 3, respectivamente (IARC, 1987; IRWIN, R., *et al.*, 1997; HSDB, 2002; IRIS, 2002; CHEMINFO, 2002).

Há inúmeras discussões a respeito de quais dos compostos de HAPs são classificados como cancerígenos e como são avaliados os riscos ecológicos e humanos para as misturas complexas destes compostos. Em relação a essas discussões, verificam-se conclusões errôneas provenientes de trabalhos incompletos e inconsistentes. No entanto, definir o caminho adequado para uma pesquisa objetiva é ainda mais difícil, levando-se em conta que um composto de HAP ocorre, habitualmente, na presença de outros (IRWIN, R., *et al.*, 1997; UNITED STATES (EPA U.S), 2000).

O pireno está presente em praticamente todas as misturas de HAPs em concentrações que variam de 2 a 10% do total (BUCHET, J.P., *et al.*, 1992). Segundo alguns relatos, este composto pode ser considerado o maior componente no conteúdo total dos HAPs encontrados no ambiente e, tendo em vista esta abundância, o seu produto de biotransformação foi selecionado

para avaliar a exposição a essas substâncias (IARC, 1983; JONGENEELLEN, F.J., *et al.*, 1985, 2001; BUCHET, J.P., *et al.*, 1992; VIAU, C., *et al.*, 1995a, 1995b; APOSTOLI, P., *et al.*, 1996, 1997; BOUCHARD, M., *et al.*, 1998; WHO, 1998).

O pireno é biotransformado no fígado inicialmente em 1-hidroxi pireno (1-OHP) e depois em 1-hidroxi pireno-glicuronato. Ambos os metabólicos são excretados, via trato gastrointestinal com as fezes e, aproximadamente, 10% na urina (DELL'OMO, M., *et al.*, 1998; WHO, 1998). BOUCHARD, M., *et al.* (1998) sugerem que o <sup>14</sup>C-pireno é rapidamente distribuído, biotransformado e eliminado do organismo e o 1-OHP, na urina, representa uma fração constante de <sup>14</sup>C.

Na busca de um marcador biológico confiável da exposição aos HAPs JONGENEELLEN, F.J., *et al.* (1985) sugeriram o 1-OHP urinário como um biomarcador com tal atributo e, desde então, tem sido muito utilizado (JONGENEELLEN, F.J., *et al.*, 1985, 1986, 1987, 1988, 1990; ANGERER, J., *et al.*, 1992; BUCKLEY, T.J., 1992; BURGAS, S., *et al.*, 1992; CALDERON, F.M., 1993; BOOGAARD, P.J., *et al.*, 1995; GOEN, T.H., *et al.*, 1995; SINGH, R., *et al.*, 1995; OVREBO, S., *et al.*, 1995; LEVIN, J.O., 1995; LEVIN, J.O., *et al.*, 1995; MALKIN, R., *et al.*, 1996; GRIMMER, G., *et al.*, 1997; ROGGI, C., *et al.*, 1997; POPP, W., *et al.*, 1997; MIELZYNSKA, D., *et al.*, 1997; DOR, F., *et al.*, 2000; HERRICK, R.F., *et al.*, 2000; LAFONTAINE, M., *et al.*, 2000; FINNISH INSTITUTE OF OCCUPATIONAL HEALTH (FIOH), 2001; JONGENEELLEN, F.J., 1997, 2001). Uma recente pesquisa bibliográfica no banco de dados *Toxiline*, abrangendo os anos de 1985 a 2003, realizada com a palavra chave "hydroxypyrene" resultou em aproximadamente 400 artigos relatando estudos sobre este biomarcador. Uma recente resenha de biomarcadores de HAPs em saúde ambiental e ocupacional sugere o 1-OHP urinário como o mais relevante parâmetro para estimar a exposição individual aos HAPs (DOR, F., *et al.*, 2000; JONGENEELLEN, F.J., 2001).

---

No trabalho de JONGENELEN F.J. (2001) foram compiladas concentrações do 1-OHP em populações de diversos países não expostas ocupacionalmente aos HAPs (LEVIN, J.O., 1995; WHO, 1998). Estas concentrações estão na faixa de 0,06 a 0,23  $\mu\text{mol/mol}$  de creatinina (0,18 a 0,69  $\mu\text{g/L}$ ). Não foram relatadas diferenças atribuídas à idade e gênero, tampouco influência do consumo de bebidas alcoólicas nas concentrações de 1-OHP. No entanto, foi relatado que a fumaça de cigarro constitui um dos maiores fatores de variação (SIWINSKA, E., *et al.*, 1998, 1999; JONGENELEN, F.J., 2001). A ACGIH (2003) sugere a utilização do 1-OHP como indicador biológico da exposição (BEIs®)\* aos HAPs, no entanto, o valor para tal está em aberto, à espera de informações e sugestões (ACGIH, 2003).

## 2.4. Aspectos analíticos dos HAPs

Desde 1980 a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência tem sido de grande utilidade em métodos para a determinação de misturas complexas de HAPs, geralmente utilizando uma detecção de fluorescência seletiva ou com ultravioleta (UV) (BJORSETH, A., & RAMDAHL, T., 1985; JOHNSTON, J.J., *et al.*, 1991; JOHNSON, C., *et al.*, 1999; KIM, H., *et al.*, 1999). Diversos estudos citados por BJORSETH & RAMDAHL (1985) descrevem que colunas C<sub>18</sub> fornecem não somente eficientes separações como também diferentes características de seletividade e de retenção para os HAPs.

A cromatografia líquida tem sido utilizada exhaustivamente na análise de misturas de HAPs em amostras de ar e outras matrizes, entre as quais a urina, como relatado na literatura científica (BJORSETH, A. *et al.*, 1985; JOHNSTON, J.J., *et al.*, 1991; JONGENELEN, F.J., 1997; WHO, 1998;

---

\* *Biological exposure indices.*

JOHNSON, C., *et al.*, 1999; KIM, H., *et al.*, 1999; LAFONTAINE, M., *et al.*, 2000; JONGENEELLEN, F.J., 2001).

Sintetizando o que foi tratado em generalidades como fecho, podemos verificar que a determinação das concentrações de HAPs em atmosfera de locais de trabalho pode não resultar numa medida da exposição real do trabalhador, mas sim de uma estimativa desta exposição devido as diferentes vias de introdução do analito no organismo. Sendo assim, além da valiosa contribuição da monitorização ambiental, a qual visa identificar e quantificar o risco, a monitorização biológica tem sido usada com sucesso como procedimento complementar, tornando possível obter informações da real absorção das substâncias químicas pelos trabalhadores expostos (BJORSETH, A., RAMDAHL, T., 1985; QUE HEE, S.S., 1993; AITIO, A., 1994). Uma desvantagem da monitorização ambiental é que esta não leva em conta a absorção via dérmica, que é considerada uma importante via de exposição aos HAPs, razão pela qual, a monitorização biológica deve, se possível, ser também realizada, objetivando completar os resultados da monitorização ambiental (BUCHET, J.P., *et al.*, 1992; VANROOIJ, *et al.*, 1993, 1994; BOOGARD & VAN SITTER, 1995; MENDELSON, M.L., *et al.*, 1995; MALKIN, *et al.*, 1996; BENTSEN, R.K., *et al.*, 1998).

O conhecimento adequado dos efeitos toxicológicos da exposição aos HAPs, presentes no ambiente de vida (macro-ambiente) e de trabalho, justifica a avaliação do ar do ambiente de trabalho por meio da determinação do pireno e a avaliação biológica dos trabalhadores expostos com a determinação do 1-OHP urinário.



### 3. OBJETIVOS

#### *Específico*

Otimizar e validar uma metodologia para a determinação do 1-hidroxipireno em amostras de urina e outra para a determinação do pireno em membrana de teflon e resina adsorvente exposta num ambiente de trabalho.

#### *Geral*

Com os dados do objetivo específico, procuramos verificar o nível de exposição dos trabalhadores de uma usina de asfalto aos HPAs por meio de avaliações ambientais e biológicas.

#### 4. PLANO DE TRABALHO

O plano de trabalho delineado para concretizar os objetivos propostos foi estabelecido da maneira como segue:

- 1) Levantamento e estudo de vários aspectos da exposição humana aos HPAs;
- 2) Levantamento e estudo dos métodos analíticos propostos para a determinação do pireno no ambiente de trabalho e do 1-OHP na urina de trabalhadores expostos e não-expostos;
- 3) Otimizar as condições de um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC)\* acoplado a um detector de fluorescência para a análise do 1-hidroxipireno e do pireno;
- 4) Validar os parâmetros analíticos para a determinação do 1-hidroxipireno em amostras de urina e do pireno em amostras do ar;
- 5) Otimizar os procedimentos que antecedem a análise, como aplicação de questionários, coleta, transporte e armazenamento e preparação das amostras para análise;

---

\* *High Performance Liquid Chromatography*

- 6) Aplicar um questionário, juntamente com um termo de consentimento, aos trabalhadores ocupacionalmente expostos aos HPAs, conforme documento anexo;
  - 7) Analisar amostras de urina de indivíduos ocupacionalmente expostos aos HPAs e amostras ambientais, coletadas em usina de asfalto;
  - 8) Realizar análises estatísticas apropriadas;
  - 9) Avaliar os resultados obtidos comparando-os com os relatados na literatura e;
  - 10) Corroborar que o 1-OHP, agora presente na lista da ACGIH, seja utilizado como marcador biológico da exposição aos HAPs.
-

## 5. MATERIAL E MÉTODO

### 5.1. Material

#### 5.1.1. Amostras

##### 5.1.1.1. Amostras de urina

As amostras de urina destinadas à otimização dos parâmetros para o estudo de validação do método analítico para a determinação do 1-OHP foram preparadas a partir de um *pool* de urina, obtido de alunos de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. As amostras foram colhidas, homogeneizadas e adicionadas com solução padrão de 1-hidroxi pireno em diferentes concentrações para o preparo da curva de calibração, estudo de linearidade, limite de detecção e quantificação, precisão, recuperação, efeito da matriz e estabilidade.

As amostras de urina destinadas à determinação do 1-hidroxi pireno foram obtidas de trabalhadores expostos aos HAPs, formados e liberados no ambiente de trabalho a partir da produção do asfalto a altas temperaturas.

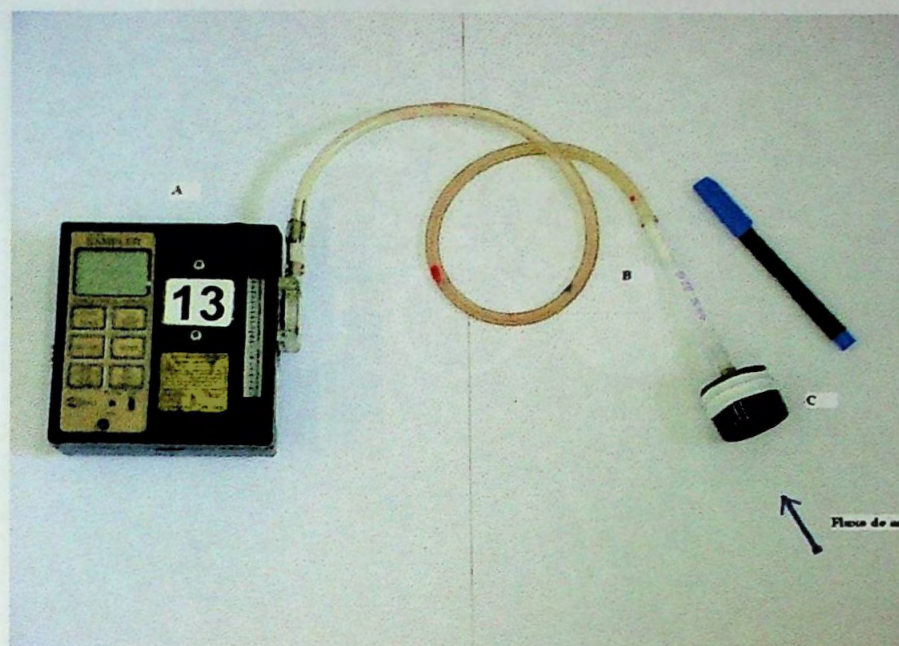
Foram realizados quatro lotes de amostragem com, aproximadamente, 40 trabalhadores, totalizando 126 amostras de urina coletadas no final da semana e da jornada de trabalho. A coleta das amostras de urina foi realizada em um grupo de funcionários responsáveis pela limpeza na área da produção ou aqueles que trabalham propriamente na produção do asfalto. Foram, também, coletadas amostras de urina de um grupo de indivíduos de

postos de trabalho não ligados, diretamente, à produção do asfalto, tais como o ambulatório, o refeitório e a administração. Este grupo foi denominado “grupo controle”.

O seguinte procedimento de amostragem foi padronizado: a urina, proveniente de única micção, foi coletada diretamente em frascos de polietileno, próprios para a finalidade proposta. Após a coleta, as amostras foram mantidas e transportadas em caixas de poliestireno até o laboratório de Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP. No mesmo dia da coleta foram realizadas as análises de gravidade específica e creatinina (para correção e ajuste dos resultados posteriormente obtidos) e então armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  (AZEVEDO, F.A., DELLA ROSA, H. V., LEYTON, V.O., 1982; ALESSIO, L., *et al.*, 1985; DELLA ROSA, H.V., *et al.*, 1991; MENDELSON, M.L., *et al.*, 1995; DELLA ROSA, H.V., *et al.*, 1996; ACGIH, 2002).

#### 5.1.1.2. Amostras de ar

Foram coletadas amostras de ar com o intuito de cobrir mais de 70% da jornada de trabalho (dentro do período da exposição) por três dias consecutivos. A coleta foi realizada fixando-se uma bomba portátil, como a destacada na Figura 9, nos funcionários da usina de asfalto.



**FIGURA 10** - Bomba de amostragem (A), tubo de amostragem (B) e filtro para partículas (C) na zona respiratória do funcionário compreende de um filtro para o substrato particulado (C) e de uma resina XAD para o substrato na forma de vapor (B), conforme demonstrado na Figura 9. A Figura 10 ilustra o interior do cassete opaco utilizado na coleta.



**FIGURA 10** – Cassete opaco aberto (B e F) a fim de visualizar o seu conteúdo constituído de suporte (C), anel de separação (D) e filtro 37mm de PTFE (E)

Na amostragem do tipo pessoal, foi realizada uma avaliação de acordo com as funções dos trabalhadores, ou seja, na produção do asfalto, limpeza e manutenção/mecânica. A coleta foi realizada entre 7:30 a 12:30 horas, período de funcionamento da usina correspondente à produção do asfalto. Anterior a coleta a bomba foi calibrada com uma vazão de 1,5 L/min. e após aproximadamente 5 horas de coleta foi possível concentrar um volume de 450 L de ar no elemento de capacitação.

Foi também utilizada estratégia de procura da “pior situação”, procedendo-se à coleta em um ponto fixo junto da liberação do asfalto no caminhão, local este de maior exposição provável aos HAPs (Figura 11).



**FIGURA 11** – Local de liberação do asfalto produzido para o caminhão de distribuição. Ponto fixo no lado esquerdo do caminhão (local da cabine de controle)

Após a coleta do substrato no sistema de capacitação os filtros e os tubos com resina adsorvente foram transportados até o laboratório sob refrigeração e protegidos da luz, foram imediatamente e cuidadosamente transferidos para frascos âmbar a fim de evitar perdas e contaminação e por fim foram armazenados a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **5.1.2. Equipamentos, vidrarias e acessórios**

- Cromatógrafo líquido de alta eficiência Hewlett Packard® (HP), modelo 1100 Series, equipado com desgaseificador a vácuo (G1322A), bomba binária (G1312A), injetor automático (G1313A), compartimento de coluna com termostato (G1316A), detector de arranjo de diodos – DAD (G1315A) e um detector de fluorescência



HP 1046A, acoplado a computador, Vectra XM 4-5/150, com *ChemStation*;

- Bomba portátil universal 224-PCXR4, SKC;
- Calibrador *mini-buck calibrator*® M-5;
- Frascos âmbar de 2,0mL, septos de silicone e tampas de rosca Hewlett Packard® (HP);
- Coluna Supelcosil™ LC-PAH (15 cm x 4,6 mm ID), 5 µm, SUPELCO;
- Pré-coluna C<sub>18</sub> (2 cm x 3,0 mm ID), 5µm, SUPELCO;
- Colunas de extração Bond Elut C<sub>18</sub> 500mg/10mL, Varian® (12113027);
- Sistema de extração a vácuo SUPELCO;
- Filtro 37mm, 2µm, PTFE, SKC (225-17-07);
- Anel e suporte de separação de celulose 37mm OD e 32mm ID, SKC (225-23);
- Cassete opaco 37mm, SKC (225-4);
- Tubo coletor, resina XAD-2 (100mg/50mg), SKC (226-30-01) ou SUPELCO (2058);
- Balança analítica, Sartorius® *research* R200D;
- Urodensímetro *Urinometer*®;
- Agitador de tubos, Fanem® 251;

- Pipetas automáticas de diferentes capacidades volumétricas, Finpipette®, Labsystems;
- Bomba de ar Fabbe Primar® 151/VC;
- Ultra-som, Thornton®;
- Peagâmetro Digimed® DMPH-2;
- Bloco térmico Pierce Reacti-therm Heatin, modelo 18870 com fluxo de nitrogênio Reacti-Va 18780;
- Compressor aspirador Dia-pump®, Fanem;
- Filtros Millex em polietileno com membrana Durapore® 0,45µm de poro, 13 mm de diâmetro, não estéril, Millipore®;
- Membrana de celulose MFS®, poro 0,45µm, diâmetro 47mm;
- Sistema de purificação de água Milli-Q Plus, Millipore®;
- Espectrofotômetro - UV/ visível DMS80, Intralab®;
- Frascos volumétricos 5, 10 e 100 mL;
- Conjunto para filtração a vácuo com funil, base e tampa tubulada em vidro borosilicato e garra de alumínio anodizado, Millipore®;
- Seringas de vidro.

### 5.1.3. Padrões e enzima

- 1-hidroxi-pireno 98%, CAS 5315-79-7, Aldrich Chemical Co., Inc., Milwaukee, WI, USA;

- Pireno, CAS 129-00-0, Aldrich Chemical Co., Inc., Milwaukee, WI, USA;
- $\beta$ -glucuronidase tipo H-1 (G0751), Sigma-Aldrich® Química Brasil, São Paulo, Brasil;
- EPA 610, *Polynuclear Aromatic Hydrocarbons Mix*, 100-2000 $\mu$ g/mL MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1), lot. 4-8743, SUPELCO, USA.

#### 5.1.4. Reagentes e solventes

- Tampão de acetato de sódio, solução a 0,1mol/L – pH=5. O acerto do pH, quando necessário, foi realizado em peagâmetro usando-se solução 0,1M de ácido acético;
- Acetonitrila, Omnisolv, grau de pureza cromatográfica, Merck®;
- Metanol, Omnisolv, grau de pureza cromatográfica, Merck®;
- Ácido acético glacial 100% p.a., Merck®, solução a 0,1M (mol/L);
- Kit para determinação de creatinina, LABTEST® diagnóstica, cat.35, Brasil.

Utilizou-se, no preparo das soluções aquosas, água de grau reagente (resistividade > 10 megaohm), Milli Q, Millipore®.

### 5.1.5. Soluções-padrão e fase móvel

#### *1-hidroxi pireno*

Foi preparada uma primeira solução-padrão estoque (SE1) de 1-OHP a 20.000ng/mL. Esta solução foi armazenada em alíquotas e conservada a -20°C. A segunda solução-padrão estoque (SE2) de 1-OHP, a 2.000ng/mL, foi preparada a cada teste por diluição da SE1 em metanol. A partir da SE2 foram preparados os adicionados em amostras de urina para a validação do método analítico e acompanhamento de análises posteriores.

A fase móvel consistiu de solução A (metanol 40% em água) e solução B (metanol 100%). As soluções foram filtradas, através de filtro Millipore 0,45µm, e desgaseificadas sob pressão.

#### *Pireno*

Para os ensaios de otimização e validação da metodologia foi preparada uma solução-padrão estoque (SE1) de pireno a 430µg/mL (430.000ng/mL). Esta solução foi armazenada em alíquotas e conservada a -20°C e diluída a cada lote de experimentos.

A fase móvel consistiu de solução A (acetonitrila 60% em água) e solução B (acetonitrila 100%). As soluções foram filtradas, através de filtro Millipore 0,45µm, e desgaseificadas sob pressão.

## 5.2. Casuística

### *Avaliação preliminar*

A avaliação ambiental tem como finalidade reconhecer e estimar a presença do agente no ambiente de trabalho, para tanto foi requerida uma estratégia de amostragem que dependeu de uma fase preliminar de reconhecimento, de acordo com os passos abaixo descritos (COLACIOPPO, S., 1985; HOFFMANN, P., 1994; LEIDEL, N.A., *et al.*, 1977):

- Visitar a usina de asfalto para definição do espaço físico e elaboração de croqui da área da usina (planta da área correspondente a produção do asfalto, a administração, ao laboratório, ao almoxarifado, a manutenção, ao ambulatório e ao refeitório);
- Observar o número de pessoas no local, caracterizar funções, tarefas, atividades (número de expostos e não-expostos);
- Observar quanto tempo o trabalhador está na função ou atividade para definir a frequência da exposição;
- Observar o ritmo de trabalho, produção, turnos, movimentação do pessoal e movimentação das matérias-primas que sejam fontes da exposição;
- Anotar as características da área: se confinada, aberta, com ventilação forçada, natural, etc.

A estratégia de amostragem foi definida com base nos dados desta visita quando então se estabeleceu o dia e horário de coleta.

---

### *População estudada*

Foram configurados grupos de trabalhadores, possivelmente expostos ou não aos HAPs. Após esclarecimentos sobre o projeto e como condição de inclusão neste protocolo de pesquisa foi apresentado aos funcionários um termo de consentimento (Anexo I) para os interessados assinarem e após esse consentimento foi aplicado um questionário (Anexo II) e distribuído os frascos para a coleta de urina no final da jornada de trabalho.

Os resultados dos questionários, capazes de gerar informações sobre hábitos alimentares, sociais, ocupacionais e ambientais, foram de fundamental importância no intuito de conhecer possíveis interferências externas, facilitando, assim, a interpretação correta dos resultados. Os indivíduos foram então classificados em diferentes categorias segundo determinadas características informadas no questionário.

Os funcionários da usina de asfalto foram classificados quanto as variáveis: fumantes *versus* não fumantes e ocupação A *versus* B. A ocupação A corresponde ao grupo de funcionários possivelmente menos exposto aos HAPs, que compreendem os funcionários da administração, da cozinha, do ambulatório, do laboratório e da limpeza interna e a ocupação B corresponde ao grupo de funcionários presentes na área de produção do asfalto, na oficina mecânica, aqueles responsáveis pela limpeza da área externa da usina, e, ainda, os motoristas do caminhão transportador do asfalto e os pavimentadores.

## 5.3. Método

### 5.3.1 Otimização das condições cromatográficas

Foram testadas as seguintes condições cromatográficas para melhor separação dos analitos 1-OHP e pireno nas amostras selecionadas: coluna e pré-coluna cromatográfica, composição e fluxo da fase móvel, sensibilidade do detector de fluorescência, comprimentos de onda no detector de UV e de fluorescência, temperatura da coluna e volume de injeção. Esses experimentos foram realizados com soluções preparadas em uma faixa de concentração de 0,18 a 10,36 µg/mL de metanol.

Com as condições estabelecidas, foram injetadas no aparelho solução-padrão a 120 ng/mL de 1-OHP em metanol contendo naftaleno a 1,0 µg/mL (10 replicatas) para estabelecer um intervalo de tempo de retenção relativo (trr) do analito (1-OHP) em relação ao padrão interno (PI), o naftaleno.

### 5.3.2. Preparação das amostras

O método para a determinação do 1-OHP em amostras de urina permite a determinação deste analito livre e conjugado. A técnica de extração inclui uma hidrólise enzimática do conjugado com 25 µL β-glicuronidase/aril sulfatase, seguido de uma purificação da amostra em um cartucho C<sub>18</sub>. A separação e a identificação ocorrem por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (JONGENELEN, F.J., *et al.*, 1986, 1987; BUCHET, J.P., *et al.*, 1992; ELOVAARA, E., *et al.*, 1995; HANSEN, A.M.; CHRISTENSEN, J.M., *et al.*, 1995; HATJIAN, B.A., *et al.*, 1995; OVREBO, S., *et al.*, 1995; BOUCHARD, M. & VIAU, C., 1996; MOEN, B.E., *et al.*, 1996;

NIELSEN, P.S., *et al.*, 1996; ROGGI, C., *et al.*, 1997; LAFONTAINE, M., *et al.*, 2000; PAVANELLO, S.; GENOVA, A.; FOA, V., *et al.*, 2000).

As amostras de ar foram analisadas por meio da técnica de HPLC com detecção por fluorescência, fase móvel acetonitrila/água e coluna de fase reversa 150 x 4.6-mm, 5- $\mu$ m C<sub>18</sub>. A extração foi realizada com acetonitrila em banho de ultra-som por um período de 30 a 60 minutos (NIOSH, 1998).

A Figura 12 ilustra o fluxograma do método para a determinação do 1-OHP em amostras de urina. A otimização foi baseada neste fluxograma.



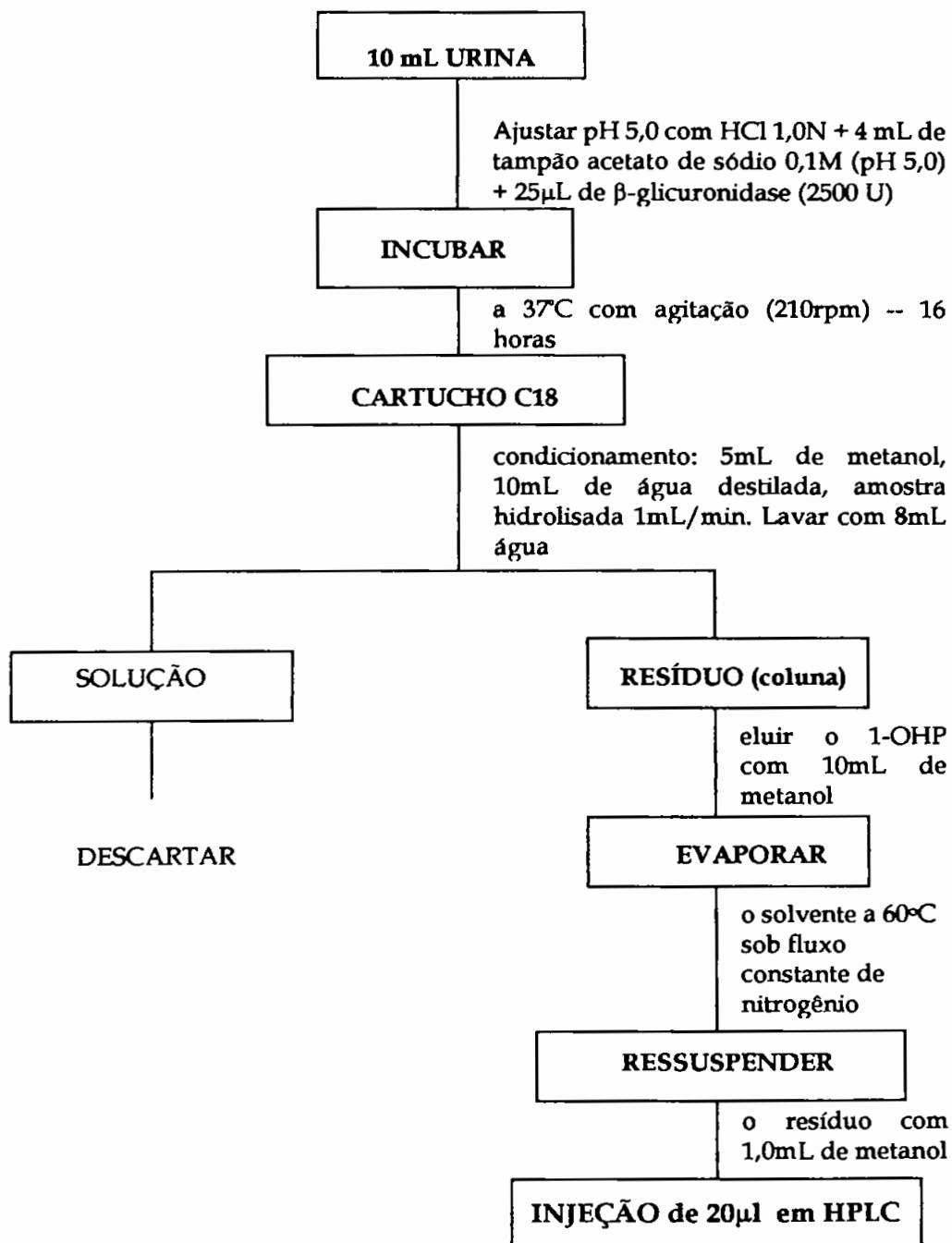
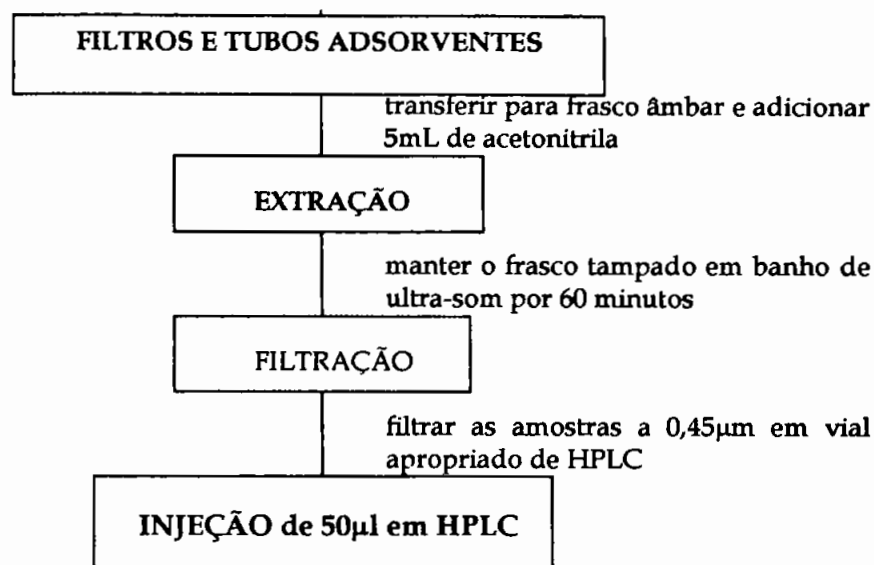


FIGURA 12 - Fluxograma do método para a determinação de 1-hidroxi-pireno em amostras de urina (JONGENELEN, F.J., *et al.*, 1987)

A preparação das amostras ambientais seguiu o protocolo do método 5506 (NIOSH, 1998) e está resumida no fluxograma ilustrado na Figura 13.



**FIGURA 13** - Fluxograma do método para a determinação do pireno coletado nos filtros e tubos adsorventes expostos ao ar respirável pelos funcionários da usina de asfalto (NIOSH, 1998)

### 5.3.3. Validação de parâmetros analíticos para a determinação do 1-hidroxi pireno em amostras de urina e do pireno nos filtros e tubos adsorventes expostos ao ar respirável

A validação do método proposto consiste da avaliação dos parâmetros: robustez, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação, linearidade, curva de calibração, precisão inter e intradia e exatidão, descritos a seguir (CHASIN, A.A.M., *et al.*, 1994, JENKE, D.R., 1996; LEITE, F., 1996; THOMPSON, M., 1997; CHASIN, A.A.M., *et al.*, 1998; BRASIL (ANVISA), 1999; WATERS, 2002). Os parâmetros foram

avaliados para o 1-OHP e para o pireno nas concentrações descritas na Tabela 4.

**TABELA 4** – Soluções-padrão de 1-OHP e do pireno nas concentrações denominadas neste estudo de concentração baixa (CB), concentração média (CM) e concentração alta (CA)

	<b>1-HIDROXIPIRENO (ng/mL)</b>	<b>PIRENO (µg/mL)</b>
<b>CB</b>	2,0	0,107
<b>CM</b>	20,0	0,430
<b>CA</b>	30,0	0,860

Em algumas análises foram utilizadas amostras adicionadas com 5,0 e 10,0ng/mL (1-OHP) e 0,215 - 0,645 e 1,075µg/mL (pireno), utilizadas como controles de qualidade, a fim de melhorar a performance das análises.

#### 5.3.3.1. Robustez

A robustez foi avaliada durante a fase de desenvolvimento do método analítico com a finalidade de controlar possíveis variações nas condições analíticas previamente otimizadas. As variações que podem ocorrer durante os procedimentos de extração e identificação do analito em estudo determinado por cromatografia líquida são as seguintes:

- Estabilidade das soluções analíticas após o preparo;
- Tempo de extração do analito;
- Influência da variação de pH da fase móvel;

- Influência da variação da composição da fase móvel;
- Diferentes colunas (diferentes lotes e/ou fabricantes);
- Temperatura da coluna;
- Velocidade de fluxo do eluente.

#### 5.3.3.2. Especificidade ou efeito da matriz

Amostras de urina obtidas de seis indivíduos (*pool* de urina) e amostras de metanol enriquecidas com padrão de 1-OHP, nas concentrações 0,5; 1; 2; 5; 10; 20; 30 e 40ng/mL e o branco, foram preparadas em seis replicatas e analisadas. As amostras de urina foram preparadas segundo o procedimento descrito na Figura 12. Os dados deste estudo foram utilizados a fim de avaliar a interferência da matriz biológica na análise dentro das condições otimizadas.

Qualquer análise por HPLC, do metanol ou do solvente de extração e/ou preparação das amostras e do padrão, que apresentou interferência significativa no tempo de retenção do analito em estudo, foi rejeitada. Os interferentes podem ser componentes da matriz biológica, outros produtos de biotransformação, produtos de decomposição e medicamentos utilizados concomitantemente ao estudo. Os resultados entre as curvas de calibração obtidas foram comparados quanto à inclinação e à interceptação da reta.

Este estudo não foi realizado para as amostras ambientais, já que estas foram preparadas no próprio solvente analisado, a acetonitrila.

### 5.3.3.3. Limite de detecção

O limite de detecção (LD) é estabelecido através da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável (CURRIE, L.A., 1995). Recomenda-se que o LD seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base e pode ser expresso pela equação:

$$LD = DP (1 \text{ ou } 2) \times 3,3 / i.c.$$

Onde: DP1 = desvio-padrão do intercepto com o eixo do y de várias curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação. DP2 = análise de um apropriado número de amostras do branco (10 replicatas); ic = inclinação da curva de calibração.

O limite de detecção foi obtido a partir da análise de amostra de urina adicionada de 0,1; 0,2; 0,5 e 1ng de 1-OHP/mL. As amostras foram preparadas em seis replicatas segundo o procedimento descrito anteriormente (Figura 12).

Para o cálculo do limite de detecção do método para a determinação do pireno em amostras de ar, foram preparadas amostras adicionadas de 0,002; 0,005; 0,01; 0,02; 0,03 e 0,05 $\mu$ g de pireno/mL de acetonitrila. As amostras foram preparadas em seis replicatas para cada concentração, segundo o procedimento descrito anteriormente (Figura 13).

### 5.3.3.4. Limite de quantificação

O limite de quantificação (LQ) deve ser no mínimo cinco vezes superior a qualquer interferência da amostra branco no tempo de retenção do analito (CURRIE, L.A., 1995). O LQ é estabelecido através da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do analito até o menor nível

determinável com precisão e exatidão aceitáveis e pode ser expresso pela equação:

$$LQ = DP(1 \text{ ou } 2) \times 10 / i.c.$$

Onde: DP1 = desvio-padrão do intercepto com o eixo do y de várias curvas de calibração construídas contendo concentrações do fármaco próximas ao suposto limite de quantificação. DP2 = análise de um apropriado número de amostras do branco (10 replicatas); ic = inclinação da curva de calibração.

O limite de quantificação foi obtido a partir da análise de amostra adicionada de 1,0ng de 1-OHP/mL de urina e 0,05µg de pireno/mL de acetonitrila. As amostras foram preparadas em seis replicatas segundo os procedimentos descritos anteriormente, Figuras 12 e 13, respectivamente.

O pico de resposta do analito no LQ deve ser identificável e reprodutível com precisão de 20% e exatidão de 80 a 120% (CHASIN, A.A.M., *et al.*, 1994, 1998; BRASIL, 1999)

#### 5.3.3.5. Recuperação

A recuperação do 1-OHP em amostras de urina foi avaliada por comparação da concentração obtida, quando a amostra, contendo o analito, é submetida ao processo de extração, em relação à concentração obtida quando a amostra, sem a presença do analito, é submetida ao processo de extração, com adição do padrão antes da análise no HPLC. A preparação das amostras foi realizada segundo o procedimento descrito em 5.3.2 (Figura 12).

A recuperação foi avaliada para as concentrações de LQ, CB, CM e CA dos analitos. A porcentagem de recuperação dos analitos foi obtida aplicando-se a equação:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{concentração com adição antes da extração}}{\text{concentração com adição após a extração}} \times 100$$

Este parâmetro no método para a determinação do pireno em amostras ambientais foi calculado como recuperação (R), na análise dos filtros, e como eficiência de desorção (ED), na análise dos tubos adsorventes, da maneira como segue (NIOSH, 1998):

- (1) Filtros. Os filtros foram transferidos para frasco âmbar. A cada frasco foi adicionada concentração conhecida do analito que originou as concentrações de 0,860 (CA); 0,430 (CM); 0,1075 (CB) e 0,053 (LQ)  $\mu\text{g}$  de pireno/mL de acetonitrila. Foi preparado um total de 30 frascos, considerando as concentrações adicionadas em seis replicatas mais um lote de seis frascos sem adição do padrão (branco).
- (2) Tubos adsorventes. A resina XAD, compactada nos tubos adsorventes, foi transferida cuidadosamente a um frasco âmbar. A cada frasco foi adicionada concentração conhecida do analito que originou as concentrações de 0,860 (CA); 0,430 (CM); 0,1075 (CB) e 0,053 (LQ)  $\mu\text{g}$  de pireno/mL de acetonitrila. Foi, também, preparado um total de 30 frascos, considerando as concentrações adicionadas em seis replicatas mais um lote de seis frascos sem adição do padrão (branco).
- (3) Os frascos com os filtros e as resinas foram mantidos à temperatura ambiente por 12 horas (durante a noite) até a sua preparação conforme descrito em 5.3.2 (Figura 13).

- (4) Foi construído um gráfico de R *versus* quantidade encontrada e outro de ED *versus* quantidade encontrada. Os coeficientes de determinação foram obtidos.

#### 5.3.3.6. Linearidade e curva de calibração

Para verificar a faixa de linearidade do método foram adicionadas, ao *pool* das amostras de urina, soluções-padrão de 1-OHP, de modo a obter as seguintes concentrações: 0,2; 0,5; 1; 2; 4; 6; 8; 10; 20; 40; 80; 120; 160 e 200ng/mL. A curva de calibração para o 1-OHP foi preparada na faixa de concentração de maior interesse (0,5 a 40ng/mL), verificando-se a resposta da curva “área do pico x concentração do 1-OHP”. Essas amostras foram preparadas em seis replicatas, segundo procedimento descrito na Figura 12.

A linearidade para o pireno foi avaliada com as seguintes concentrações: 0,005(LD); 0,010; 0,021; 0,053 (LQ); 0,1075 (CB); 0,215; 0,430 (CM); 0,645; 0,860 (CA) e 1,075 $\mu$ g de pireno/mL de acetonitrila. Essas amostras foram preparadas em seis replicatas, segundo procedimento descrito na Figura 13. A curva de calibração preparada a cada lote de amostras compreende das concentrações de LD, LQ, CB, CM e CA, as demais concentrações foram utilizadas como controle de qualidade.

#### 5.3.3.7. Estudo de precisão inter e intra ensaio

Recomenda-se, no mínimo, a análise de três concentrações (baixa, média e alta) dentro da faixa de limite esperado, realizando-se pelo menos cinco réplicas. O CV não deve exceder 15%, exceto para o LQ, para o qual se



admite valor menor ou igual a 20%. Deve-se realizar análises em um único dia e em vários dias (ensaios intra-dia e inter-dias) (BRASIL, 1999).

Para avaliar a precisão, amostras de urina, enriquecidas com quatro concentrações diferentes: LQ, CB, CM e CA de 1-OHP, e solução de acetonitrila, nas concentrações de LQ, CB, CM e CA de pireno, foram preparadas em seis replicatas, segundo os procedimentos descritos nas Figuras 12 e 13, respectivamente, analisadas no mesmo dia, para o estabelecimento da precisão intra-dia, e preparadas e analisadas em cinco dias consecutivos, para a precisão inter-dias. Os cálculos para o estabelecimento dos coeficientes de variação para os ensaios descritos foram realizados por meio de análise estatística ANOVA: fator único e pelo cálculo de coeficiente de variação - CV% (TSANACLIS, L.M., 1997, 2000; CHASIN, A.A.M., *et al.*, 1998).

#### 5.3.3.8. Exatidão

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do limite de quantificação e da especificidade do mesmo. É definida como a diferença entre o valor teórico presente na amostra e o valor obtido na análise. Determina-se pela análise de amostras contendo quantidades conhecidas do analito, em três concentrações (baixa, média e alta) dentro da faixa de limite esperado, realizando-se pelo menos cinco réplicas. O desvio não deve exceder 15%, exceto para o LQ, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20% (CHASIN, A.A.M., *et al.*, 1998; BRASIL, 1999).

Para o estudo da exatidão, amostras de urina, enriquecidas com três concentrações diferentes: CB, CM e CA de 1-OHP, e solução de acetonitrila, nas suas respectivas concentrações de CB, CM e CA de pireno, foram

preparadas em seis replicatas para cada concentração, segundo o procedimento descrito em 5.3.2, Figuras 12 e 13, respectivamente. A exatidão foi avaliada através da inexatidão ou tendenciosidade (bias) representada pela equação:

$$\text{Inexatidão (\%)} = \left[ \frac{(\text{concentração obtida} - \text{concentração teórica})}{(\text{concentração teórica})} \right] \times 100$$

#### 5.3.3.9. Estabilidade

A estabilidade do analito é avaliada por meio da comparação da concentração obtida no tempo zero e após o período de armazenamento (CHASIN, A.A.M., *et al.*, 1994).

Amostras do *pool* de urina enriquecidas com três concentrações diferentes: CB, CM e CA foram preparadas e armazenadas em alíquotas até serem analisadas, segundo o procedimento descrito em 5.3.2 (Figura 12). Foi avaliada a estabilidade do analito em temperatura ambiente, em período de 5 dias, em geladeira, no período de até 60 dias e, em freezer (-20°C), no período de 30, 120 e 360 dias. O estudo foi realizado para o 1-hidroxi-pireno que utiliza urina como matriz biológica.

A estabilidade do analito foi avaliada pelo aumento da inexatidão, sendo consideradas amostras estáveis as que mantiverem seus resultados dentro de uma margem de inexatidão de até 10%. A variação é calculada considerando a média da 1ª análise como 100%.

#### **5.3.4. Determinação da gravidade específica e da creatinina urinária**

As amostras de urina foram corrigidas e ajustadas pela gravidade específica e creatinina urinária. A gravidade específica foi medida com auxílio de um urodensímetro e os teores de creatinina urinária foram determinados por método espectrofotométrico com o amparo de um "kit" da marca Labtest®. Estas análises foram realizadas antes do congelamento das amostras de urina.

#### **5.3.5. Determinação do 1-hidroxi pireno em amostras de urina de trabalhadores de uma usina de asfalto**

Nos períodos de julho de 2001, maio, novembro e dezembro de 2002 foram realizadas as quatro amostragens de urina para a determinação do 1-hidroxi pireno urinário. A coleta, conforme descrita no item 5.1.1.1, foi realizada em períodos diferentes com o intuito de estabelecer um acompanhamento da exposição dos trabalhadores da usina de asfalto aos HAPs. As amostras foram preparadas conforme 5.3.2 e a concentração expressa em ng/mL ( $\mu\text{g/L}$ ) foi corrigida pela creatinina.

#### **5.3.6. Determinação do pireno nos filtros e tubos adsorventes expostos ao ar respirável pelos trabalhadores na usina de asfalto**

Foram realizadas as coletas de amostra de ar por meio dos filtros e tubos adsorventes expostos ao ar respirável pelos trabalhadores na usina de asfalto para a determinação do pireno. As amostras foram preparadas conforme 5.3.2. e analisadas com HPLC acoplado a um detector de fluorescência para sua quantificação.

### 5.3.7. Análise estatística

Os dados obtidos nas avaliações ambientais e biológicas, assim como nos questionários aplicados, foram compilados em um banco de dados utilizando-se o programa Microsoft<sup>®</sup> Excel 2000. Os testes estatísticos foram realizados com auxílio do *software* GraphPad InStat<sup>®</sup> 3.0, com intervalo de confiança de 95%.

Foram comparadas as seguintes variáveis entre os funcionários da usina de asfalto: fumantes *versus* não fumantes e ocupação A *versus* B. A ocupação A corresponde ao grupo menos exposto, que compreendem os funcionários da administração, da cozinha, do ambulatório, do laboratório e da limpeza interna e a ocupação B corresponde ao grupo de funcionários da área de produção, limpeza da área externa da usina, oficina mecânica, pavimentadores e tráfego. Para estas variáveis foi aplicado o teste Mann-Whitney (teste não pareado e não paramétrico).

A possível correlação entre as concentrações do pireno, obtido nos filtros e tubos adsorventes utilizados para a capacitação do ar da usina de asfalto, e do 1-OHP urinário, obtido nas amostras dos funcionários da mencionada usina, foi verificada através do cálculo do Coeficiente de Correlação ( $r$ ) Pearson (correlação paramétrica) e Spearman (correlação não paramétrica).

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### *Avaliação preliminar*

A proposta à usina de asfalto para a participação neste projeto de pesquisa foi realizada, primeiramente, ao seu superintendente e, então aos supervisores dos setores e aos trabalhadores diretamente envolvidos.

As instalações industriais da usina de asfalto participante deste projeto de pesquisa são constituídas de equipamentos complexos que se destinam à produção de misturas betuminosas a quente. Nestas instalações, tanto os agregados minerais, como os ligantes e o cimento asfáltico são misturados a altas temperaturas (~350°C).

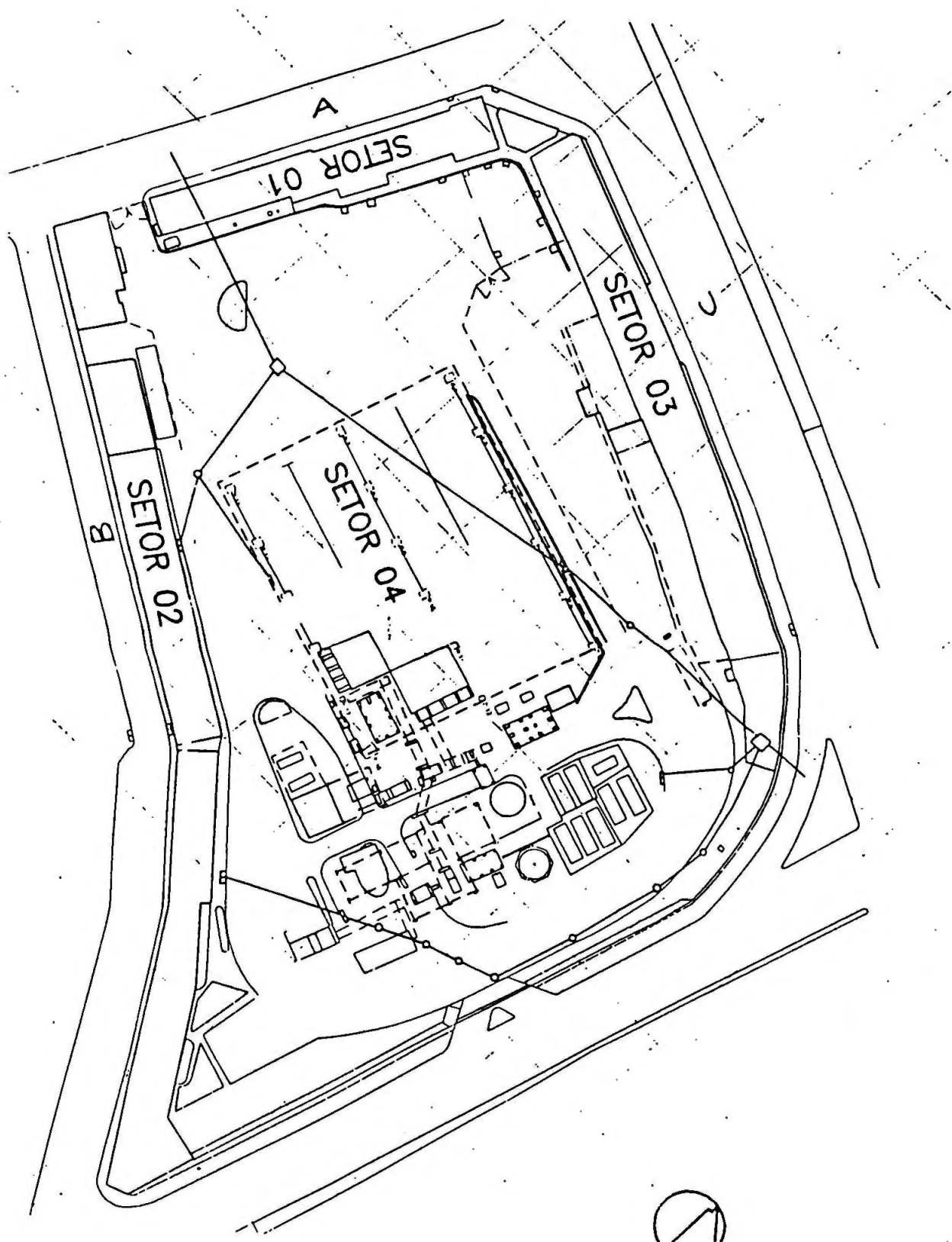


FIGURA 14 - Instalações prediais da usina de asfalto.

A avaliação preliminar foi realizada nas instalações prediais da usina de asfalto, observada na Figura 14, e constituem-se de:

- Setor 1: situado junto ao alinhamento da rua A, possui área aproximada de 550 metros quadrados de projeção. Possui dois pisos (1º) piso térreo - portaria, sala de licitações, unidade de tráfego, departamento pessoal, cozinha industrial, refeitório e sala de aulas, (2º) piso superior - recepção, gabinete da superintendência, expediente, supervisões técnicas, engenharia, informática, reprografia, contabilidade, protocolo, administração e anfiteatro. É uma área confinada, com ventilação natural quando o tempo propicia e com muito ruído da usina e da rua próxima. Área construída com estrutura de concreto e iluminação com lâmpadas fluorescentes.
- Setor 2: construção situada junto à rua B, com área aproximada de projeção de 1.380 metros quadrados. Abriga as seguintes dependências: laboratório de asfalto, almoxarifado, laboratório de concreto/solos, vestiário, oficina elétrica industrial, depósitos, cabine primária de energia elétrica e zeladoria. Área confinada com pouca ventilação e luz natural. A sala de balança é uma sala única com janelas voltadas para a circulação dos caminhões.
- Setor 3: construção contígua à rua C, com área aproximada de 580 metros quadrados. Abriga as seguintes dependências: oficina de manutenção industrial, ferramentaria, tornearia, vestiários, oficina mecânica de autos, máquinas e móveis, oficina elétrica de veículos e depósitos. Área confinada com poucas e pequenas janelas, porém com grandes portas abertas ao pátio da usina (Figura 15).



FIGURA 15 - Oficina mecânica com um portão localizado no lado esquerdo da figura

- Setor 4: galpão construído em estrutura metálica, com área de 3.200 metros quadrados, destinado ao armazenamento de agregados minerais a serem utilizados no sistema produtivo de misturas asfálticas. Área aberta (Figura 16).





**FIGURA 16** - Galpão para depósitos de agregados asfálticos (pedras e pedregulhos), matéria-prima para a produção do asfalto

---

A usina de asfalto conta ainda com as seguintes construções isoladas: ambulatório médico, cabines de operação das usinas, casa de compressores, sala de caldeiras e posto de lavagem e lubrificação, totalizando uma área aproximada de 500 metros quadrados.

#### *População estudada*

A usina possui um quadro de 214 funcionários divididos em três turnos de trabalho. Primeiro turno das 8:00 às 16:00 horas, segundo turno das 16:00 às 24:00 horas e um terceiro das 24:00 às 8:00 horas do dia seguinte.

Embora os turnos de trabalho serem previamente instituídos, a organização do trabalho é gerada aleatoriamente. A grande maioria dos funcionários pertence ao primeiro turno, período no qual foram realizadas as coletas das amostras. Na área da produção há entre 30 a 40 funcionários. As coletas foram acompanhadas por pessoal da Medicina do Trabalho e da Comissão Interna de Prevenção de Acidentes – CIPA.

Algumas características dos trabalhadores responsáveis pela doação das amostras de urina estão descritas na Tabela 5. Os trabalhadores foram classificados pelo tempo de trabalho na empresa, função, idade e hábito de fumar. Esses dados foram utilizados posteriormente na análise estatística.

**TABELA 5 - Característica da população avaliada para a determinação de 1-hidroxipireno em amostras de urina**

Trabalhador	Idade	Sexo	Hábito de fumar	Tempo de trabalho no setor (anos)	Setor de trabalho
0001	55	F	F	10	Cozinha (A)
0002	44	M	F	02	Cozinha (A)
0003	51	F	NF	01	Cozinha (A)
0004	47	F	F	06	Ambulatório (A)
0005	64	F	F	21	Administração (A)
0006	42	F	NF	10	Administração (A)
0007	30	F	NF	00	Controle (A)
0008	59	M	NF	20	Oficina mecânica (B)
0009	54	M	NF	04	Administração (A)
0010	43	M	NF	21	Pavimentação (B)
0011	38	M	NF	10	Produção (B)
0012	42	M	NF	02	Laboratório (A)
0013	50	M	NF	10	Oficina mecânica (B)
0014	56	M	NF	11	Tráfego (B)
0015	52	M	F	16	Administração (A)
0016	41	M	NF	10	Tráfego (B)
0017	41	M	F	11	Produção (B)
0018	35	M	F	12	Laboratório (A)
0019	32	M	F	01	Pavimentação (B)
0020	45	M	NF	19	Produção (B)
0021	57	M	NF	18	Oficina mecânica (B)
0022	51	M	F	30	Administração (A)
0023	47	M	NF	15	Oficina mecânica (B)
0024	52	F	NF	14	Laboratório (A)
0025	53	M	NF	22	Oficina mecânica (B)
0026	41	F	F	02	Laboratório (A)
0027	45	M	NF	17	Oficina mecânica (B)
0028	50	M	NF	20	Pavimentação (B)

M: sexo masculino, F: sexo feminino, NF: não fumante e F: fumante.

**TABELA 5 - Característica da população avaliada para a determinação de 1-hidroxi pireno em amostras de urina (continuação)**

Trabalhador	Idade	Sexo	Hábito de fumar	Tempo de trabalho no setor (anos)	Setor de trabalho
0029	55	M	NF	14	Oficina mecânica (B)
0030	51	M	NF	06	Produção (B)
0031	44	M	F	30	Oficina mecânica (B)
0032	39	M	F	14	Pavimentação (B)
0033	46	M	NF	21	Oficina mecânica (B)
0034	60	M	NF	10	Almoxarifado (A)
0035	53	M	NF	22	Oficina mecânica (B)
0036	47	M	NF	15	Oficina mecânica (B)
0037	52	M	NF	12	Oficina mecânica (B)
0038	54	M	NF	04	Administração (A)
0039	61	M	NF	12	Produção (B)
0040	67	M	NF	01	Administração (A)
0041	48	M	NF	20	Oficina mecânica (B)
0042	59	M	F	20	Oficina mecânica (B)
0043	52	M	NF	16	Pavimentação (B)
0044	58	M	NF	33	Oficina mecânica (B)
0045	50	M	NF	18	Administração (A)
0046	50	F	NF	10	Laboratório (A)
0047	57	M	NF	12	Oficina mecânica (B)
0048	54	M	NF	10	Administração (A)
0049	47	F	NF	01	Ambulatório (A)
0050	65	F	NF	20	Ambulatório (A)
0051	53	M	NF	05	Administração (A)
0052	54	M	NF	11	Administração (A)
0053	50	M	NF	01	Administração (A)
0054	35	F	NF	19	Limpeza (A)
0055	52	M	F	20	Administração (A)
0056	40	M	F	14	CIPA (A)

M: sexo masculino, F: sexo feminino, NF: não fumante e F: fumante.

**TABELA 5 - Característica da população avaliada para a determinação de 1-hidroxipireno em amostras de urina (continuação)**

Trabalhador	Idade	Sexo	Hábito de fumar	Tempo de trabalho no setor (anos)	Setor de trabalho
0057	53	F	NF	12	Limpeza (A)
0058	43	M	NF	19	Administração (A)
0059	44	F	F	08	Limpeza (A)
0060	55	F	NF	10	Cozinha (A)
0061	56	M	NF	11	Tráfego (B)
0062	24	F	NF	01	Limpeza (A)
0063	41	M	NF	17	Oficina mecânica (B)
0064	44	M	NF	21	Pavimentação (B)
0065	32	F	NF	09	Administração (A)
0066	61	M	F	03	Oficina mecânica (B)
0067	64	M	F	02	Limpeza geral (B)
0068	59	M	F	10	Administração (A)
0069	61	M	F	02	Limpeza geral (B)
0070	62	M	F	01	Limpeza geral (B)
0071	51	M	F	01	Limpeza geral (B)
0072	56	M	F	02	Limpeza geral (B)
0073	57	M	NF	01	Administração (A)
0074	56	M	F	02	Limpeza geral (B)
0075	21	M	F	01	Limpeza geral (B)
0076	50	F	NF	02	Limpeza geral (A)
0077	57	M	NF	16	Pavimentação (B)
0078	38	M	F	02	Limpeza geral (B)
0079	33	M	NF	01	Limpeza geral (B)
0080	65	F	NF	06	Ambulatório (A)
0081	55	F	NF	06	Ambulatório (A)
0082	56	M	NF	20	Oficina mecânica (B)
0083	30	F	NF	00	Controle (A)
0084	56	M	NF	02	Limpeza geral (B)

M: sexo masculino, F: sexo feminino, NF: não fumante e F: fumante.

**TABELA 5 - Característica da população avaliada para a determinação de 1-hidroxipireno em amostras de urina (continuação)**

Trabalhador	Idade	Sexo	Hábito de fumar	Tempo de trabalho no setor (anos)	Setor de trabalho
0085	49	M	F	01	Limpeza geral (B)
0086	49	M	NF	01	Limpeza geral (B)
0087	32	M	NF	01	Limpeza geral (B)
0088	47	F	NF	09	Cozinha (A)
0089	49	M	NF	01	Limpeza geral (B)
0090	57	M	F	18	Oficina mecânica (B)
0091	42	F	NF	02	Laboratório (A)
0092	33	F	NF	01	Limpeza (A)
0093	44	M	NF	21	Pavimentação (B)
0094	57	M	NF	01	Administração (A)
0095	47	F	NF	06	Ambulatório (A)
0096	44	F	NF	08	Limpeza (A)
0097	54	M	NF	04	Pavimentação (B)
0098	47	M	F	15	Oficina mecânica (B)
0099	52	M	NF	12	Oficina mecânica (B)
0100	51	M	F	30	Tráfego (B)
0101	41	M	NF	10	Tráfego (B)
0102	59	M	F	20	Oficina mecânica (B)
0103	67	M	NF	01	Tráfego (B)
0104	56	F	NF	02	Limpeza (A)
0105	40	M	F	12	CIPA (A)
0106	61	M	NF	12	Produção (B)
0107	50	M	NF	10	Tráfego (B)
0108	53	F	NF	12	Limpeza (A)
0109	52	M	NF	10	Administração (A)
0110	65	F	NF	06	Ambulatório (A)
0111		F	NF	00	Controle (A)
0112	57	M	NF	18	Oficina mecânica (B)

M: sexo masculino, F: sexo feminino, NF: não fumante e F: fumante.

**TABELA 5 - Característica da população avaliada para a determinação de 1-hidroxi pireno em amostras de urina (continuação)**

Trabalhador	Idade	Sexo	Hábito de fumar	Tempo de trabalho no setor (anos)	Setor de trabalho
0113	54	F	NF	10	Administração (A)
0114	44	M	NF	21	Pavimentação (B)
0115	59	M	F	20	Oficina mecânica (B)
0116	50	M	NF	10	Oficina mecânica (B)
0117	53	M	NF	22	Oficina mecânica (B)
0118	47	M	NF	15	Oficina mecânica (B)
0119	43	F	F	01	Limpeza (A)
0120	53	F	F	12	Limpeza (A)
0121	43	M	NF	19	Administração (A)
0122	51	M	F	30	Administração (A)
0123	52	M	F	01	Oficina mecânica (B)
0124	52	F	NF	01	Limpeza (A)
0125	51	M	NF	12	Oficina mecânica (B)
0126	67	M	NF	01	Administração (A)

M: sexo masculino, F: sexo feminino, NF: não fumante e F: fumante.

A aplicação do questionário aos trabalhadores da usina de asfalto possibilitou a coleta de dados para a descrição e posterior análise estatística com as características informadas pela população estudada. Outro fator importante foi a coleta de múltiplas amostras, pois quanto maior a amostragem, menor será a dispersão dos resultados e quanto menor a dispersão, maior ou melhor pode ser a correlação encontrada.

### 6.1. Otimização das condições cromatográficas

A otimização de um método precede a validação, já que as condições analíticas, uma vez otimizadas, não devem ser alteradas após a sua validação. Validar é estar com o objetivo voltado para a confiabilidade

analítica do laboratório e do método escolhido e otimizado para se obter resultados que se enquadrem às necessidades do problema em questão (CHASIN, A.A.M., *et al.*, 1994; APOSTOLI, P., 1995; HANKS, A. R., 1995; JENKE, D. R., 1996; CHASIN, A.A.M., *et al.*, 1998; BRASIL, 1999).

Os primeiros experimentos de otimização, do equipamento e da metodologia proposta na literatura, estão ilustrados nas Figuras 17 e 18, respectivamente.

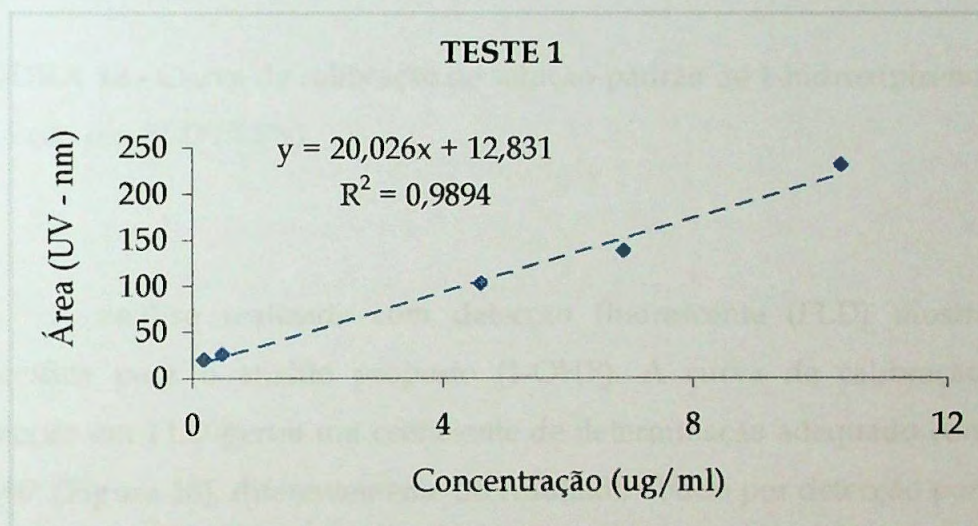


FIGURA 17 - Curva de calibração de solução-padrão de 1-hidroxipireno com detecção em DAD - UV (nm)



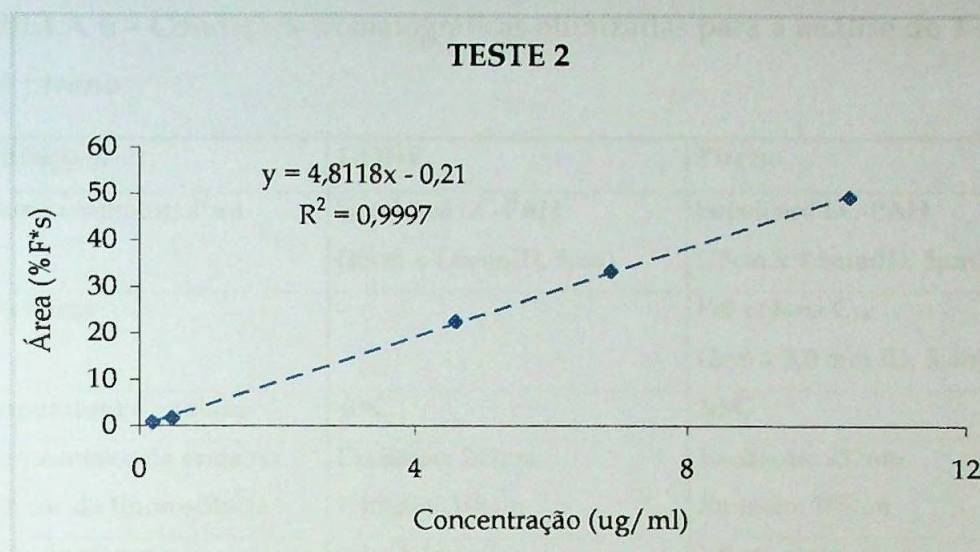


FIGURA 18 - Curva de calibração de solução-padrão de 1-hidroxipireno com detecção em FLD (% F\*s)

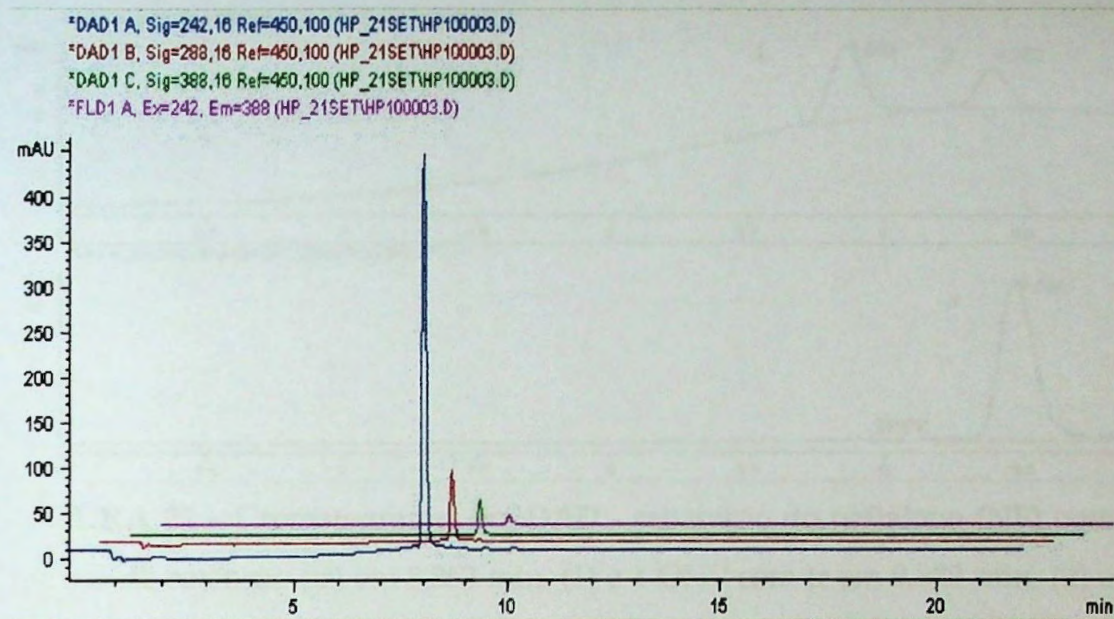
A análise realizada com detecção fluorescente (FLD) mostrou-se específica para o analito proposto (1-OHP). A curva de calibração por detecção em FLD gerou um coeficiente de determinação adequado com  $r^2 = 0,9997$  (Figura 18), diferentemente do resultado obtido por detecção por rede de diodos (DAD) com  $r^2 = 0,9894$  (Figura 17), o qual encontra-se no limite do recomendado (limite aceito:  $1 > r^2 > 0,98$ ) (CHASIN, A.A.M., *et al.*, 1994 e 1998).

Para a melhor separação cromatográfica dos analitos em estudo (1-OHP e pireno) foram estabelecidas as condições cromatográficas expressas na Tabela 6.

**TABELA 6 – Condições cromatográficas otimizadas para a análise do 1-OHP e do pireno**

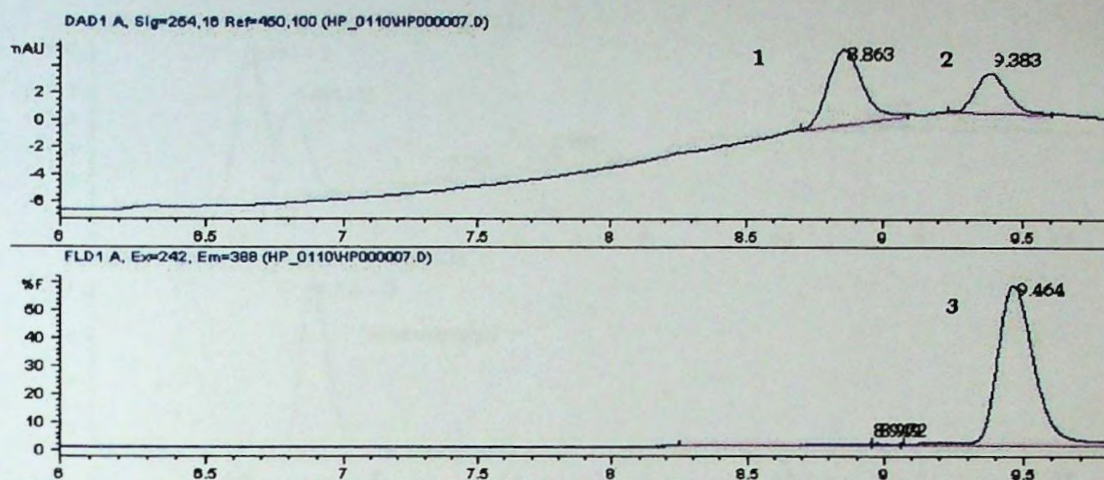
Condições	1-OHP	Pireno
Coluna cromatográfica	Supelcosil LC-PAH (15cm x 4,6mmID, 5 $\mu$ m)	Supelcosil LC-PAH (15cm x 4,6mmID, 5 $\mu$ m)
Pré-coluna	-	Pré-coluna C <sub>18</sub> (2cm x 3,0 mm ID, 5 $\mu$ m)
Temperatura da coluna	40°C	30°C
Comprimento de onda no detector de fluorescência	Excitação: 242nm Emissão: 388nm	Excitação: 237nm Emissão: 385nm
Fluxo do eluente	0,8 mL/min.	1,0 mL/min.

Para o 1-OHP foram realizados testes com sinal em 242, 288 e 388nm no detector de ultravioleta (DAD). Os cromatogramas, nos referidos comprimentos de onda, estão ilustrados na Figura 19.

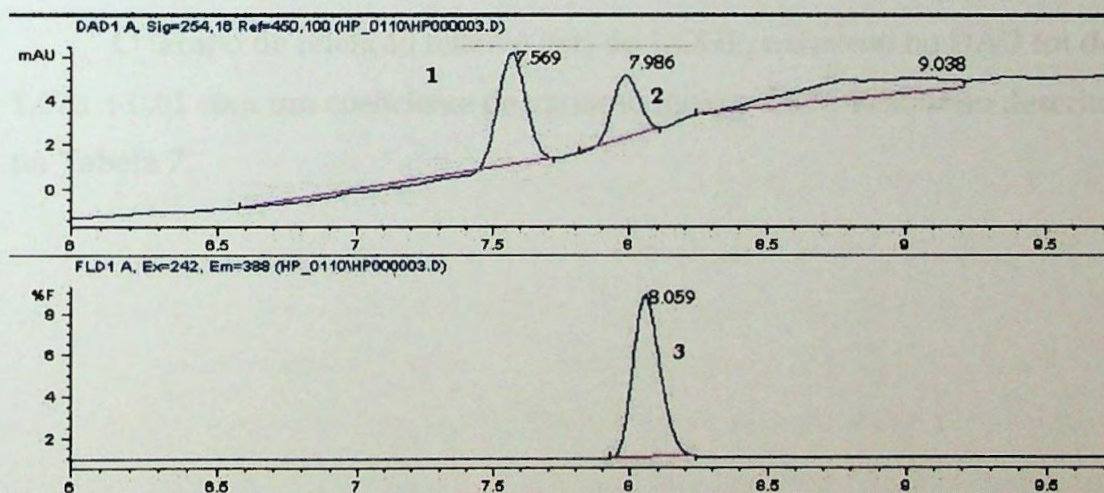


**FIGURA 19** - Cromatogramas representando o pico do 1-hidroxi pireno nos diversos comprimentos de onda. DAD 242nm (azul), DAD 288 (vermelho), DAD 388 (verde) e FLD com  $t_r = 8,042$  min (rosa), na concentração de 2,5 ng/mL

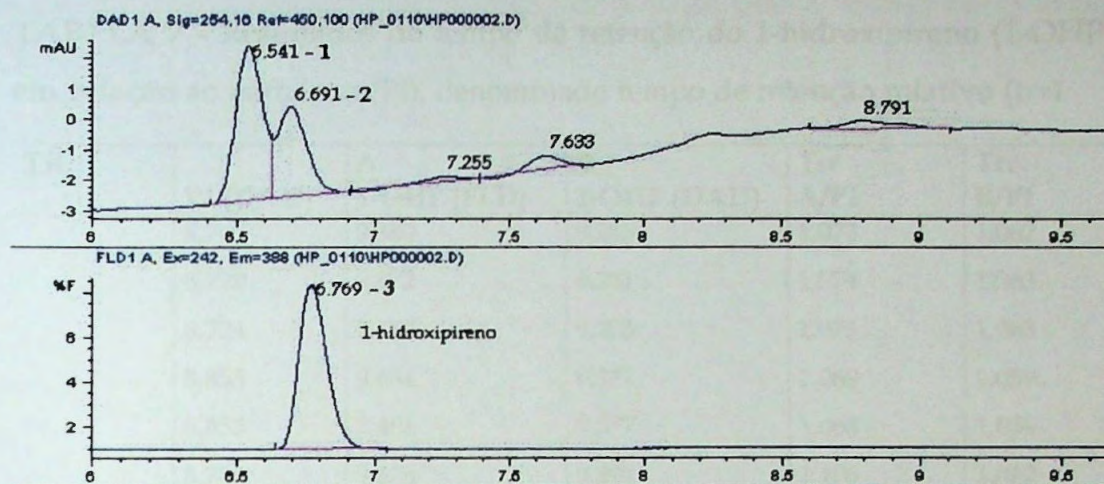
Pode-se observar, nas Figuras 20, 21 e 22, o estudo de fluxo realizado para definir a melhor separação do 1-OHP e seu padrão interno (naftaleno) nos fluxos de 0,7; 0,8 e 0,9 mL/min., respectivamente.



**FIGURA 20** - Cromatogramas em DAD - separação do naftaleno (NF) com tempo de retenção (tr) em 8,863 min. (1) e 1-OHP com tr em 9,383 min. (2) e em FLD - pico do 1-OHP com tr em 9,464 (3). Fluxo: 0,7 mL/min. Eixo y = %F e eixo x = minutos



**FIGURA 21** - Cromatogramas em DAD - separação do naftaleno (NF) com tempo de retenção (tr) em 7,569 min. (1) e 1-OHP com tr em 7,986 min. (2) e em FLD - pico do 1-OHP com tr em 8,059 (3). Fluxo: 0,8 mL/min. Eixo y = %F e eixo x = minutos



**FIGURA 22** - Cromatogramas em DAD - separação do naftaleno (NF) com tempo de retenção ( $t_r$ ) em 6,541 min. (1) e 1-OHP com  $t_r$  em 6,691 min. (2) e em FLD - pico do 1-OHP com  $t_r$  em 6,769 (3). Fluxo: 0,9 mL/min. Eixo y = %F e eixo x = minutos

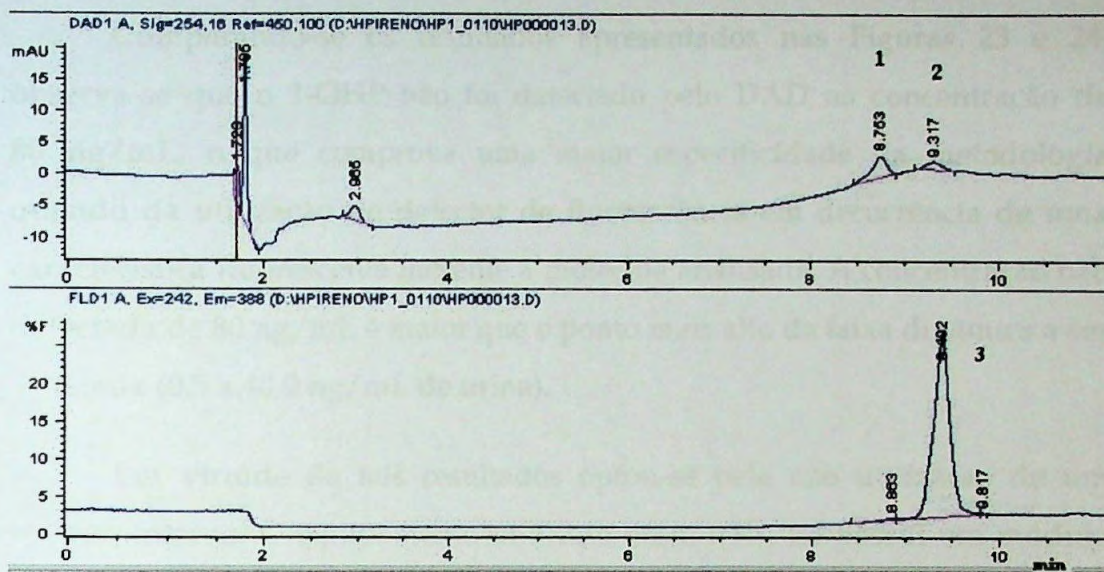
O tempo de retenção relativo ( $t_{rr}$ ) do 1-OHP/naftaleno no DAD foi de  $1,076 \pm 0,01$  com um coeficiente de variação igual a 1,019. Resultado descrito na Tabela 7.

**TABELA 7 - Resultados do tempo de retenção do 1-hidroxipireno (1-OHP) em relação ao naftaleno (PI), denominado tempo de retenção relativo (trr)**

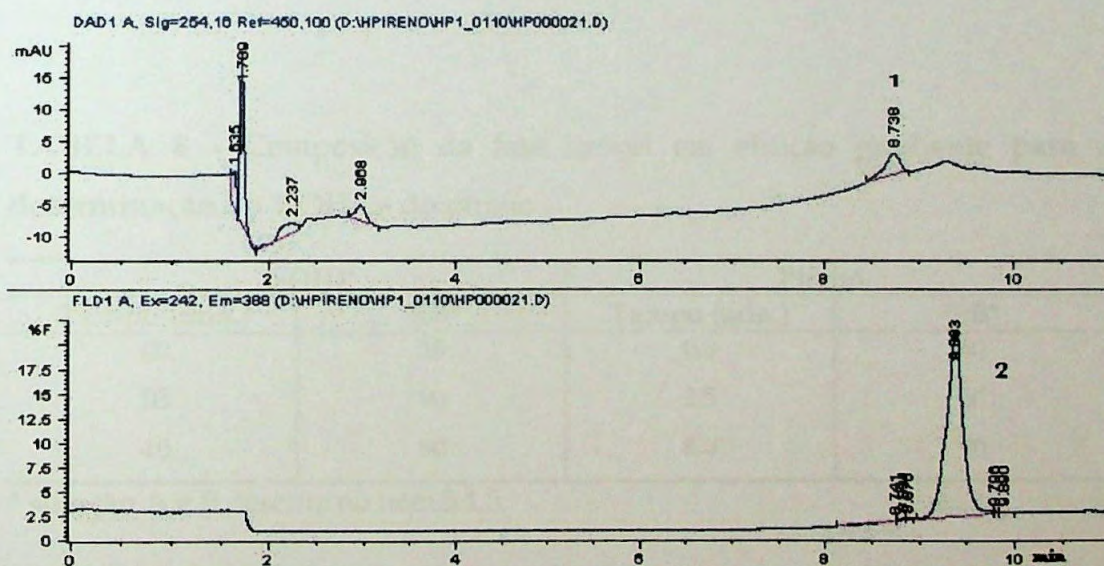
TR	PI (DAD)	A 1-OHP (FLD)	B 1-OHP (DAD)	Trr A/PI	Trr B/PI
	8,741	9,380	9,286	1,073	1,062
	8,729	9,372	9,281	1,074	1,063
	8,724	9,363	9,275	1,073	1,063
	8,855	9,464	9,377	1,069	1,059
	8,855	9,461	9,377	1,068	1,059
	8,746	9,676	9,291	1,106	1,062
	8,760	9,390	9,304	1,072	1,062
	8,742	9,377	9,298	1,073	1,064
	8,715	9,368	9,280	1,075	1,065
	8,730	9,384	9,295	1,075	1,065
Média	8,760	9,424	9,306	1,076	1,062
DP	0,052	0,096	0,038	0,011	0,002
CV %	0,591	1,019	0,411	1,019	0,193

DP = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; TR = tempo de retenção.

O naftaleno (NF), preconizado por BOUCHARD, M. & VIAU, C. (1996), foi avaliado como padrão interno para eliminar as variações e compensar as possíveis perdas advindas durante os procedimentos de extração, purificação e injeção da amostra (Figuras 20, 21 e 22), além de auxiliar a identificação do 1-OHP por meio do tempo de retenção relativo (trr) do 1-OHP/NF (Tabela 7). No entanto pode também ser observado nas Figuras 23 e 24 que não foi possível a detecção do naftaleno por fluorescência na concentração preconizada de 1,0 ug/mL. A detecção por fluorescência foi utilizada para a determinação do 1-OHP na faixa dinâmica de 0,5 a 40,0 ng/mL de urina.



**FIGURA 23** - Cromatograma representando os picos de naftaleno (1) na concentração de 1,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e 1-OHP na concentração de 120  $\text{ng}/\text{mL}$  por DAD (2) e por FLD (3)



**FIGURA 24** - Cromatograma representando o pico do naftaleno (1) na concentração de 1,0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  por DAD e o pico do 1-OHP na concentração de 80  $\text{ng}/\text{mL}$  detectado por FLD (2)

Comparando-se os resultados apresentados nas Figuras 23 e 24, observa-se que o 1-OHP não foi detectado pelo DAD na concentração de 80 ng/mL, o que comprova uma maior especificidade da metodologia quando da utilização do detector de fluorescência em decorrência de uma característica fluorescente inerente à molécula analisada. A concentração não detectada de 80 ng/mL é maior que o ponto mais alto da faixa dinâmica a ser utilizada (0,5 a 40,0 ng/mL de urina).

Em virtude de tais resultados optou-se pela não utilização de um padrão interno. O equipamento utilizado neste trabalho possui um módulo de injeção automatizado, diminuindo, assim, a variabilidade da análise durante as injeções. É importante salientar, ainda, sobre a especificidade da metodologia com detecção fluorescente para o 1-OHP.

A composição da fase móvel e o esquema de gradiente foram definidos para ambos os analitos como descrito na Tabela 8.

**TABELA 8** - Composição da fase móvel em eluição gradiente para a determinação do 1-OHP e do pireno

1-OHP		Pireno	
Tempo (min.)	%B*	Tempo (min.)	%B*
00	10	0,0	60
05	90	2,5	60
10	90	8,0	90

\* solução A e B descrita no item 5.1.5.

A detecção por fluorescência do 1-OHP e do pireno demonstrou ser específica e sensível (Figuras 25 e 26).



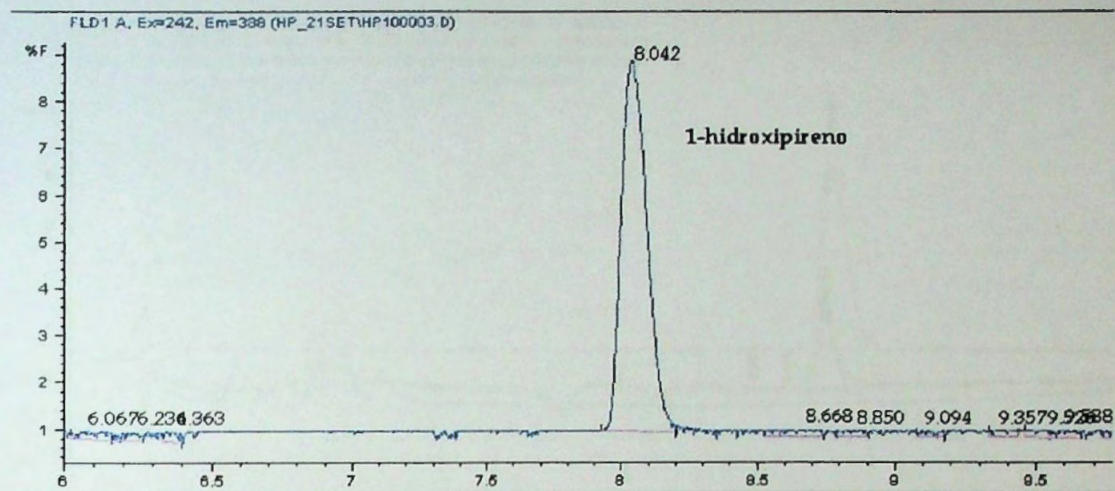
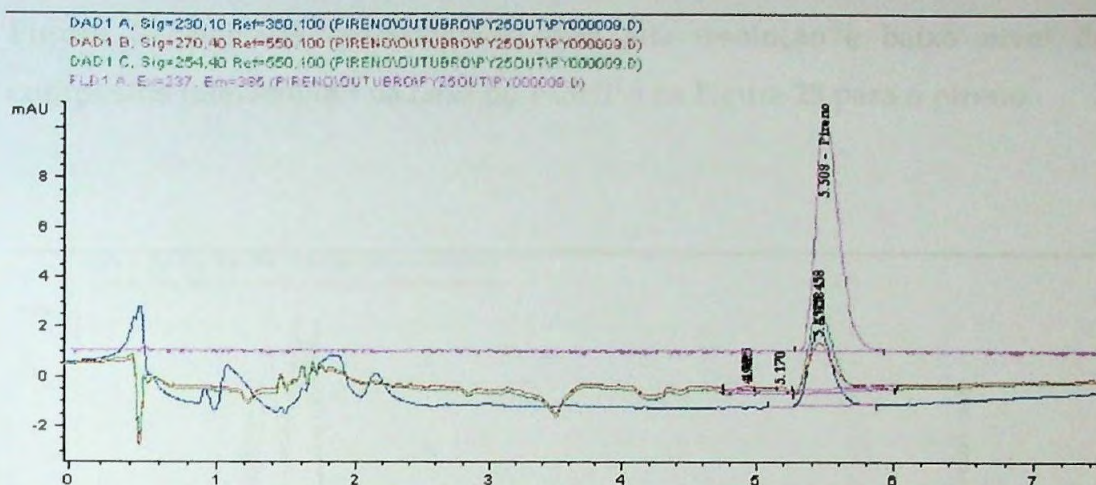


FIGURA 25 - Cromatograma representando o pico 1-OHP com tempo de retenção (tr) em 8,042 min., fluxo: 0,8 mL/min, detector de fluorescência e concentração de 2,5 ng/mL. Eixo y = %F e eixo x = minutos



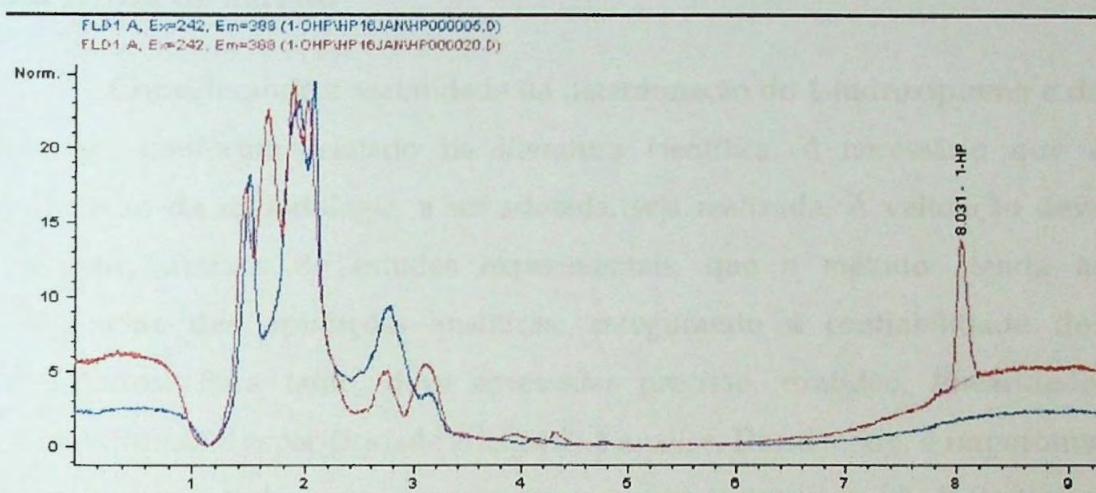
**FIGURA 26** – Cromatograma representando o pico do pireno, em solução de acetonitrila na concentração de 0,1075  $\mu\text{g/mL}$ , detectado por DAD A 230nm (azul), DAD B 270nm (vermelho), DAD C 254nm (verde) e FLD (rosa). Eixo y = %F e eixo x = minutos

## 6.2. Preparação das amostras

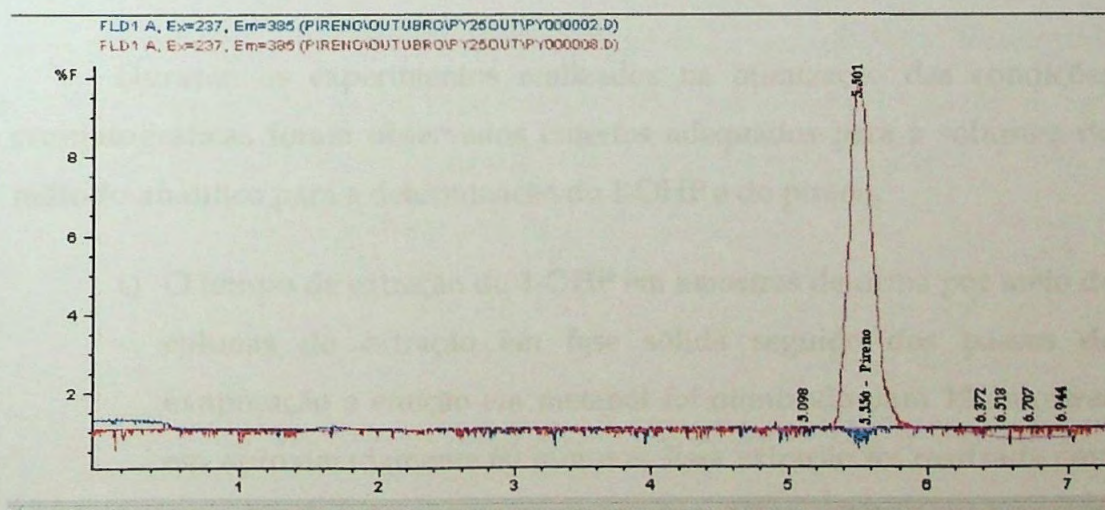
As análises por HPLC para a separação e a identificação dos produtos de biotransformação dos HAPs são essencialmente baseadas na separação por fase reversa, aplicada em diversos estudos destes compostos (JONGENELEN, F.J., *et al.*, 1986, 1987; BUCHET, J.P., *et al.*, 1992; ELOVAARA, E., *et al.*, 1995; HATJIAN, B.A., *et al.*, 1995; OVREBO, S., *et al.*, 1995; BOUCHARD, M., *et al.*, 1996; MOEN, B.E., *et al.*, 1996; NIELSEN, P.S., *et al.*, 1996; ROGGI, C., *et al.*, 1997; LAFONTAINE, M., *et al.*, 2000). A metodologia utilizada foi sugerida por JONGENELEN, F.J., *et al.*, (1986), com uma modificação no volume final, para a redissolução do resíduo, para 1,0 mL e não de 2,0 mL inicialmente proposto.

A análise por fase reversa foi satisfatória, para a determinação do 1-OHP e do pireno nas amostras propostas, como pode ser observado na

Figura 27 por um cromatograma com alta resolução e baixo nível de compostos interferentes na faixa do 1-OHP e na Figura 28 para o pireno.



**FIGURA 27** - Cromatograma representando o pico do 1-hidroxi-pireno em amostra adicionada na concentração de 2,0 ng/mL (vermelho) em contraste a uma amostra de urina sem adição do analito (azul), com tempo de retenção aproximado de 8 minutos. Eixo y = %F e eixo x = minutos



**FIGURA 28** - Cromatograma representando o pico do pireno em solução de acetonitrila na concentração de 0,1075 µg/mL (vermelho) e solução de acetonitrila sem adição de padrão (azul). Eixo y = %F e eixo x = minutos

### **6.3. Validação de parâmetros analíticos para a determinação do 1-hidroxi pireno em amostras de urina e do pireno nos filtros e tubos adsorventes expostos ao ar respirável pelos trabalhadores na usina de asfalto**

Considerando a viabilidade da determinação do 1-hidroxi pireno e do pireno, conforme relatado na literatura científica, é necessário que a validação da metodologia, a ser adotada, seja realizada. A validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, deve apresentar precisão, exatidão, linearidade, sensibilidade e especificidade adequada à análise. Desse modo, é importante ressaltar que todos os equipamentos e materiais (pipetas e balão) devem apresentar-se devidamente calibrados e os analistas devem ser qualificados e adequadamente treinados (HANKS, A.R., 1995).

#### **6.3.1. Robustez**

Durante os experimentos realizados na otimização das condições cromatográficas foram observados critérios adequados para a robustez do método analítico para a determinação do 1-OHP e do pireno.

- 1) O tempo de extração do 1-OHP em amostras de urina por meio de colunas de extração em fase sólida seguido dos passos de evaporação e eluição em metanol foi otimizado para 12 amostras em aproximadamente 60 minutos. Essa extração foi realizada com aparelho Supelco para extração a vácuo (Figura 29).



FIGURA 29 - Aparelho para extração do 1-OHP em amostras de urina

- 2) Influência da variação da composição da fase móvel: foram realizados testes com eluição isocrática (metanol 100% para 1-OHP e acetonitrila 100% para o pireno) e com diferentes gradientes de fase móvel. As Figuras 30 e 31 ilustram a resposta obtida para o 1-OHP e a Figura 32, para o pireno.

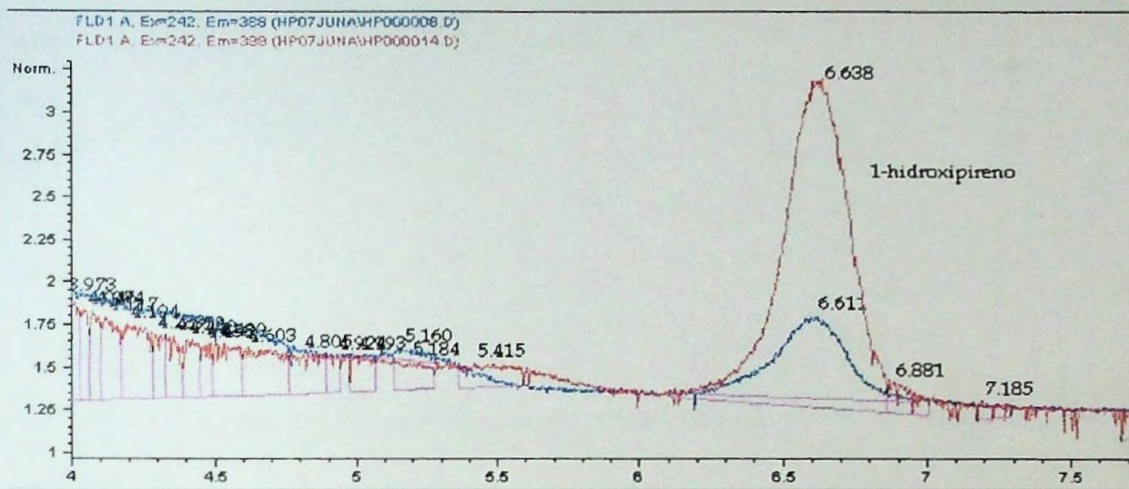


FIGURA 30 - Picos de 1-OHP nas concentrações de 0,5 (azul) e 1,0 ng/mL (vermelho) com eluição gradiente - Bomba A (metanol 40%) e Bomba B (metanol 100%), como descrito na Tabela 8, porém com a mistura a 3 minutos e tempo final de corrida em 8 minutos

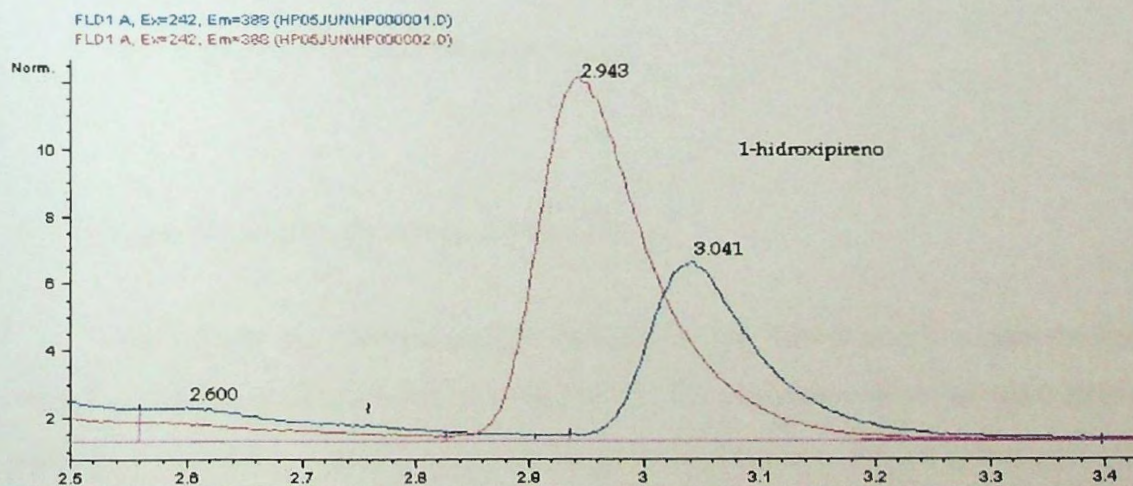


FIGURA 31 - Picos de 1-OHP nas concentrações de 2 (azul) e 5 ng/mL (vermelho) com eluição isocrática de metanol 100%

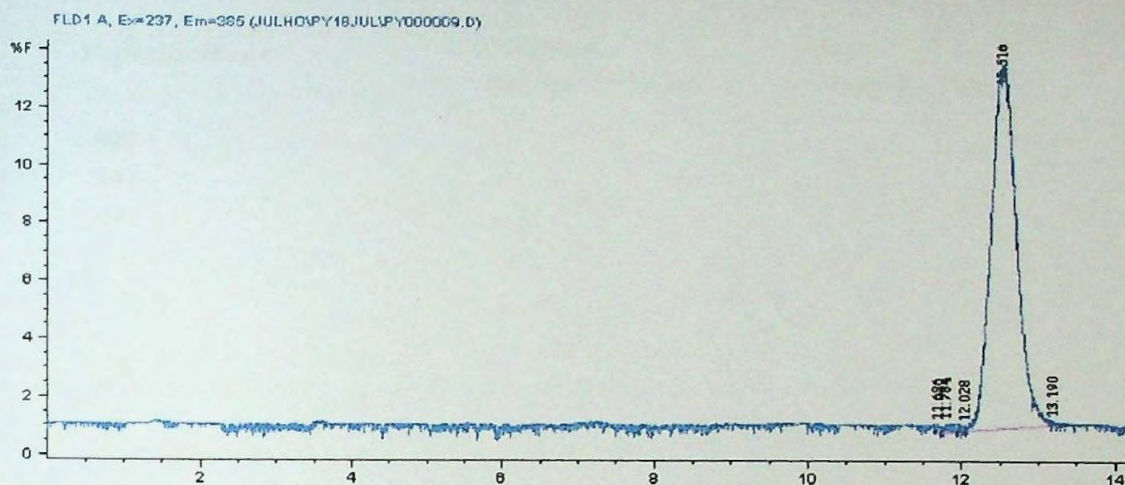


FIGURA 32 - Pico do pireno na concentração de 0,215  $\mu\text{g}/\text{mL}$  com eluição isocrática de acetonitrila 70%

- 3) Diferentes colunas (diferentes lotes e/ou fabricantes): foi utilizada apenas uma coluna.
- 4) A temperatura não foi alterada.

### 6.3.2. Especificidade ou efeito da matriz

As curvas de calibração em metanol e em amostras de urina podem ser observadas graficamente na Figura 33. As equações de regressão linear são:  $y = 1,4358x - 0,7677$  (metanol), com coeficiente de determinação de 0,9986 e  $y = 15,677x - 11,26$  (urina), com coeficiente de determinação de 0,9897.

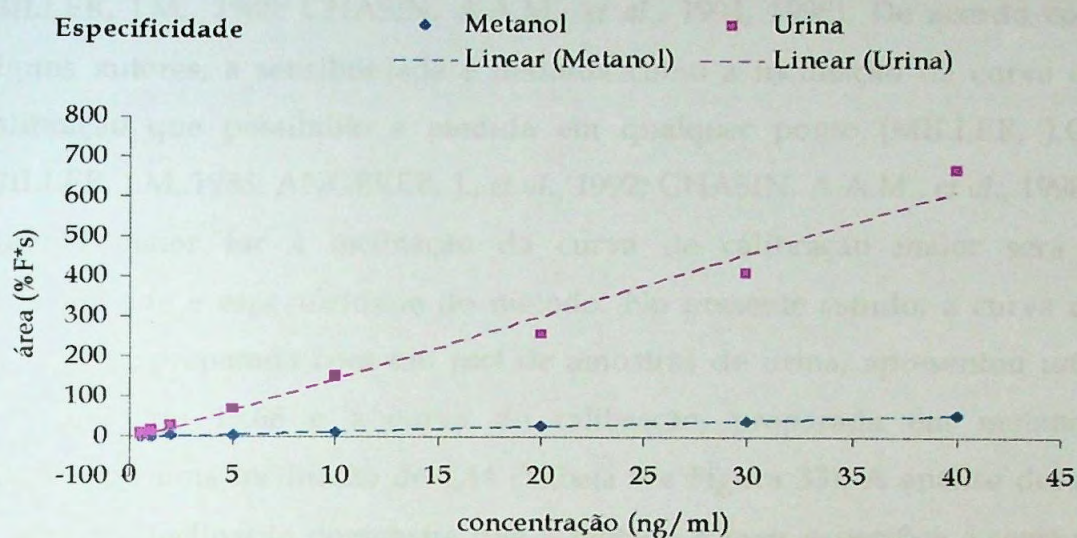


FIGURA 33 - Representação gráfica do estudo de especificidade mostrando as curvas de calibração em metanol (azul  $\blacklozenge$ ) e em urina (rosa  $\blacksquare$ )

Os resultados para coeficiente angular/inclinação da reta (a) e intercepto (b), da equação da reta  $y = ax + b$ , estão representados na Tabela 9.

TABELA 9 - Valores do coeficiente angular/inclinação da reta (a) e do ponto de intersecção no eixo x, denominado intercepto (b), para as curvas de calibração construídas em metanol e urina

	Metanol	Urina
Inclinação (a)	1,435767	15,67707
Intercepto (b)	-0,76771	-2,82571

Pode-se definir sensibilidade ou especificidade como sendo a capacidade de um método de distinguir, com determinado nível de confiança, duas concentrações próximas (TAYLOR, J.K., 1987; MILLER, J.C.;



MILLER, J.M., 1988; CHASIN, A.A.M., *et al.*, 1994, 1998). De acordo com alguns autores, a sensibilidade é definida como a inclinação da curva de calibração que possibilite a medida em qualquer ponto (MILLER, J.C.; MILLER, J.M., 1988; ANGERER, J., *et al.*, 1992; CHASIN, A.A.M., *et al.*, 1998). Quanto maior for a inclinação da curva de calibração maior será a sensibilidade e especificidade do método. No presente estudo, a curva de calibração, preparada com um *pool* de amostras de urina, apresentou uma inclinação de 15,68 e a curva de calibração, preparada em metanol, apresentou uma inclinação de 1,44 (Tabela 9 e Figura 33). A análise destes valores de inclinação demonstra que o método é mais específico e sensível quando a quantificação do analito é realizada com uma curva de calibração preparada com amostras de urina.

### **6.3.3. Limite de detecção e quantificação**

Os valores dos limites de detecção e quantificação, para o 1-OHP, demonstrados nas Tabelas 10 e 11 foram obtidos por meio de equação descrita nos itens 5.3.3.3. e 5.3.3.4. O valor da inclinação ( $ic$ ) foi obtido da equação de regressão linear de diversas curvas de calibração.

**TABELA 10** - Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do 1-OHP obtido pelo cálculo do desvio-padrão (DP1) do intercepto com o eixo do y (b) de várias curvas de calibração construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação

Instrumental					Método				
Média	DP	ic	LD	LQ	Média	DP	Ic	LD	LQ
0,47	0,23	1,3808	0,56	1,65	2,13	2,27	18,655	0,40	1,22

DP = desvio-padrão; ic = inclinação da reta

**TABELA 11** - Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) do 1-OHP obtido pelo cálculo do desvio-padrão (DP2) de um apropriado número de amostras do branco de urina (método) e metanol (instrumental). Análise realizada com a média das áreas de 10 replicatas

Instrumental					Método				
Média	DP	CV%	LD	LQ	Média	DP	CV%	LD	LQ
0,028	0,013	1,97	0,029	0,088	1,07	0,157	1,27	0,033	0,100

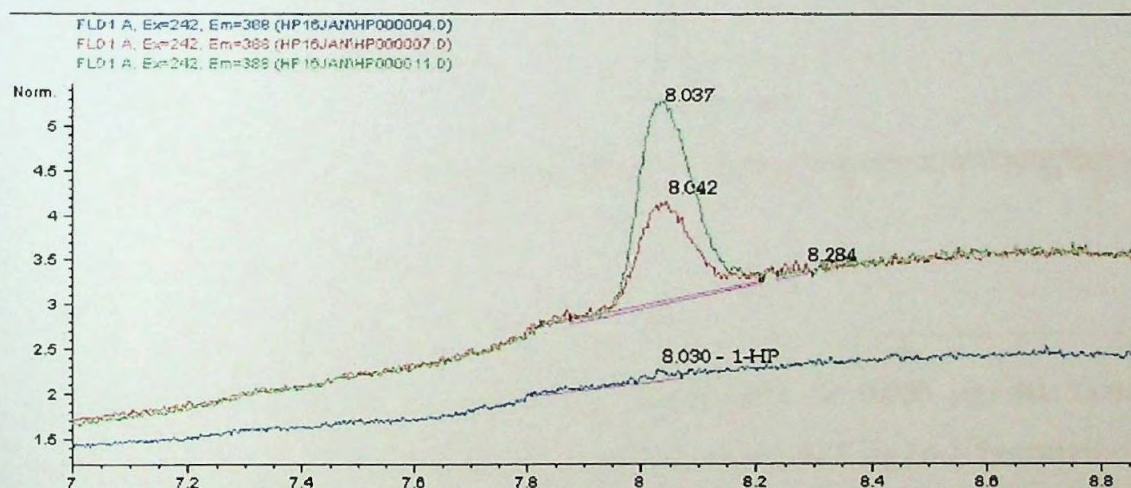
DP = desvio-padrão; CV = coeficiente de variação

Obedecendo à definição do LD como sendo duas a três vezes o ruído do branco, com coeficiente de variação inferior a 20%, e do LQ como sendo cinco vezes o ruído do branco, com precisão de 20% e exatidão de 80 a 120%, os valores de LD e LQ para o 1-OHP estão descritos na Tabela 12 e apresentados na Figura 34 e os valores para o pireno na Tabela 13 e Figura 35.

**TABELA 12** – Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), obtidos obedecendo aos critérios de precisão e exatidão descritos, e utilizados no método para a determinação de 1-OHP em amostras de urina

Conc. (ng/mL)	Média	DP	CV%	Exatidão (%)
0,1	0,317	0,004	1,36	316,5
0,2	0,410	0,005	1,23	204,8
0,5 LD	0,693	0,021	3,09	138,7
1,0 LQ	1,093	0,003	0,29	109,3

DP = desvio-padrão; CV = coeficiente de variação; Conc. = concentração

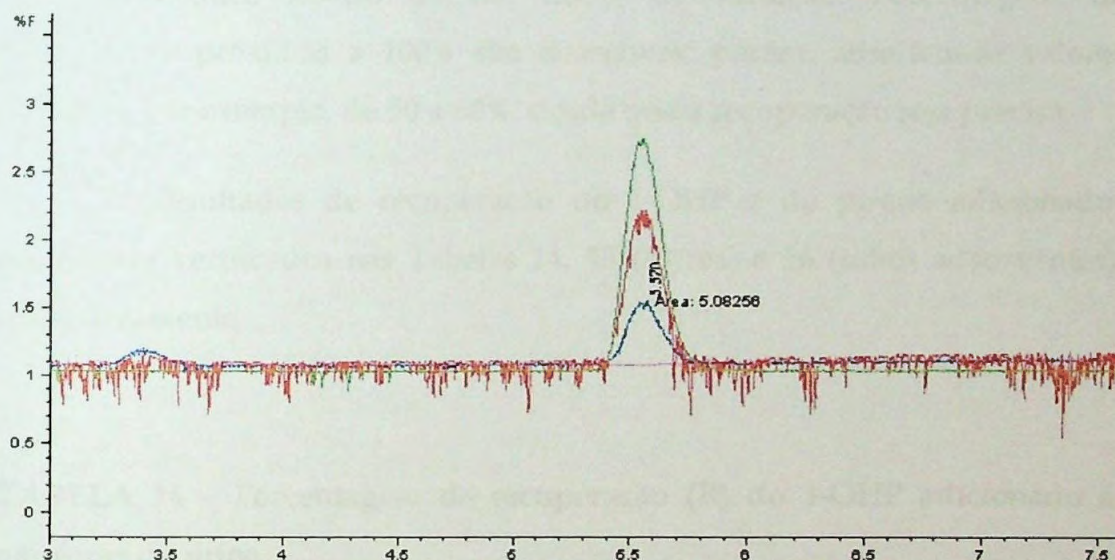


**FIGURA 34** – Amostra de urina sem adição de padrão (azul), amostra de urina adicionada de 0,5 ng/mL (vermelho), representando o limite de detecção com valor de ruído > que 2 a 3x o ruído do branco, e amostra de urina adicionada de 1,0ng/mL (verde), representando o limite de quantificação

**TABELA 13** - Limite de quantificação (LQ), obtido obedecendo ao critério de precisão e exatidão descrito, e LD utilizado no método para a determinação do pireno em amostras de ar

Conc. Teórica	Média das áreas	DP	CV%	Conc. Obtida	Exatidão (%)
LD 0,005 µg/mL	05,10	0,24	4,78	0,0045	89,80
LQ 0,020 µg/mL	19,52	0,41	2,08	0,0197	98,72

DP = desvio-padrão; CV = coeficiente de variação; área em %F.



**FIGURA 35** - Solução de acetonitrila adicionada de 0,005 µg/mL (azul), representando o limite de detecção, adicionada de 0,01 µg/mL (vermelho) e solução adicionada de 0,02µg/mL (verde), representando o limite de quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram adequados para a finalidade proposta. Obedecendo ao critério preconizado pela ANVISA, os resultados adotados neste trabalho foram de 0,5 ng/mL e 0,005 µg/mL, para detecção, e 1,0 ng/mL e 0,02 µg/mL, para uma quantificação precisa e exata, do 1-OHP e pireno, respectivamente. O pireno pode ser quantificado até a

concentração de 0,005  $\mu\text{g/mL}$ , já que a recuperação de 89,8% encontra-se dentro da faixa de aceitação (80 a 120%) (BRASIL, 1999; CHASIN, A.A.M., *et al.*, 1994 e 1998).

#### 6.3.4. Recuperação

A recuperação mede a eficiência do procedimento de extração de um método analítico dentro de um limite de variação. Porcentagens de recuperação próximas a 100% são desejáveis, porém, admitem-se valores menores, por exemplo, de 50 a 60%, desde que a recuperação seja precisa.

Os resultados de recuperação do 1-OHP e do pireno adicionados podem ser verificados nas Tabelas 14, 15 (filtros) e 16 (tubos adsorventes), respectivamente.

TABELA 14 - Porcentagem de recuperação (R) do 1-OHP adicionado às amostras de urina

Concentração	Adição antes da extração		Adição após extração		R (%)
	Média $\pm$ DP (ng/mL)	CV%	Média $\pm$ DP (ng/mL)	CV%	
LQ	0,88 $\pm$ 0,027	3,07	1,02 $\pm$ 0,063	6,20	86,27
CB	2,00 $\pm$ 0,063	3,16	1,88 $\pm$ 0,027	1,45	106,38
CM	23,37 $\pm$ 0,135	0,58	20,41 $\pm$ 0,962	4,72	114,50
CA	34,33 $\pm$ 0,150	0,44	29,79 $\pm$ 2,406	8,09	115,43

DP = desvio-padrão; CV = coeficiente de variação; concentração em ng/mL.

TABELA 15 - Porcentagem de recuperação (R) do pireno adicionado nos filtros em concentrações conhecidas

Concentração	Adição antes da extração		Adição após extração		R (%)
	Média ± DP*	CV%	Média ± DP*	CV%	
CB	77,42 ± 1,55	2,00	78,6 ± 0,99	1,25	98,44
CM	325,20 ± 1,24	0,38	362,99 ± 2,07	0,57	89,51
CA	617,78 ± 2,14	0,35	628,56 ± 3,39	0,54	98,28

Concentração expressa em µg/mL, R = recuperação e \* área (%F).

TABELA 16 - Eficiência de desorção (ED) dos tubos adsorventes adicionados com concentração conhecida de pireno, resultado expresso em porcentagem (%)

Conc. *	Adição antes da extração		Adição após extração		ED (%)
	Média ± DP área (%F)	CV%	Média ± DP área (%F)	CV%	
CB	79,92 ± 2,18	2,73	80,43 ± 0,84	1,04	99,34
CM	319,48 ± 5,46	1,71	365,53 ± 4,52	1,24	87,30
CA	638,8 ± 16,03	2,51	630,26 ± 2,51	0,40	101,36

\* Concentração expressa em µg/mL.

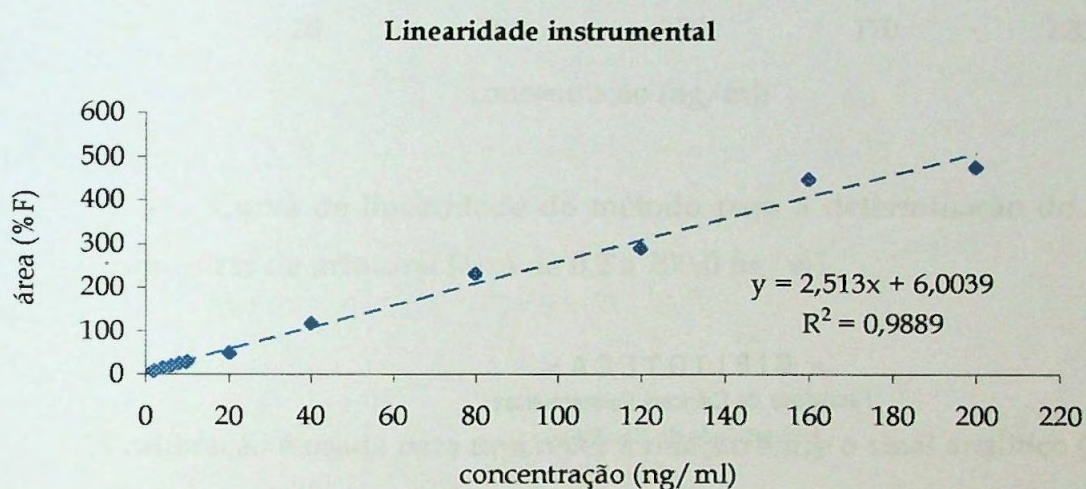
O coeficiente de determinação entre R *versus* quantidade encontrada foi de 0,9991 e entre ED *versus* quantidade encontrada foi de 0,9962. O estudo de recuperação demonstrou ser adequado, com resultados dentro da faixa de aceitação de 80 a 120% (BRASIL, 1999; CHASIN, A.A.M., *et al.*, 1994 e 1998).

### 6.3.5. Linearidade e curva de calibração

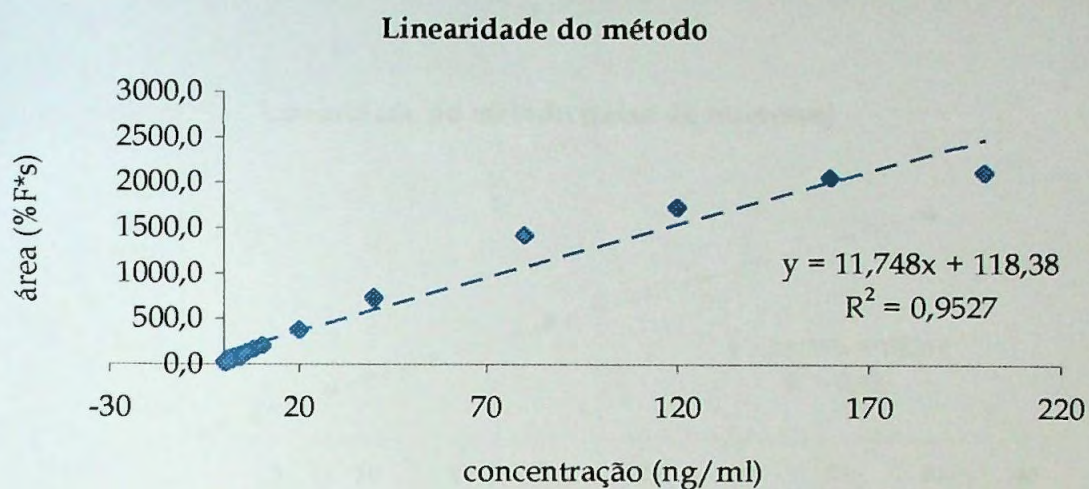
A equação de regressão linear obtida na determinação da linearidade instrumental, nas concentrações de 2 a 200 ng de 1-OHP/mL, foi  $y = 2,513x$

+ 6,0039, com um  $r^2$  de 0,9889, como pode ser observada graficamente na Figura 36.

O estudo de linearidade do método para 1-OHP foi realizado abrangendo a faixa de 0,2 a 200 ng/mL (Figura 37).



**FIGURA 36** - Estudo de linearidade instrumental realizado na faixa de 2 a 200 ng 1-OHP/mL de metanol com detecção de fluorescência



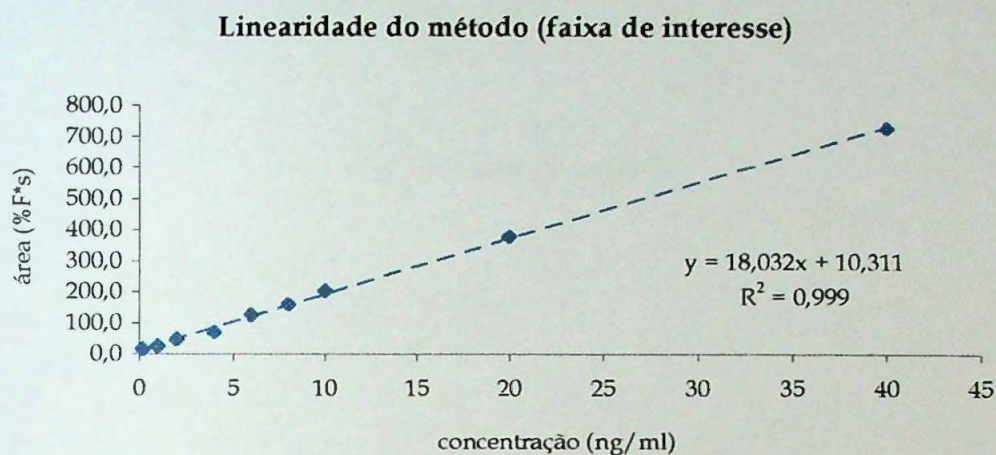
**FIGURA 37** - Curva de linearidade do método para a determinação do 1-OHP em amostras de urina, na faixa de 0,2 a 200,0 ng/mL

A calibração é usada para descrever a relação entre o sinal analítico (y) e a concentração (x), seu intervalo deriva do estudo de linearidade do método e depende do objetivo de sua aplicação (BRASIL, 1999; APOSTOLI, P., 1995; CHASIN, A.A.M., *et al.*, 1994, 1998; HANKS, A. R., 1995; JENKE, D. R., 1996).

Foi proposto por JONGENELEN F.J., (2001) um guia de valores para o 1-OHP em amostras de urina que varia de 0,72 a 14,7ng de 1-OHP/mL urina. A curva no estudo do 1-OHP foi baseada nestes valores.

Ficou demonstrado que houve uma relação linear entre o sinal gerado pelo equipamento e a concentração do 1-OHP na faixa de concentração de 0,2 a 40,0 ng de 1-OHP/mL de urina, faixa dinâmica de interesse neste estudo (Figura 38). Cada ponto corresponde à média dos valores encontrados na análise das seis replicatas. A cada lote de amostras é preparada nova curva de calibração e a quantificação é realizada com nova equação de regressão linear.





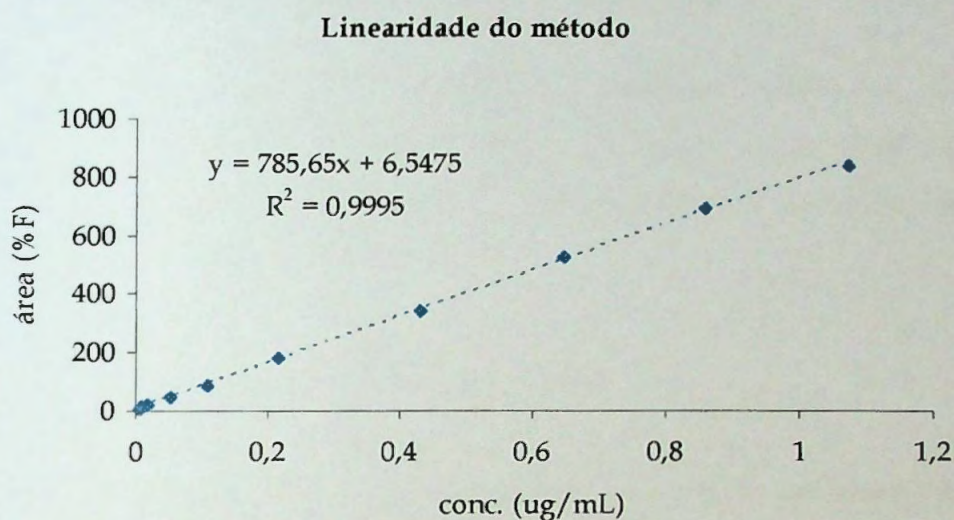
**FIGURA 38** - Curva de linearidade do método para a determinação do 1-OHP em amostras de urina, na faixa de 0,2 a 40,0ng/mL.

**TABELA 17** - Dados obtidos na análise do 1-OHP, em estudo para construção de curva de calibração, através da técnica de HPLC acoplada a um detector de fluorescência

<b>1-hidroxi pireno (1-OHP)</b>			
Concentração	Área (%F)	Desvio-padrão	C.V. %
0,2	2,96	0,1428	4,83
0,5	7,63	0,3620	4,79
1,0	14,38	0,0535	0,37
2,0	30,46	0,6895	2,26
5,0	69,75	0,4989	0,72
10,0	154,02	0,5677	0,37
20,0	333,06	1,5707	0,47
30,0	412,70	1,0440	0,25
40,0	672,03	0,7755	0,12

Concentração expressa em ng/mL e CV = coeficiente de variação.

O estudo de linearidade do método para o pireno foi realizado abrangendo a faixa de 0,005 a 1,075  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Figura 39).



**FIGURA 39** - Curva de linearidade do método para a determinação do pireno em solução de acetonitrila, na faixa de 0,005 a 1,075  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Ficou demonstrado que houve uma relação linear entre o sinal gerado pelo equipamento e a concentração de pireno na faixa de concentração de 0,005 a 0,860  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , faixa dinâmica de interesse neste estudo, representada pela equação  $y = 797,61x + 2,8242$  com  $r^2$  de 1.

Os dados obtidos pelo estudo de linearidade instrumental (4 a 200 ng 1-OHP/ $\text{mL}$  metanol) demonstraram uma resposta linear entre a concentração do analito e a sua área por % de fluorescência, com um coeficiente de determinação de 0,9889 considerado satisfatório, conforme preconizado por CHASIN, A.A.M., *et al.*, (1994 e 1998) (Figura 36). No estudo da linearidade do método não foi possível obter uma relação linear entre a

concentração do 1-OHP na faixa de 0,2 a 200 ng de 1-OHP/mL de urina, e a sua área, pois o coeficiente de determinação ( $r^2$ ) de 0,9527 foi insatisfatório (Figura 37) (CHASIN, A.A.M., *et al.*, 1994). No entanto, na Figura 38 pôde ser observado um  $r^2$  de 0,999, o qual foi adequado para a validação do método na concentração de 0,2 a 40,0ng de 1-OHP/mL de urina.

Tanto no estudo de linearidade do método quanto na curva de calibração utilizada para a quantificação do pireno foi possível obter coeficientes de determinação ( $r^2$ ) adequados de 0,9995 e 1, respectivamente.

#### 6.3.6. Estudo de precisão inter e intra ensaios

A precisão do método é o parâmetro que avalia a proximidade entre várias medidas efetuadas em uma mesma amostra. A medida de precisão pode ser expressa através do cálculo do desvio-padrão e do coeficiente de variação, obtidos em condições determinadas de repetibilidade e/ ou reprodutibilidade (JENKE, D.R., 1996; CHASIN, A.A.M., *et al.*, 1998; BRASIL, 1999; WATERS, 2002) e por meio de análise de variância ANOVA: fator único (TSANACLIS, L.M, 2000).

A precisão inter e intra ensaio obtidas por meio de análise estatística ANOVA, com lote de seis amostras de urina adicionadas de 1, 2, 20 e 30 ng de 1-OHP/mL preparadas em cinco dias diferentes, estão reportadas na Tabela 18. Os resultados de precisão baseados no cálculo  $CV = (DP/Média) \times 100$  estão reportados na Tabela 19.

**TABELA 18** – Coeficiente de variação inter e intra ensaio das concentrações urinárias de 1-hidroxipireno. Análise em seis replicatas e durante cinco dias.

Cálculo ANOVA

Concentração (ng/mL)	Média das áreas (%F*s)	INTER ENSAIO CV (%)	INTRA ENSAIO CV (%)
1,0	14,26	1,29	4,59
2,0	28,38	7,30	4,50
20,0	279,87	12,38	10,90
30,0	385,30	9,96	2,18

CV = coeficiente de variação.

**TABELA 19** – Coeficiente de variação inter e intra ensaio das concentrações urinárias de 1-hidroxipireno. Análise em seis replicatas e durante cinco dias.

Cálculo baseado em CHASIN *et al.*, 1999

Concentração (ng/mL)	Média das áreas ± DP (%F*s)	INTER ENSAIO CV (%)	Média das áreas ± DP (%F*s)	INTRA ENSAIO CV (%)
1,0	14,26 ± 0,68	4,74	14,34 ± 0,25	1,73
2,0	28,38 ± 2,30	8,11	29,89 ± 0,93	3,11
20,0	279,87 ± 43,85	15,67	299,91 ± 16,32	5,44
30,0	385,30 ± 35,91	9,32	398,91 ± 1,30	0,33

CV = coeficiente de variação e DP = desvio padrão.

Os resultados de precisão para o pireno estão descritos na Tabela 20 (ANOVA) e Tabela 21 (baseados no cálculo  $CV = (DP/Média) \times 100$ ).

TABELA 20 – Coeficiente de variação inter e intra ensaio das concentrações do pireno. Análise em seis replicatas e durante cinco dias. Cálculo ANOVA.

Concentração (µg/mL)	Média das áreas (%F*s)	INTER ENSAIO CV (%)	INTRA ENSAIO CV (%)
CB	77,49	13,55	2,90
CM	314,04	15,95	2,71
CA	684,51	4,22	2,69

Onde: CV = coeficiente de variação.

TABELA 21 – Coeficiente de variação inter e intra ensaio das concentrações do pireno. Análise em seis replicatas e durante três dias. Cálculo baseado em CHASIN *et al.*, 1999

Concentração (µg/mL)	Média das áreas ± DP (%F*s)	INTER ENSAIO CV (%)	Média das áreas ± DP (%F*s)	INTRA ENSAIO CV (%)
CB	72,19 ± 4,49	6,21	75,83 ± 1,85	2,44
CM	363,85 ± 30,33	8,33	384,72 ± 10,95	2,85
CA	662,87 ± 56,67	8,55	605,76 ± 9,87	1,63

Onde: CV = coeficiente de variação.

Neste trabalho o estudo de precisão foi realizado em seis replicatas, o que significa 95% de probabilidade na tabela t de Student (CHASIN, A.A.M., *et al.*, 1998). De acordo com o preconizado e adotado neste trabalho, os resultados obtidos foram considerados satisfatórios e adequados (CV < 15%), observados nas Tabelas 18 a 21.

O cálculo do coeficiente de variação aplicando-se a análise de variância (ANOVA) permite o isolamento de componentes de variação a fim de identificar possíveis fontes de erros, quando estes são independentes. Com este modelo é possível observar e calcular a variabilidade da análise com diferentes equipamentos ou analistas, quando desejado ou necessário.

### 6.3.7. Exatidão

O estudo de exatidão foi realizado com amostras de urina adicionadas de padrão de 1-OHP, nas concentrações de 2,0; 20,0 e 30,0ng/mL. Os resultados estão reportados na Tabela 22. Os resultados para o pireno nas CB, CM e CA estão reportados na Tabela 24.

**TABELA 22** – Estudo de exatidão com amostras de urina adicionadas de padrão de 1-OHP

Concentração teórica (ng/mL)	Concentração média obtida (ng/mL)	CV%	Inexatidão %
2,0	2,04	1,81	± 2,24
20,0	20,27	7,66	± 1,33
30,0	27,37	1,27	± 8,78

DP = desvio-padrão; CV = coeficiente de variação.

**TABELA 23** – Estudo de exatidão com amostras adicionadas de padrão de pireno

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração média obtida (µg/mL)	CV%	Inexatidão %
0,1075	0,097	1,04	± 9,91
0,430	0,452	1,24	± 5,19
0,860	0,784	0,40	± 9,02

DP = desvio-padrão; CV = coeficiente de variação.

Os resultados obtidos e reportados nas Tabelas 22 e 23 estão de acordo com o preconizado, com uma porcentagem (%) de inexatidão menor que os 15% sugeridos (CHASIN, A.A.M., *et al.*, 1998).

### 6.3.8. Estabilidade

As concentrações obtidas referem-se à média das determinações do 1-OHP realizada em seis replicatas. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 24, 25 e 26.

**TABELA 24** – Estudo de estabilidade com amostras, adicionadas de padrão de 1-OHP nas concentrações de 2, 20 e 30ng/mL, analisadas no tempo zero e após cinco dias mantidas a temperatura ambiente (~22°C)

Concentração (ng/mL)	Média das áreas Tempo zero	Média das áreas Após cinco dias	% de Inexatidão
2,0	23,80	26,11	+9,71
20,0	268	222,50	-16,98
30,0	459	347,10	-24,38

**TABELA 25** – Estudo de estabilidade com amostras, adicionadas de padrão de 1-OHP nas concentrações de 2, 20 e 30ng/mL, analisadas no tempo zero e após 60 dias armazenadas em geladeira (-4°C)

Concentração (ng/mL)	Média das áreas Tempo zero	Média das áreas Após 60 dias	% de inexatidão
2,0	28,09	26,36	-6,16
20,0	266,93	217,58	-18,49
30,0	399,61	377,10	-5,63

**TABELA 26** - Estudo de estabilidade com amostras, adicionadas de padrão de 1-OHP nas concentrações de 2, 20 e 30ng/ mL, analisadas no tempo zero e após 30, 120 e 360 dias armazenadas em freezer (-20°C). Os resultados estão descritos como % de inexatidão

Concentração (ng/mL)	Área* Tempo zero	Inexatidão em 30 dias	Inexatidão em 120 dias	Inexatidão em 360 dias
2,0	27,94	-0,86	-3,37	-10,0
20,0	266,03	-1,73	-2,60	+10,77
30,0	352,73	-2,45	-0,09	+5,14

\* media de seis replicatas.

O estudo foi realizado para o 1-hidroxipireno que utiliza como matriz biológica amostras de urina. O método avaliado demonstrou estabilidade em freezer por até 360 dias, quando foi alcançado o limite da porcentagem de inexatidão proposto (10%). Esse resultado confirma os estudos de JONGENELEN, F.J., *et al.*, (1987), que afirmam que as amostras de urina podem ser armazenadas a -20°C até um ano sem que ocorram perdas de 1-OHP.

Os resultados obtidos à temperatura ambiente e em geladeira são satisfatórios para a concentração de 2,0 ng/mL, mas não são adequados para as concentrações de 20,0 e 30,0 ng/mL. Isto demonstra que se por ventura não for possível à análise das amostras após a coleta, estas podem e devem ser armazenadas em freezer a uma temperatura de -20°C e não em geladeira ou à temperatura ambiente.

A validação e a análise das amostras de ar para a determinação do pireno foi realizada com solução de acetonitrila e a cada análise foi preparada nova curva de calibração. As amostras de ar foram analisadas sempre após a coleta, em decorrência da possível perda já durante o processo de amostragem, transporte e também após armazenamento, conforme



relatado em diversos estudos (BENTSEN, R.K., *et al.*, 1998; BONNET, P., *et al.*, 2000; LAFONTAINE, M., *et al.*, 2000; HEIKKILA, P., *et al.*, 2002). Com base nestas informações não foi realizado o estudo de estabilidade para o pireno.

#### **6.4. Determinação da gravidade específica e da creatinina urinária**

Os parâmetros de gravidade específica e da creatinina urinária, para a conversão dos resultados do 1-OHP urinário, foram avaliados anterior ao congelamento das amostras de urina e estão relacionados na Tabela 27.

Conforme descrito, os resultados das amostras de urina estão de acordo com os limites aceitáveis para a creatinina urinária ( $> 0,3\text{g/L}$  e  $< 3,0\text{g/L}$ ) e para a gravidade específica ( $> 1,010$  e  $< 1,030$ ) (ACGIH, 2003).

**TABELA 27 - Valores de gravidade específica e da creatinina urinária das amostras de urina coletada dos trabalhadores da usina de asfalto**

Trabalhador	Gravidade específica	Creatinina (g/L)	Trabalhador	Gravidade específica	Creatinina (g/L)
0001	-	0,84	0024	1,020	1,05
0002	1,024	1,50	0025	1,026	1,75
0003	1,030	1,27	0026	1,010	0,75
0004	1,038	1,25	0027	1,022	1,40
0005	1,020	1,91	0028	-	1,01
0006	1,024	1,60	0029	1,012	0,66
0007	1,024	0,69	0030	1,018	1,30
0008	1,008	1,21	0031	1,020	1,50
0009	1,022	0,80	0032	1,024	1,00
0010	1,016	1,30	0033	1,024	1,00
0011	1,008	1,00	0034	1,026	1,00
0012	1,010	1,05	0035	1,018	1,32
0013	1,010	0,85	0036	-	2,08
0014	1,018	1,18	0037	1,016	1,56
0015	1,020	1,45	0038	1,022	0,40
0016	1,018	1,05	0039	1,014	1,84
0017	1,022	1,12	0040	1,024	1,07
0018	1,028	1,21	0041	1,024	1,45
0019	1,028	2,30	0042	1,022	1,79
0020	1,024	1,65	0043	1,018	0,52
0021	1,028	0,95	0044	1,014	1,15
0022	1,014	0,89	0045	1,022	1,11
0023	1,020	1,25	0046	1,022	1,73
0024	1,020	1,05	0047	1,014	1,25

Observação: De acordo com ACGIH (2001) os limites aceitáveis em amostras de urina são: concentração de creatinina (> 0,3 g/L e < 3,0 g/L) ou gravidade específica (> 1,010 e < 1,030).

TABELA 27 – Valores de gravidade específica e da creatinina urinária dos trabalhadores da usina de asfalto (continuação)

Trabalhador	Gravidade específica	Creatinina (g/L)	Trabalhador	Gravidade específica	Creatinina (g/L)
0050	-	1,15	0074	1,020	2,81
0051	1,024	1,30	0075	1,026	1,58
0052	1,030	1,43	0076	1,010	1,84
0053	1,038	2,07	0077	1,022	1,33
0054	1,020	0,52	0078	-	1,03
0055	1,024	2,17	0079	1,012	0,65
0056	1,024	2,78	0080	1,018	1,22
0057	1,008	0,86	0081	1,020	1,72
0058	1,022	2,69	0082	1,024	1,61
0059	-	1,20	0083	1,030	0,96
0060	1,012	1,34	0084	1,028	1,11
0061	1,020	1,42	0085	1,015	2,08
0062	1,016	0,78	0086	-	0,53
0063	1,020	1,61	0087	1,006	0,13
0064	1,020	1,94	0088	1,006	1,77
0065	1,018	3,17	0089	1,002	2,60
0066	1,022	1,78	0090	1,030	1,37
0067	1,028	1,93	0091	1,022	1,11
0068	1,028	2,93	0092	1,026	1,14
0069	1,024	2,04	0093	-	0,84
0070	1,028	1,38	0094	-	1,26
0071	1,014	1,80	0095	1,026	1,69
0072	1,020	2,40	0096	1,018	1,22
0073	1,020	1,27	0097	-	1,68

Observação: De acordo com ACGIH (2001) os limites aceitáveis em amostras de urina são: concentração de creatinina (> 0,3 g/L e < 3,0 g/L) ou gravidade específica (> 1,010 e < 1,030).

**TABELA 27 - Valores de gravidade específica e da creatinina urinária dos trabalhadores da usina de asfalto (continuação)**

Trabalhador	Gravidade específica	Creatinina (g/L)	Trabalhador	Gravidade específica	Creatinina (g/L)
0098	-	0,81	0113	1,020	1,41
0099	1,024	0,54	0114	1,026	2,01
0100	1,030	1,17	0115	1,010	1,69
0101	1,038	0,93	0116	1,022	1,45
0102	-	1,13	0117	-	1,56
0103	1,024	1,14	0118	1,012	1,23
0104	1,024	1,38	0119	1,018	1,5
0105	1,008	2,04	0120	1,020	1,67
0106	1,022	0,80	0121	1,024	1,40
0107	-	1,15	0122	1,030	1,71
0108	1,012	1,19	0123	1,028	1,30
0109	1,020	1,31	0124	1,015	0,86
0110	1,016	1,48	0125	-	1,20
0111	1,020	1,84	0126	1,006	1,73
0112	1,020	1,43			

Observação: De acordo com ACGIH (2001) os limites aceitáveis em amostras de urina são: concentração de creatinina ( $> 0,3$  g/L e  $< 3,0$  g/L) ou gravidade específica ( $> 1,010$  e  $< 1,030$ ).

## **6.5. Determinação do 1-hidroxipireno em amostras de urina de trabalhadores da usina de asfalto**

Os resultados, da determinação do 1-hidroxipireno em amostras de urina dos trabalhadores da usina de asfalto pesquisada, estão reportados na Tabela 28. A concentração em  $\mu\text{g/L}$  foi corrigida pela creatinina e expressa em  $\mu\text{g/g}$  de creatinina, mais comumente relatada na literatura.

**TABELA 28** - Valores, em concentração ( $\mu\text{g/L}$ ) e corrigidos pela creatinina ( $\mu\text{g/g}$  de creatinina), do 1-hidroxipireno urinário em trabalhadores de uma usina de asfalto

Amostra	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/g}$ creatinina	Amostra	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/g}$ creatinina
01	2,94	3,54	30	5,52	4,18
02	3,30	2,23	31	7,28	4,85
03	1,98	1,57	32	12,09	13,43
04	2,27	1,82	33	2,37	2,39
05	4,64	2,43	34	0,75	0,57
06	4,36	2,73	35	1,44	1,09
07	2,35	3,41	36	4,05	1,95
08	4,73	3,94	37	0,30	0,19
09	2,22	2,78	38	0,76	1,90
10	3,30	2,54	39	3,44	1,87
11	2,77	4,62	40	2,27	2,12
12	3,54	3,37	41	2,18	1,50
13	3,67	4,32	42	5,12	2,86
14	3,06	3,87	43	1,37	2,63
15	6,11	6,79	44	0,68	0,59
16	3,44	3,28	45	0,89	0,80
17	9,40	8,39	46	1,57	0,91
18	7,98	6,65	47	0,32	0,26
19	4,60	1,98	48	1,52	2,62
20	3,44	2,08	49	0,13	0,10
21	4,01	4,22	50	0,78	0,68
22	3,30	3,67	51	0,96	0,74
23	2,40	3,43	52	2,34	1,64
24	4,14	3,94	53	4,60	2,22
25	4,48	2,56	54	0,75	1,44
26	2,85	3,80	55	4,77	2,20
27	1,86	1,32	56	3,26	1,17
28	2,18	2,16	57	1,61	1,87
29	1,03	1,56	58	4,66	1,73

TABELA 28 - Valores, em concentração ( $\mu\text{g/L}$ ) e corrigidos pela creatinina ( $\mu\text{g/g}$  de creatinina), do 1-hidroxipireno urinário em trabalhadores de uma usina de asfalto (continuação)

Amostra	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/g}$ creatinina	Amostra	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/g}$ creatinina
59	3,65	3,04	88	3,80	2,15
60	1,80	1,34	89	3,60	1,38
61	2,40	1,69	90	7,10	5,18
62	1,14	1,46	91	0,50	0,45
63	1,74	1,08	92	2,70	2,37
64	1,57	0,81	93	1,80	2,14
65	2,56	0,81	94	1,35	1,07
66	6,13	3,44	95	1,21	0,72
67	6,77	3,51	96	1,71	1,40
68	6,89	2,35	97	5,23	3,11
69	8,18	4,01	98	6,40	7,90
70	5,25	3,80	99	1,23	2,28
71	7,41	4,12	100	1,70	1,45
72	19,61	8,17	101	1,12	1,20
73	3,97	3,13	102	6,25	5,53
74	11,62	4,14	103	0,49	0,43
75	25,55	16,17	104	2,59	1,88
76	4,02	2,18	105	3,50	1,72
77	1,06	0,80	106	2,45	3,06
78	4,40	4,27	107	0,71	0,62
79	1,17	1,80	108	1,23	1,03
80	1,15	0,94	109	2,92	2,23
81	0,80	0,47	110	2,57	1,74
82	1,30	0,81	111	3,35	1,82
83	2,82	2,94	112	1,47	1,03
84	4,80	4,32	113	1,47	1,04
85	2,40	1,15	114	3,38	1,68
86	1,01	1,91	115	6,22	3,68
87	0,89	6,82	116	3,24	2,23

**TABELA 28 - Valores, em concentração ( $\mu\text{g/L}$ ) e corrigidos pela creatinina ( $\mu\text{g/g}$  de creatinina), do 1-hidroxipireno urinário em trabalhadores de uma usina de asfalto (continuação)**

Amostra	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/g}$ creatinina	Amostra	$\mu\text{g/L}$	$\mu\text{g/g}$ creatinina
117	6,40	4,10	122	9,42	5,51
118	3,09	2,51	123	6,55	5,04
119	3,09	2,06	124	1,42	1,65
120	8,57	5,13	125	2,90	2,42
121	4,70	3,36	126	3,16	1,83

O 1-OHP tem sido determinado em diversos países e em diferentes indústrias com o mesmo intuito de avaliar a exposição aos HAPs. A Tabela 29 apresenta alguns limites sugeridos na literatura.

**TABELA 29 - Valores médios do 1-OHP obtido em diversos trabalhos publicados na literatura, especificando o local de exposição e a referência**

Concentração obtida ( $\mu\text{g/g}$ creatinina)*	Local da exposição	Referência
0,33	Usina de asfalto (produção)	BOOGAARD, P.J., <i>et al.</i> , 1995
8,10	Usina de asfalto (pavimentação)	HATJIAN, B.A., <i>et al.</i> 1995
1,18	Usina de asfalto (pavimentação)	BURGAZ, S., <i>et al.</i> , 1992
0,13	Usina de asfalto (pavimentação)**	LEVIN, J.O., <i>et al.</i> , 1995
4,40	Coqueria	JONGENELEN, F.J., <i>et al.</i> , 1990
6,20	Coqueria	VAN ROOIJ, <i>et al.</i> , 1993
4,30	Coqueria	MIELZYNSKA, D., <i>et al.</i> , 1997
2,70	Coqueria	BUCHET, J.P., <i>et al.</i> , 1992
48,0	Coqueria	WU, <i>et al.</i> , 1998
40,0	Produção alumínio	ANGERER, J., <i>et al.</i> , 1997

\* resultados em  $\mu\text{mol/mol}$  creatinina foram convertidos para  $\mu\text{g/g}$  creatinina como sugerido por BUCHET, J.P., *et al.*, 1992 ( $1\mu\text{g/g}$  creatinina =  $0,518\mu\text{mol/mol}$  creatinina); \*\* todos os trabalhadores não fumantes

A ACGIH (2003) sugere o 1-OHP como indicador biológico da exposição aos HAPs, isto indica que a monitorização biológica pode e deve ser considerada com base nesta indicação; todavia, um Índice Biológico de Exposição (BEIs®) não pôde ser determinado devido à insuficiência de dados na literatura, conforme relatado pela ACGIH, 2003.

Apesar dessa insuficiência de dados significativos, LAUWERYS, R.R. (1996) propôs o valor limite de 2,7 µg/g creatinina como uma tentativa no controle da exposição aos HAPs. Esse valor limite foi baseado na literatura disponível até aquele momento, mas é importante salientar que revisões regulares devem ser realizadas a luz de novos dados científicos.

E, com base no trabalho de LAUWERYS, R.R. ao inferirmos o valor proposto, os resultados obtidos indicam neste trabalho, que aproximadamente 40% dos trabalhadores estão acima deste limite.

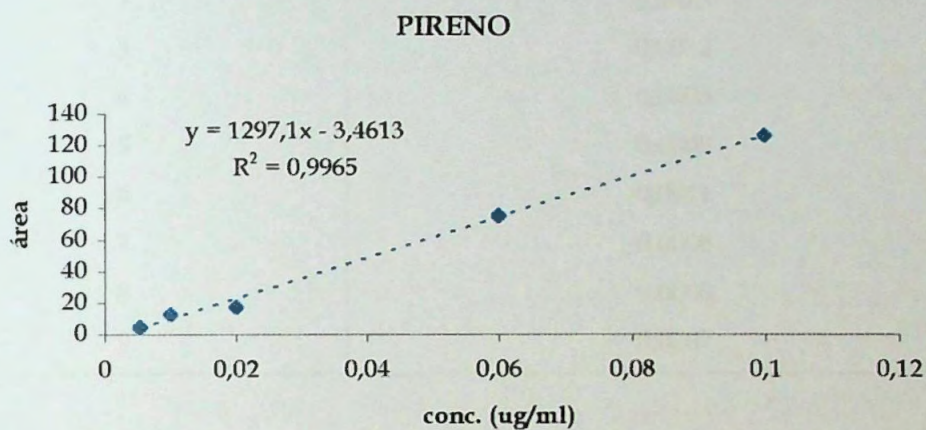
## **6.6. Determinação do pireno nos filtros e tubos adsorventes expostos ao ar respirável pelos trabalhadores na usina de asfalto**

A coleta como descrito no item 5.1.1.2. foi realizada fixando-se uma bomba portátil, como a destacada nas Figuras 9 e 10, aos funcionários da usina de asfalto. A coleta realizada entre 7:30 a 12:30 horas geraram dados que estão descritos na Tabela 30.

Foi também utilizada estratégia de procura da “pior situação”, procedendo-se à coleta em um ponto fixo junto da liberação do asfalto no caminhão, local este de provável maior exposição aos HAPs (Figura 11). Os resultados relativos ao ponto fixo estão descritos na Tabela 31.



Para a quantificação do pireno nos filtros e tubos adsorventes expostos ao ar respirável pelos trabalhadores na usina de asfalto foi construída uma curva de calibração ilustrada na Figura 40.



**FIGURA 40** – Curva de calibração do pireno na faixa de 0,005 a 0,1 µg/mL

Os resultados obtidos na análise do pireno quantificado nos filtros e nas resinas adsorventes foram expressos em µg/mL. No entanto, para a comparação e análise dos dados obtidos frente aos publicados na literatura, os resultados foram convertidos para mg/m<sup>3</sup>, conforme preconizado pela ACGIH, 2003.

$$\text{TLV em mg/m}^3 = \frac{\text{TLV em ppm (µg/mL)} \times 202,3 \text{ (PM do pireno)}}{24,45}$$

**TABELA 30** - Valores obtidos na determinação do pireno nos filtros e tubos adsorventes expostos ao ar respirável pelos trabalhadores na usina de asfalto, análise realizada com amostrador pessoal

Amostra	Concentração em mg/m <sup>3</sup>
1	0,0020
2	0,0023
3	0,0012
4	0,0006
5	0,0009
6	0,0011
7	0,0008
8	0,0009
9	0,0007

**TABELA 31** - Valores obtidos na determinação do pireno nos filtros e tubos adsorventes expostos ao ar respirável pelos trabalhadores na usina de asfalto, análise realizada com ponto fixo

Amostra	Concentração em mg/m <sup>3</sup>
Ponto fixo dia 1	0,0035
Ponto fixo dia 2	0,0110
Ponto fixo dia 3	0,0185

Os valores descritos na literatura variam de 0,0008 a 0,04 mg/m<sup>3</sup> (VIAU, C., 1995; ALESSIO, L., 1997; APOSTOLI, P., 1997; POPP, W., 1997; ROGGI, C., 1997; BENTSEN, R.K., 1998; JOHNSON, C., 1999; HOLLENDER, J., 2000; NIOSH, 2000; RAVELET, C., 2001; IARC, 2001).

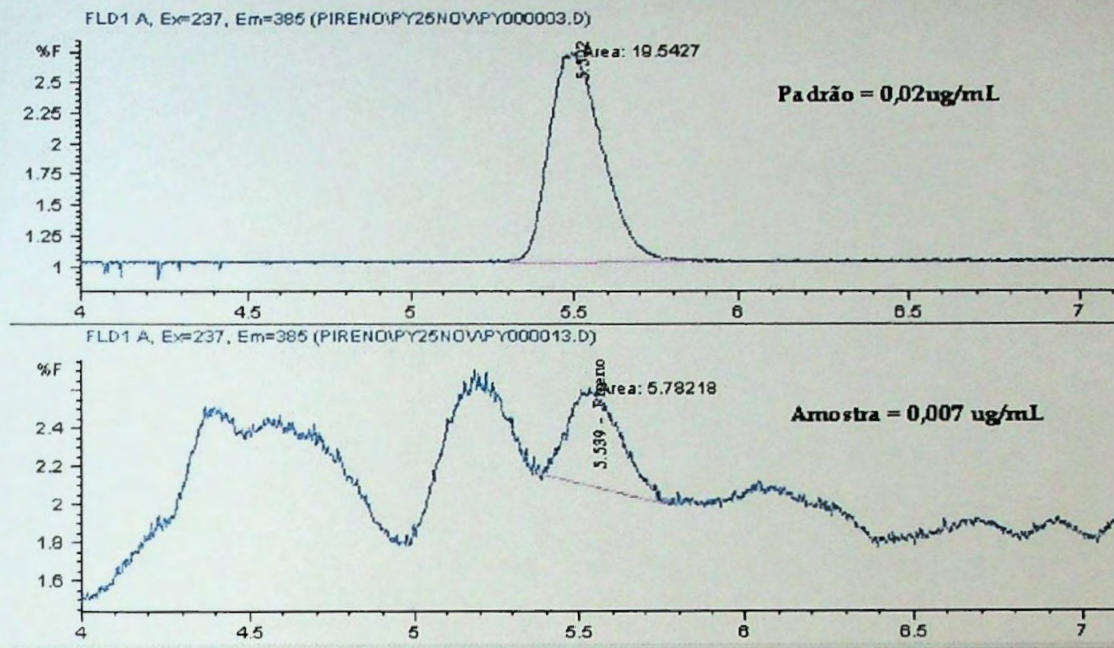


FIGURA 41 - Cromatogramas representando uma solução-padrão de pireno em acetonitrila ( $0,02 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) e uma amostra após a extração do pireno nos filtros e tubos adsorventes expostos ao ar respirável pelos trabalhadores na usina de asfalto ( $0,007 \mu\text{g}/\text{mL}$ )

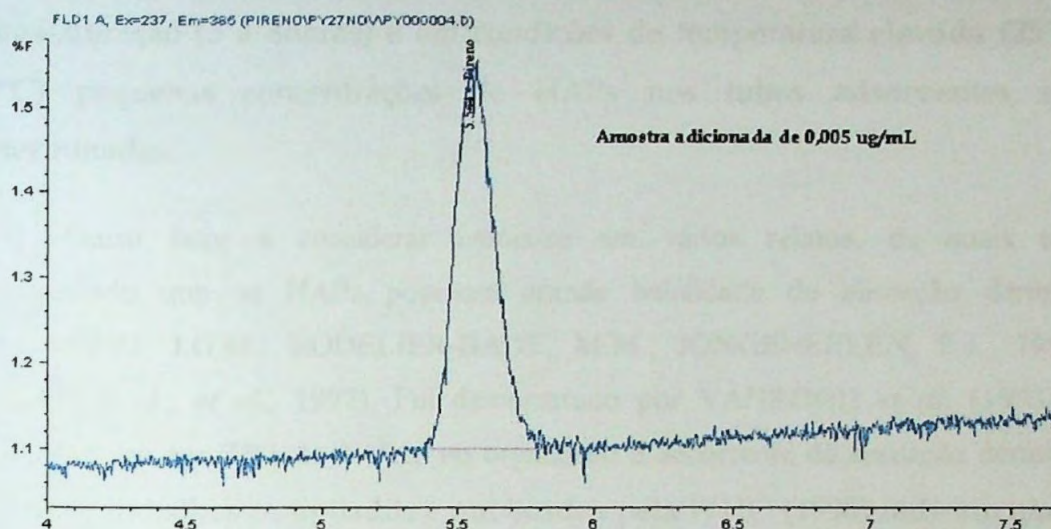


FIGURA 42 – Amostra de uma solução de acetonitrila adicionada com uma solução-padrão de pireno. Concentração final 0,005  $\mu\text{g}$  de pireno/mL de acetonitrila

A baixa concentração do pireno obtida neste trabalho, verificada na Tabela 30, pode ter ocorrido em razão da eventual perda de HAPs semi-voláteis durante a coleta, o transporte e o armazenamento das amostras de ar. Essa mesma situação foi constatada em outros trabalhos da literatura (BENTSEN, R.K., *et al.*, 1998, 2000; BONNET, P., *et al.*, 2000; BRANDT, H., *et al.*, 2000). No trabalho realizado por LAFONTAINE, M., *et al.* (2000) verificou-se uma perda de HAPs pelo depósito de partículas na parede dos cassetes e, que estas perdas podiam ser reduzidas se os cassetes e os tubos adsorventes fossem armazenados a temperaturas inferiores a  $-40^{\circ}\text{C}$ .

Foi relatado por APOSTOLI, P., *et al.* (1997) que, em função do volume de ar, do fluxo e da temperatura envolvida na coleta, pode ocorrer um desequilíbrio entre a fase sólida e a fase de vapor, provocando, com isso, a sublimação dos HAPs na forma de aerossol, o que acarretará, possivelmente, a perda da fração na forma de vapor. É por isso que em uma amostragem de

longa duração (5 a 8 horas) e em condições de temperatura elevada (25° a 30°C) pequenas concentrações de HAPs nos tubos adsorventes são determinadas.

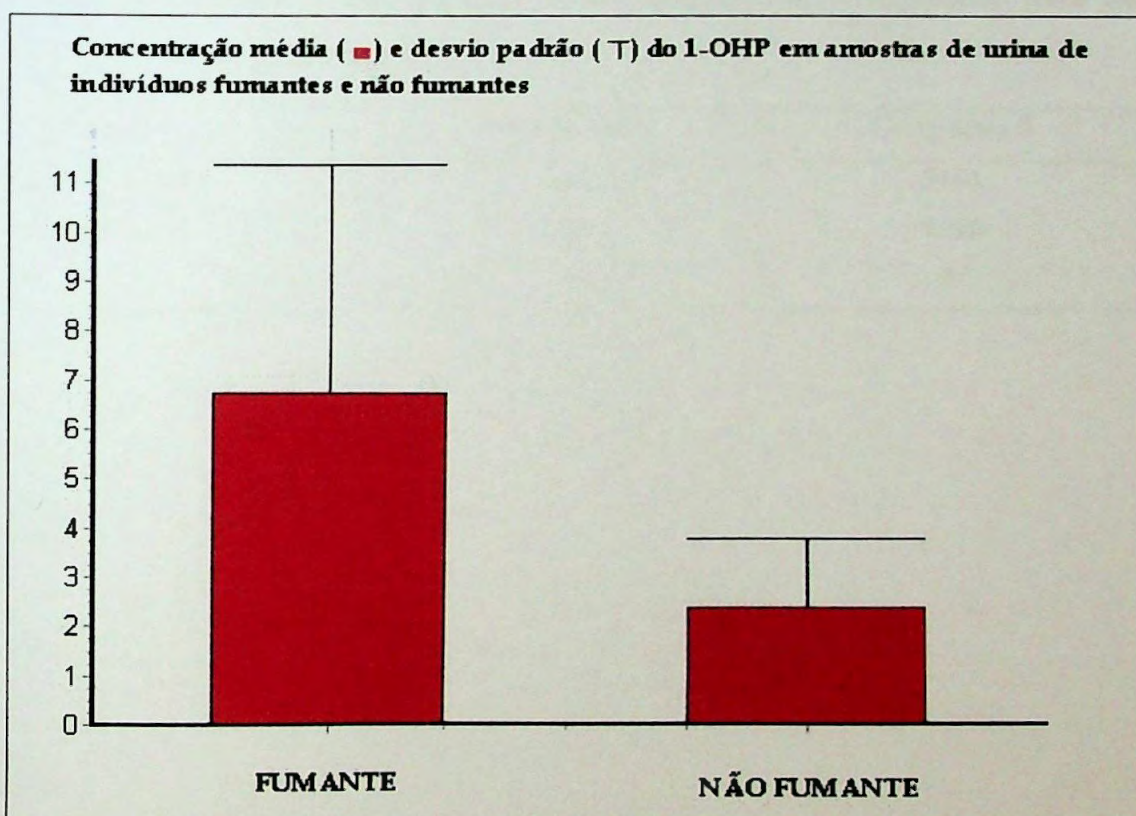
Outro fator a considerar baseia-se em vários relatos, os quais têm demonstrado que os HAPs possuem grande habilidade de absorção dérmica (VANROOIJ, J.G.M.; BODELIER-BADE, M.M.; JONGENELEN, F.J., 1993, ANGERER, J., *et al.*, 1997). Foi demonstrado por VANROOIJ *et al.* (1993) e colaboradores que 75% do 1-OHP no organismo é decorrente da absorção dérmica. Diversos trabalhos compilados e publicados pela WHO (1998) indicam que a absorção pela pele é um importante fator na estimativa total de exposição a esses compostos. Neste caso, o risco individual pode ser melhor avaliado por meio da monitorização biológica.

## 6.7. Análise estatística

O teste Mann-Whitney trabalha com valores dentro de uma faixa extensa, já que este não assume que a população siga uma distribuição Gaussian. Além disto o teste compara o significado entre dois grupos. O teste Mann-Whitney -- não pareado e não paramétrico -- aplicado para as variáveis de fumante e não fumante sugere que a diferença entre as médias e os desvios-padrão é extremamente significativa, com um valor de  $P < 0,0001$ . O valor de  $P$  é uma estimativa baseada na aproximação normal. Os resultados podem ser observados na Tabela 32 e Figura 43.

**TABELA 32** - Valores da concentração média e desvio padrão do 1-OHP em amostras de urina e o número de pontos analisados (n) - amostras, pelo teste de Mann-Whitney -- não pareado e não paramétrico -- aplicado para as variáveis de fumante e não fumante

Análise	Fumante	Não fumante
Média (ng/mL)	6,745	2,362
Desvio padrão	4,631	1,398
N	37	89

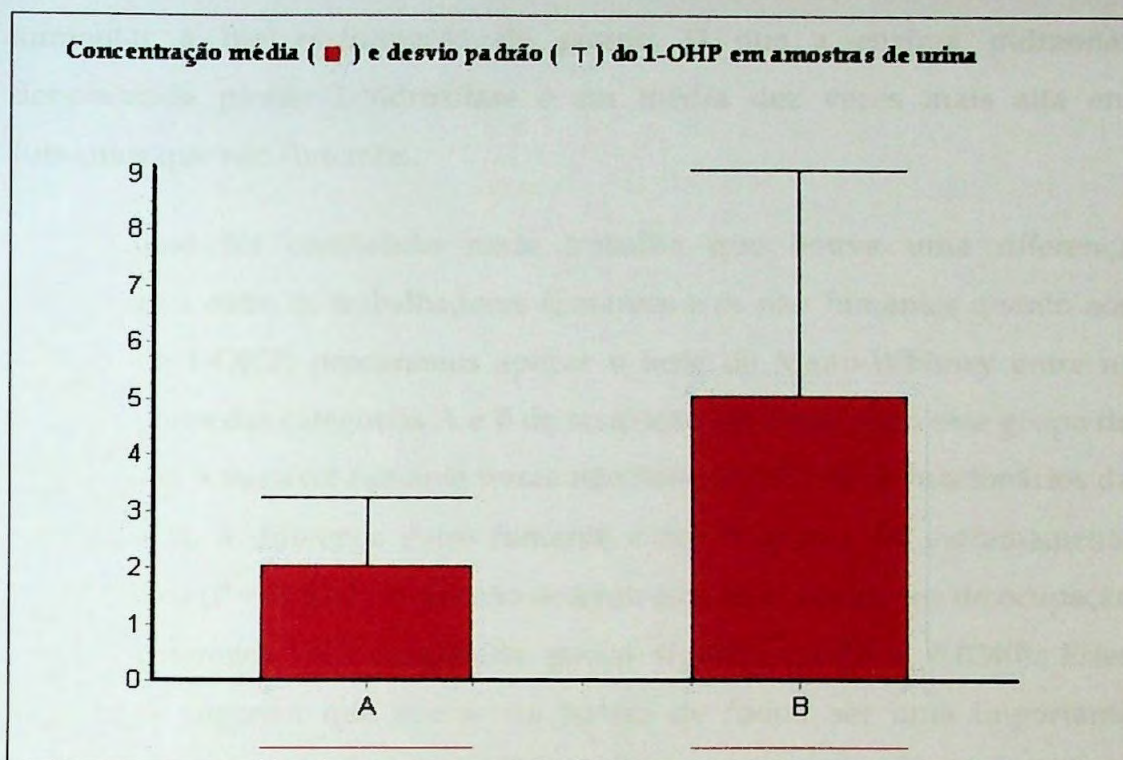


**FIGURA 43** - Representação gráfica do estudo estatístico Mann-Whitney -- não pareado e não paramétrico -- aplicado para as variáveis de fumante e não fumante por meio da concentração média e desvio padrão do 1-OHP em amostras de urina. A diferença foi considerada significativa ( $P < 0,0001$ )

O teste Mann-Whitney -- não pareado e não paramétrico -- aplicado para as variáveis de ocupação A e B, descritas no item 5.3.7. sugere que a diferença entre as médias e os desvios padrão é extremamente significativa, com um valor de  $P < 0,0001$ . Os resultados podem ser observados na Tabela 33 e Figura 44.

**TABELA 33** - Valores da concentração média e desvio padrão do 1-OHP em amostras de urina e o número de pontos analisados (n) - amostras, pelo teste de Mann-Whitney -- não pareado e não paramétrico -- aplicado para as variáveis de ocupação A e B

<b>Análise</b>	<b>Ocupação A</b>	<b>Ocupação B</b>
Média (ng/mL)	2,035	5,071
Desvio padrão	1,225	4,026
N	59	67



**FIGURA 44** – Representação gráfica do estudo estatístico Mann-Whitney -- não pareado e não paramétrico -- aplicado na ocupação A em relação a ocupação B por meio da concentração média e desvio padrão do 1-OHP em amostras de urina. A diferença foi considerada significativa ( $P < 0,0001$ )

A diferença significativa entre fumantes e não fumantes ( $P < 0,0001$ ) está de acordo com os resultados encontrados na literatura, que sugerem que o cigarro pode causar um distinto aumento na excreção do 1-OHP urinário (BUCHET, J.P., *et al.*, 1992; GOEN, Th., *et al.*, 1995; DELL'OMO, M., *et al.*, 1996; GILBERT, N.L., *et al.*, 1997; BENTSEN, R.K., *et al.*, 1998; GERDE, P. *et al.*, 1998; HEIKKILA, P., *et al.*, 2002). Diversos autores têm relatado um efeito sinérgico do cigarro nos níveis de 1-OHP urinário entre trabalhadores expostos aos HAPs (JONGENELEN, F.K., *et al.*, 1990; OVREBO, S., *et al.*, 1994; VAN SCHOOTEN, F.J., 1995). Foi relatado por VAINIO, H.; ELOVAARA, E.; LUUKKANEN, L. (1995) que o hábito de fumar pode



aumentar a biotransformação do pireno, já que a enzima pulmonar denominada pireno 1-hidroxilase é em média dez vezes mais alta em fumantes que não fumantes.

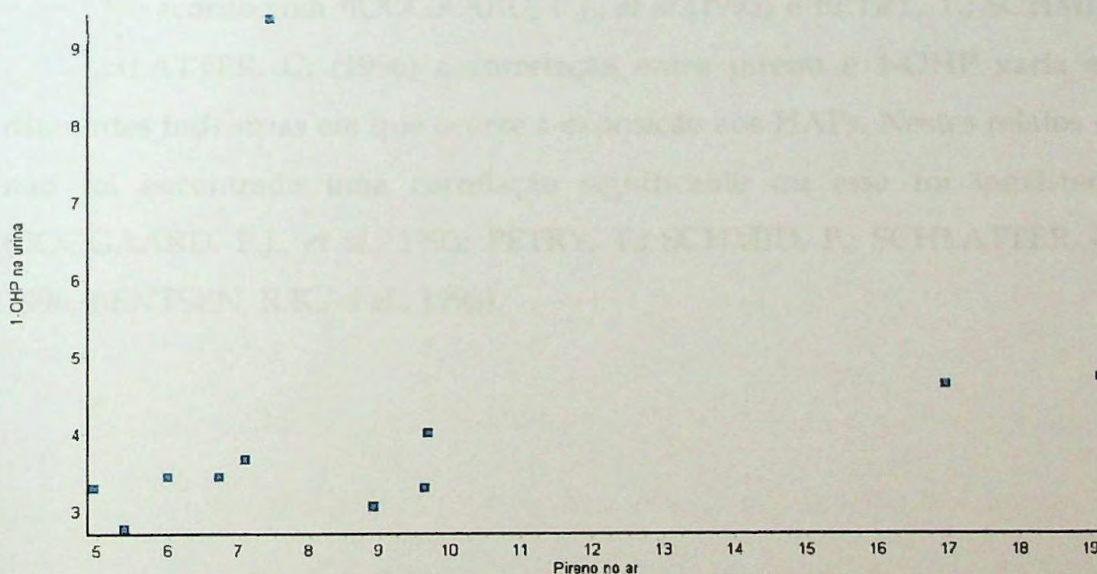
Como foi constatado neste trabalho que houve uma diferença significativa entre os trabalhadores fumantes e os não fumantes quanto aos valores de 1-OHP, procuramos aplicar o teste de Mann-Whitney entre os trabalhadores das categorias A e B de ocupação, diferenciando esse grupo de acordo com a variável fumante *versus* não fumante. Entre os funcionários da ocupação A, a diferença entre fumante e não fumante foi extremamente significativa ( $P = 0,0001$ ), o que não ocorreu com os funcionários da ocupação B, cuja diferença foi considerada pouco significativa ( $P = 0,0240$ ). Estes resultados sugerem que apesar do hábito de fumar ser uma importante variável na concentração do 1-OHP urinário, essa variável não interferiu significativamente nos resultados obtidos com os trabalhadores dos setores de trabalho onde se supõe haver uma maior exposição aos HAPs. Este fato foi constatado em outros relatos que sugerem que o cigarro pode causar um distinto aumento na excreção do 1-OHP urinário em locais com baixa exposição aos HAPs, mas a diferença entre indivíduos fumantes e não fumantes desaparece com o aumento ou intensidade de exposição aos HAPs (BUCHET, J.P., *et al.*, 1992; DELL'OMO, M., *et al.*, 1998).

A descrição do trabalho ou função poderá considerar a real estimativa da exposição ao categorizar em grupos controle e expostos a população analisada. De acordo com as observações de OMLAND, O., *et al.*, (1994) citado por HATJIAN B.A., *et al.* (1995), a alta contaminação de HAPs no macro-ambiente poderia ocultar a real diferença entre grupos controles e trabalhadores expostos.

Vários autores relatam uma correlação positiva entre o pireno e os HAPs e entre o pireno e o 1-OHP (ELOVAARA, E., *et al.*, 1995;

JONGENELEN, F.J., *et al.*, 1990; BOUCHARD, M., *et al.*, 1996, 1998; BUCHET, J.P., *et al.*, 1992).

Neste trabalho, no entanto, os resultados de correlação entre as avaliações ambiental e biológica, utilizando-se respectivamente a concentração do pireno no ar e do 1-OHP em amostras de urina dos trabalhadores de uma usina de asfalto, sugerem uma correlação não tão significativa com um  $r = -0,75$  e  $P = 0,0663$  (Spearman) e  $r = -0,7325$ ,  $r^2 = 0,5365$  e  $P = 0,0612$  (Pearson). O valor de  $P$  sugere uma fraca correlação positiva em ambos os testes aplicados.



**FIGURA 45** - Demonstração gráfica do estudo estatístico Pearson aplicado na para verificar a correlação entre pireno encontrado no ar e o 1-OHP na urina dos trabalhadores. O valor de  $P = 0,06$  sugere uma fraca correlação positiva

Alguns fatores poderiam explicar essa fraca correlação, como, por exemplo, possíveis perdas do pireno durante a amostragem, transporte e armazenamento, como já mencionado anteriormente. O pireno é um HAP semivolátil e muitas perdas podem ter ocorrido por evaporação. Esta perda implica que os dados obtidos tenham sido subestimados sobre os níveis reais da exposição (BONNET, P., *et al.*, 2000; BRANDT, H., *et al.*, 2000). Foi observado no trabalho de BENTSEN, R.K., *et al.* (1998) uma alta proporção de pireno na fase de vapor (85%) quando comparado com a fase particulada (33%). Outro fator que justificaria os resultados encontrados seria a absorção por via dérmica (JONGENELEN, F.J., *et al.*, 1987; BOOGAARD, P.J., *et al.*, 1995; PETRY, T.; SCHMID, P.; SCHLATTER, C., 1996; GERDER, P., *et al.*, 1998; BENTSEN, R.K., *et al.*, 1998).

De acordo com BOOGAARD, P.J., *et al.* (1995) e PETRY, T.; SCHMID, P.; SCHLATTER, C. (1996) a correlação entre pireno e 1-OHP varia em diferentes indústrias em que ocorre a exposição aos HAPs. Nestes relatos ou não foi encontrada uma correlação significativa ou essa foi inexistente (BOOGAARD, P.J., *et al.*, 1995; PETRY, T.; SCHMID, P.; SCHLATTER, C., 1996; BENTSEN, R.K., *et al.*, 1998).

## 7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos, concluímos que:

- A validação do método para a determinação do 1-OHP em amostras de urina, sugerido por JONGENELEN (1986), foi satisfatória atendendo os objetivos deste trabalho;
  - A validação do método, recomendado pelo NIOSH (1988) para a determinação do pireno em sistema combinado de captação de ar, com tubo adsorvente e membrana, foi satisfatória atendendo os objetivos deste trabalho;
  - Os resultados de 1-OHP obtidos em trabalhadores de uma usina de asfalto evidenciam que há uma exposição significativa ao pireno, confirmando a sua utilização como indicador biológico da exposição aos HAPs.
-

## 8. RECOMENDAÇÕES

Após a realização deste trabalho de pesquisa recomendamos:

1. Elaborar um protocolo de pesquisa para valor de referência aplicada para a população geral (sadia e não ocupacionalmente exposta);
  2. Ampliar no universo das empresas cujas atividades liberem os HAPs na atmosfera do ambiente de trabalho, a necessidade de realizar a monitorização do ar do ambiente de trabalho e a monitorização biológica através da determinação do hidroxipireno urinário nos seus funcionários;
  3. Através dos resultados obtidos, nessa ampliação de estudos, corroborar com a necessidade de se estabelecer ou um limite biológico de exposição e/ou um valor de referência tecnológico para as condições brasileiras a exemplo do que sugere a ACGIH (2003) para o 1-OHP urinário.
-

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>

AITIO, A. Biological monitoring today and tomorrow. *Scand. J. Work, Environ. Health*, Helsinki, v.20, p.46-58, 1994.

ALESSIO, L.; APOSTOLI, P.; PORRU, S.; CLONFERO, E.; MINOIA, C.; ASSENNATO, G.; BERGAMASCHI, E.; CARTA, P.; CASSANO, F.; DELL'OMO, M.; FIORENTINO, M.L.; FOA, V.; FORNI, A.; GABBANI, G.; IZZOTTI, A.; MASTRANGELO, G.; PAVANELLO, S.; SARTORELLI, P.; VALERIO, F. Tossicologia e prevenzione dei rischi da esposizione professionale a idrocarburi policiclici aromatici. I. Linee guida per la prevenzione dei rischi da esposizione professionale a idrocarburi policiclici aromatici. *G. Ital. Med. Lav. Ergon.*, Pavia, v.19, n.4, p.131-136, 1997.

ALESSIO, L.; BERLIN, A.; TOFFOLETTO, F. Reability of urinary creatinine as a parameter used to adjust of urinary biological indicators. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v.55, p.99-106, 1985.

AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS. **2002 TLVs and BEIs based on the documentation for threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices.** Cincinnati: ACGIH, 2002. 201p.

AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS. **2003 TLVs and BEIs based on the documentation for threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices.** Cincinnati: ACGIH, 2003. 219p.

---

<sup>1</sup> De acordo com a norma NBR6023/2000 preconizada pela ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE SOURCE INDEX (CASSI) 2002.

- ANGERER, J.; HORSCH, B. Determination of aromatic hydrocarbons and their metabolites in human blood and urine. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.580, p.229-255,1992.
- ANGERER, J.; MANNSCHRECK, C.; GÜNDEL, J. Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a graphite-electrode producing plant: biological monitoring of 1-hydroxypyrene and monohydroxylated metabolites of phenanthrene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v.69, p.323-331, 1997.
- APOSTOLI, P. Considerazioni generali sulla quality assurance nel laboratorio tossicologico. I. Valori de riferimento e i valori limite nella prevenzione ambientale e occupazionale. *G. Ital. Med. Lav. Ergon.*, Pavia, p.217-218, 1995.
- APOSTOLI, P.; CASSANO, F.; CLONFERO, E.; DELL'OMO, M.; FIORENTINO, M.L.; IZZOTTI, A.; MINOIA, C.; PAVANELLO, S.; VALERIO, F. Tossicologia e prevenzione dei rische da esposizione professionale a idrocarburi policiclici aromatici. II. Tossicologia. Valutazione dell'esposizione. Monitoraggio ambientale e biologico. *G. Ital. Med. Lav. Ergon.*, Pavia, v.19, n.4, p.137-151, 1997.
- APOSTOLI, P.; MINOIA, C.; ALESSIO, L. Idrocarburi policiclici aromatici negli ambienti di vita e di lavoro: esposizione ed effetti. In: CONVEGNO NAZIONALE, 1, Gargnano, 1996. *Atti. s.n.t.* 434p.
- AZEVEDO, F.A.; DELLA ROSA, H.V.; LEYTON, V. O controle bioquímico laboratorial da exposição de trabalhadores a substâncias químicas: a medicina do trabalho e a prevenção da intoxicação. *Rev. Bras. Saúde Ocup.*, São Paulo, v.10, p.19-29, 1982.
- BENTSEN, R.K.; HALGARD, K.; NOTO, H.; DAAE, H.L.; OVREBO, S. Correlation between urinary 1-hydroxypyrene and ambient air pyrene

- measured with an inhalable aerosol sampler and a total dust sampler in a electrode paste plant. **Sci. Total Environ.**, Amsterdam, v.212, p.56-67, 1998.
- BENTSEN, R.K.; NOTO, H.; HALGARD, K.; OVREBO, S. The effect of dust-protective respirator mask and the relevance of work category on urinary 1-hydroxypyrene concentration in PAH exposed electrode paste plant workers. **Ann. Occup. Hyg.**, Amsterdam, v.44, n.2, p.135-144, 2000.
- BERLIN, A.; YODAIKEN, R.E.; LOGAN, D.C. International seminar on the assessment of toxic agents at the workplace: roles of ambient and biological monitoring, Luxemburg, 8-12 December, 1980. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlin, v.50, p.197-207, 1982.
- BJORSETH, A.; RAMDAHL, T. **Handbook of polycyclic aromatic hydrocarbons**. New York: Marcel Dekker, 1985. v.2, 416p. (Emission Sources and Recent Progress in Analytical Chemistry).
- BONNET, P.; BINET, S.; BRANDT, H.; KRIECH, A.J.; LAFONTAINE, M.; NUNGE, H.; MORELE, Y.; DE GROOT, P.; WISSEL, H.; CASTEGNARO, M. Inhalation study on exposure to bitumen fumes. Part 1: Development and validation of the equipment. **Ann. Occup. Hyg.**, Amsterdam, v.44, n.1, p.15-29, 2000.
- BOOGAARD, P.J.; SITTEERT, N.J.V. Urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in workers in petrochemical industries: baseline values and dermal uptake. **Sci. Total Environ.**, Amsterdam, v.163, p.203-209, 1995.
- BOUCHARD, M.; VIAU, C. Urinary excretion kinetics of pyrene and benzo(a)pyrene metabolites following intravenous administration of the parent compounds or the metabolites. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, Orlando, v.139, p.301-309, 1996.
-



- BOUCHARD, M.; VIAU, C. Urinary and biliary excretion kinetics of 1-hydroxypyrene following intravenous and oral administration of pyrene in rats. *Toxicology*, Amsterdam, v.127, n.1/3, p.69-84, 1998.
- BRANDT, H.; LAFONTAINE, M.; KRIECH, A.J.; DE GROOT, P.; BONNET, P.; BINET, S.; WISSEL, H.; MORELE, Y.; NUNGE, H.; CASTEGNARO, M. Inhalation study on exposure to bitumen fumes. Part 2. Analytical results at two exposure levels. *Ann. Occup. Hyg.*, Amsterdam, v.44, n.1, p.31-41, 2000.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medicamentos. Legislação. Resoluções. Resolução n.391, de 09 de agosto de 1999. Anexo III: Guia para validação de métodos analíticos. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/391\\_99.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/391_99.htm). Acesso em: 14/07/2001.
- BRITO FILHO, J.A. *Tecnologia de pavimentos*. São Paulo: Escola Orlando Laviero Ferraiuolo - Convênio SENAI-SP/APEOP, 1994. 214p. [Apostila].
- BROUWER, D.H.; SEMPLE, S.; MARQUART, J.; CHERRIE, J.W. A dermal model for spray painters. Part 1. Subjective exposure modelling of spray paint deposition. *Ann. Occup. Hyg.*, Amsterdam, v.45, p.15-23, 2001.
- BRZEZNICKI, S.; JAKUBOWSKI, M.; CZERSKI, B. Elimination of 1-hydroxypyrene after human volunteer exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v.70, n.4, p.257-260, 1997.
- BUCHET, J.P.; GENNART, J.P.; CALDERON, F.M.; DELAVIGNETTE, J.P.; CUPERS, L.; LAUWERYS, R. Evaluation of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in a coke production and a graphite electrode manufacturing plant: assessment of urinary excretion of 1-

- hydroxypyrene as a biological indicator of exposure. *Br. J. Ind. Med.*, London, v.49, p.761-768, 1992.
- BUCKER, M.; GOLAN, M.; SCHMASSMANN, H.U.; GLATT, H.R.; STASIECKI, P.; OESCH, F. The epoxide hydratase inducer trans-stilbene oxide shifts the metabolic epoxidation of benzo(a)pyrene from the bay- to the K-region and reduces its mutagenicity. *Mol. Pharmacol.*, Washington, v.16(2), p.656-666, 1979.
- BUCKLEY, T.J.; LIOY, P.J. An examination of the time course from human dietary exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons to urinary elimination of 1-hydroxypyrene. *Br. J. Ind. Med.*, London, v.49, p.113-124, 1992.
- BURGAZ, S.; BORM, P.J.A.; JONGENELEN, F.J. Evaluation of urinary excretion of 1-hydroxypyrene and thioethers in workers exposed to bitumen fumes. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v.63, p.397-401, 1992.
- BURGAZ, S.; ERDEM, O.; KARAHALIL, B.; KARAKAYA, A.E. Cytogenetic biomonitoring of workers exposed to bitumen fumes. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v.419, p.123-130, 1998.
- BURSTYN, I.; KROMHOUT, H.; CRUISE, P.J.; BRENNAN, P. Designing an international industrial hygiene database of exposure among workers in the asphalt industry. *Ann. Occup. Hyg.*, Amsterdam, v.44, n.1, p.57-66, 2000a.
- BURSTYN, I.; KROMHOUT, H.; KAUPPINEN, T.; HEIKKILA, P.; BOFFETTA, P. Statistical modelling of the determinants of historical exposure to bitumen and polycyclic aromatic hydrocarbons among paving workers. *Ann. Occup. Hyg.*, Amsterdam, v.44, p.43-56, 2000b.

- CALDERON, F.M. Evaluacion del 1-hidroxipireno como bioindicador de la exposicion industrial a los hidrocarburos aromaticos policiclicos. **Salud Publica Mex.**, Mexico, v.35, n.6, p.607-613, 1993.
- CERNIGLIA, C.E. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Adv. Appl. Microbiol.**, New Jersey, v.30, p.30-71, 1984.
- CHASE, R.M.; LISS, G.M.; COLE, D.C.; HEATH, B. Toxic effects including reversible macrothrombocytosis in workers exposed to asphalt fumes. **Am. J. Ind. Med.**, New York, v.25, p.279-289, 1994.
- CHASIN, A.A.M.; CHASIN, M.; SALVADORI, M.C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.30, n.2, p.49-53, 1994.
- CHASIN, A.A.M.; NASCIMENTO, E.S.; RIBEIRO-NETO, L.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; ANDRAUS, M.H.; SALVADORI, M.C.; FERNÍCOLA, N.A.G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Rev. Bras. Toxicol.**, São Paulo, v.11, n.1, p.1-6, 1998.
- CHEMINFO. Information on chemicals reviewed. Canada: Canadian Center for Occupational Health and Safety. 2002/2003. [CD-ROM].
- CHUANG, J.C.; CALLAHAN, P.J.; LYU, C.W.; WILSON, N.K. Polycyclic aromatic hydrocarbon exposure of children in low-income families. **J. Exposure Anal. Environ. Epidemiol.**, New York, v.9, n.2, p.85-98, 1999.
- CLAYTON, G.D.; CLAYTON, F.E.; PATTY, F.A. **Patty's industrial hygiene and toxicology**. 4.ed. New York: Wiley, 1993/1994. v.2A, 941p.
- COLACIOPPO, S. Avaliação da exposição profissional a fumos metálicos em operações de solda. **Rev. Bras. Saúde Ocup.**, São Paulo, v.49, n.13, p.50-79, 1985.

- CONCAWE. **Bitumes and bitume derivatives**. Brussels: Concawe's Petroleum Products and Health Management Groups, 1992. (Product dossier, 92/104).
- CURRIE, L.A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities: IUPAC recommendations 1995. *Pure Appl. Chem.*, Research Triangle Park, v.67, n.10, p.699-1723, 1995.
- DELLA ROSA, H.V.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; COLACIOPPO, S. Monitorização ambiental e biológica. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. p.135-153.
- DELLA ROSA, H.V.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; FERNÍCOLA, N.A.G.G. **Monitorização biológica da exposição humana a agentes químicos**. São Paulo: Fundacentro, 1991. 67p.
- DELL'OMO, M.; MUZI, G.; MARCHIONNA, G.; LATINI, L.; CARRIERI, P.; PAOLEMILI, P.; ABBRITTI, G. Preventive measures reduce exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons at a graphite electrode plant. *Occup. Environ. Med.*, London, v.55, n.6, p.401-406, 1998.
- DOR, F.; HAGUENOER, J.M.; ZMIROU, D.; EMPEREUR-BISSONNET, P.; JONGENELEN, F.J.; NEDELLEC, V.; PERSON, A.; FERGUSON, C.C.; DAB, W. Urinary 1-hydroxypyrene as a biomarker of polycyclic aromatic hydrocarbons exposure of workers on a contaminated site: influence of exposure conditions. *J. Occup. Environ. Med.*, Baltimore, v.42, n.4, p.391-397, 2000.
- EATON, D.L.; KLASSEN, C.D. Principles of Toxicology. In: KLAASSEN, C.D.; AMDUR, M.O., DOULL, J., eds. **Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 5.ed. New York: Mac-Graw Hill, 1996. p.13-34.
-

- ELOVAARA, E.; HEIKKILÄ, P.; PYY, L.; MUTANEN, P.; RIIHIMÄKI, V. Significance of dermal and respiratory uptake in creosote workers: exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and urinary excretion of 1-hydroxypyrene. *J. Occup. Environ. Med.*, Baltimore, v.52, p.196-203, 1995.
- FEUNEKES, F.D.J.R.; JONGENELEN, F.J.; LAAN, V.D.H.; SCHOONHOF, F.H.G. Uptake of polycyclic aromatic hydrocarbons among trainers in a fire-fighting training facility. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Baltimore, v.58, p.23-28, 1997.
- FLALA, Z.; VYSKOCIL, A.; KRAJAK, V.; MASIN, V.; EMMINGER, S.; SRB, V.; TEJRAL, J. Polycyclic aromatic hydrocarbons. I. Environmental contamination and environmental exposure. *Acta Medica*, Hradec Kralove, v.42(2), p.77-89, 1999.
- FINNISH INSTITUTE OF OCCUPATIONAL HEALTH. FIOH in Action. Departments. Department of Industrial Hygiene and Toxicology. Disponível em: <http://www.occuphealth.fi/Internet/English/default.htm>. Acesso em: 20 set. 2001.
- FINLAYSON-PITTS, B.J.; PITTS, J.N. JR. Tropospheric air pollution: ozone, airborne toxics, polycyclic aromatic hydrocarbons, and particles. *Science*, Washington, v.276(5315), p.1045-1052, 1997.
- FISCHER, F.M.; GOMES, J.R.; COLACIOPPO, S. **Temas de saúde do trabalhador**. São Paulo: Ucitec, 1989. p.73-156.
- GAMBLE, J.F.; NICOLICH, M.J.; BARONE, N.J.; VINCENT, W.J. Exposure-response of asphalt fumes with changes in pulmonary function and symptoms. *Scand. J. Work., Environ. Health*, Helsinki, v.25, p.186-206, 1999.

- GERDE, P.; MUGGENBURG, B.A.; SCOTT, G.G.; LEWIS, J.L.; PYON, K.H.; DAHL, A.R. Local metabolism in lung airways increases the uncertainty of pyrene as a biomarker of polycyclic aromatic hydrocarbon exposure. *Carcinogenesis*, Oxford, v.19, n.3, p.493-500, 1998.
- GILBERT, N.L.; VIAU, C. Biological monitoring of environmental exposure to PAHs in the vicinity of a Soderberg aluminium reduction plant. *Occup. Environ. Med.*, London, v.54, n.8, p.619-621, 1997.
- GÖEN, T.; GÜNDEL, J.; SCHALLER, K.H.; ANGERER, J. The elimination of 1-hydroxypyrene in the urine of the general population and workers with different occupational exposures to PAH. *Sci. Total Environ.*, Amsterdam, v.163, p.195-201, 1995.
- GOLDMAN, R.; ENEWOLD, L.; PELLIZZARI, E.; BEACH, J.B.; BOWMAN, E.D.; KRISHNAN, S.S.; SHIELDS, P.G. Smoking increases carcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons in human lung tissue. *Cancer Res.*, Philadelphia, v.61(17), p.6367-6371, 2001.
- GRIMMER, G., ed. **Environmental carcinogens: polycyclic aromatic hydrocarbons: chemistry, occurrence, biochemistry, carcinogenicity.** Boca Raton: CRC Press, 1983.
- GRIMMER, G.; JACOB, J.; DETTBARN, G.; NAUJACK, K.W. Determination of urinary metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) for the risk assessment of PAH-exposed workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v.69, p.231-239, 1997.
- GUERIN, M.R. Energy sources of polycyclic hydrocarbons. In: GELBOIN, H.V., T'SO, P.O.P., eds. **Polycyclic hydrocarbons and cancer.** New York: Academic Press, 1978. p.3-42.

- HAWLEY'S condensed chemical dictionary. 11.ed. New York: Van Nostrand Reinold, 1987. p.102-103, 290, 320.
- HANKS, A.R. Methods development and implementation of quality assurance systems. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF LATIN AMERICAN AND CARIBBEAN, 1, São Paulo, 1995. *Anais.* (Section - AOAC International).
- HANSEN, A.M.; CHRISTENSEN, J.M.; SHERSON, D. Estimation of reference values for urinary 1-hydroxypyrene and  $\alpha$ -naphthol in Danish workers. *Sci. Total Environ.*, Amsterdam, v.163, p.211-219, 1995.
- HARA, K.; HANAOKA, T.; YAMANO, Y.; ITANI, T. Urinary 1-hydroxypyrene levels of garbage collectors with low-level exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Sci. Total Environ.*, Amsterdam, v.199, n.1/2, p.159-164, 1997.
- HARVEY, R.G. In: \_\_\_\_\_, R.G., ed. *Polycyclic hydrocarbons and carcinogenesis*. Washington: American Chemical Society, 1985. 406p. (ACS symposium series, 0097-6156.283), (American Chemical Society. Meeting, 188, Philadelphia, 1984).
- HARVEY, R.G.; GEACINTOV, N.E. Intercalation and binding of carcinogenic hydrocarbon metabolites to nucleic acids. *Acc. Chem. Res.*, Columbus, v.21, p.66-73, 1988.
- HATJIAN, B.A.; EDWARDS, J.W.; HARRISON, J.; WILLIAMS, F.M.; BLAIN, P.G. Ambient, biological and biological effect monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Toxicol. Lett.*, Amsterdam, v.77, p.271-279, 1995.

- HEIKKILA, P.; RIALA, R.; HAMEILA, M.; NYKYRI, E.; PFAFFLI, P.  
Occupational exposure to bitumen during road paving. **Am. Ind. Hyg. Assoc. J.**, Fairfax, v.63, p.156-165, 2002.
- HERRICK, R.F.; RINEHART, R.D.; McCLEAN, M.; WEKER, R.; SAPKOTA, A.; CHRISTIANI, D. Exposure assessment for complex mixtures: the example of asphalt fume. In: INTERNATIONAL OCCUPATIONAL HYGIENE ASSOCIATION. Publications. Conference Abstracts. Cairns 2000 Abstracts - Contents. Session 18. Boston: Harvard School Public Health, 2000. Disponível em: <http://ioha.com/epubs/abstracts/cairns2000/session18.htm>. Acesso em: 16/07/2001.
- HOFFMANN, P. General aspects of environmental sampling. In: MARKERT, B. **Environmental sampling for trace analysis: Part II: General aspects.** Weinheim: VHC, 1994. p.11-23.
- HOLLENDER, J.; KOCH, B.; DOTT, W. Biomonitoring of environmental polycyclic aromatic hydrocarbon exposure by simultaneous measurement of urinary phenanthrene, pyrene and benzo[*a*]pyrene hydroxides. **J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.**, Amsterdam, v.739, p.225-229, 2000.
- HUNTER, D. **The diseases of occupations.** 5.ed. London: Hodder Stoughton, 1975. 1225p.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Polynuclear aromatic compounds: Part 1. Chemical environmental and experimental data.** Lyon: IARC, 1983. (IARC Monograph, n.32).
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Polynuclear aromatic compounds: Part 3. Industrial exposure in aluminum**



production, coal gasification, coke production, and iron and steel founding. Lyon: IARC, 1984a. (IARC Monograph, n.34).

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Polynuclear aromatic compounds: Part 4. Bitumens, coal tars and derived products, shale-oils and soots.** Lyon: IARC, 1984b. (IARC Monograph, n.35), (Working Group on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Meeting, Lyon, 1984).

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: preamble.** IARC Working Group on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Lyon, 1987. 39p.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Environmental Cancer Epidemiology.** In: BOFFETTA, P.; BURSTYN, I.; PARTANEN, T.; KROMHOUT, H.; SVANE, O.; LANGARD, S.; JARVHOLM, B.; FRENTZEL-BEYME, W.; KAUPPINEN, T.; STUCKER, I.; SHAHAM, J.; HEEDERIK, D.; AHRENS, W.; BERGDAHL, I.; CENEE, S.; FERRO, G.; HEIKKILA, P.; HOOIVELD, M.; JOHANSEN, C.; RANDEM, B.; SCHILL, W. editors. Epidemiological study of cancer mortality among European asphalt workers. Lyon: IARC, 2001. (IARC Internal Report no. 01/003).

IRWIN, R.J., VANMOUWERIK, M., STEVENS, L., SEESE, M.D., BASHAM, W. 1998. Environmental Contaminants Encyclopedia. National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins, Colorado. Distributed on the Internet via the Nature Net portion of the Park Service Home Page ([www.nps.gov](http://www.nps.gov)). Also distributed by the NPS and/or NTIS via CD-ROM.

JENKE, D.R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures. II. Guidelines for primary validation

parameters. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, Monticello, v.19, n.5, p.737-757, 1996.

JOHNSON, C.; GREENBERG, A. Extraction and high-performance liquid chromatographic separation of selected pyrene and benzo[*a*]pyrene sulfates and glucuronides: preliminary application to the analysis of smokers' urine. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, Amsterdam, v.728, p.209-216, 1999.

JOHNSTON, J.J.; DRAPER, W.M., STEPHENS, R.D. LC-MS compatible HPLC separation for xenobiotics and their phase I and phase II metabolites: simultaneous anion exchange and revised phase chromatography. *J. Chromatogr. Sci.*, Niles, v.29, p.511-516, 1991.

JONGENEELLEN, F.J.; ANZION, R.B.M.; LEIJDEKKERS, Ch.M.; BOS, R.P.; HENDERSON, P.T. 1-Hydroxypyrene in human urine after exposure to coal tar and a coal tar derived product. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v.57, p.47-55, 1985.

JONGENEELLEN, F.J.; BOS, R.P.; ANZION, R.B.M.; THEUWS, J.L.G.; HENDERSON, P.T. Biological monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons - metabolites in urine. *Scand. J. Work, Environ. Health*, Helsinki, v.12, p.137-143, 1986.

JONGENEELLEN, F.J.; ANZION, R.B.M.; HENDERSON, P.T. Determination of hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons in urine. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.413, p.227-232, 1987.

JONGENEELLEN, F.J.; ANZION, R.B.M.; SCHEEPERS, P.T.J.; BOS, R.P.; HENDERSON, P.T.; NIJENHUIS, E.H.; VEENSTRA, S.J.; BROUNS, R.M.E.; WINKES, A. 1-Hydroxypyrene in urine as a biological indicator of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in several work environments. *Ann. Occup. Hyg.*, Amsterdam, v.32, n.1, p.35-43, 1988.

JONGENEELLEN, F.J.; VAN LEEUWEN, F.E.; OOSTERINK, S.; ANZION, R.B.M.; VAN DER LOOP, F.; BOS, R.P.; VAN VEEN, H.G. Ambient and biological monitoring of cokeoven workers: determinants of the internal dose of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Br. J. Ind. Med.*, London, v.47, p.454-461, 1990.

JONGENEELLEN, F.J. Methods for routine biological monitoring of carcinogenic PAH-mixtures. *Sci. Total Environ.*, Amsterdam, v.199, n.1/2, p.141-149, 1997.

JONGENEELLEN, F.J. Benchmark guideline for urinary 1-hydroxypyrene as biomarker of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Ann. Occup. Hyg.*, Amsterdam, v.45, n.1, p.3-13, 2001.

KANG, D.H.; ROTHMAN, N.; POIRIER, M.C.; GREENBERG, A.; HSU, C.H.; SCHWARTZ, B.S.; BASER, M.E.; GROOPMAN, J.D.; WESTON, A.; STRICKLAND, P.T. Interindividual differences in the concentration of 1-hydroxypyrene-glucuronide in urine and polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in peripheral white blood cells after charbroiled beef consumption. *Carcinogenesis*, Oxford, v.16, n.5, p.1079-1085, 1995.

KARAKAYA, A.; YÜCESOY, B.; TURHAN, A.; ERDEM, O.; BURGAZ, S.; KARAKAYA, A.E. Investigation of some immunological functions in a group of asphalt workers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Toxicology*, Amsterdam, v.135, p.43-47, 1999.

KATTIYAR S.K.; AGARWAL, R.; MUKHTAR, H. Introduction: source, occurrence, nomenclature and carcinogenicity of polycyclic aromatic hydrocarbons - Section I. In: RATHORE, H.S.; SHERMA, J., eds. *CRC Handbook of chromatography: liquid chromatography of polycyclic aromatic hydrocarbons*. Boca Raton: CRC Press, 1993. p.1-17.

- KIM, H.; KIM, Y.D.; LEE, H.; KAWAMOTO, T.; YANG, M.; KATOH, T. Assay of 2-naphthol in human urine by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, v.734, p.211-217, 1999.
- KLAASSEN, C.D. Princípios de toxicologia. In: GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P., eds. **Goodman and Gilman's as bases farmacológicas da terapêutica**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1990. cap.3, p.32-40.
- KOICHI, M.; KINOUCI, T.; KATAOKA, K.; KANO, T.; OHNISHI, Y. *In vivo* formation of mutagens by intraperitoneal administration of polycyclic aromatic hydrocarbons in animals during exposure to nitrogen dioxide. *Carcinogenesis*, Oxford, v.17, n.7, p.1483-1490, 1996.
- KUBLIAK, R.; BELOWSKI, J.; SZCZEKLIK, J.; SMOLIK, E.; MIELZYNSKA, D.; BAJ, M.; SZCZESNA, A. Biomarkers of carcinogenesis in human exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v.445, p.175-180, 1999.
- KULJUKKA, T.; SAVELA, K.; VAARABRINTA, R.; MUTANEN, P.; VEIDEBAUM, T.; SORSA, M.; PELTONEN, K. Low response in white blood cell DNA adducts among workers in a highly polluted cokery environment. *J. Occup. Environ. Med.*, Baltimore, v.40, n.6, p.529-537, 1998.
- LAFONTAINE, M.; PAYAN, J.P.; DELSAUT, P.; MORELE, Y. Polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in an artificial shooting target factory: assessment of 1-hydroxypyrene urinary excretion as a biological indicator of exposure. *Ann. Occup. Hyg.*, Amsterdam, v.44, n.2, p.89-100, 2000.

- LAUWERYS, R.R. Occupational toxicology. In: KLAASSEN, C.D.; AMDUR, M.O., DOULL, J., eds. **Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 5.ed. New York: Mac-Graw Hill, 1996. cap.33, p.987-1010.
- LEIDEL, N.A.; BUSCH, K.A.; LYNCH, J.R. **Occupational exposure sampling strategy manual**. Cincinnati: National Institute for Occupational Safety and Health, 1977. (NIOSH Publication, n.77-173). 132p.
- LEITE, F. **Validação em análise química**. 3.ed. Campinas: Átomo, 1996. 224p.
- LEPERA, J.S. **Avaliação da exposição ocupacional a solventes e a material particulado em procedimentos de repintura automotiva**. São Paulo, 1997. 117p. Tese de Doutorado - Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo.
- LEVIN, J.O. First international workshop on hydroxypyrene as a biomarker for the PAH exposure in man: summary and conclusions. **Sci. Total Environ.**, Amsterdam, v.163, p.165-168, 1995.
- LEVIN, J.O.; RHÉN, M.; SIKSTRÖM, E. Occupational PAH exposure: urinary 1-hydroxypyrene levels of coke oven workers, aluminium smelter pot-room workers, road pavers and occupationally non-exposed persons in Sweden. **Sci. Total Environ.**, Amsterdam, v.163, p.169-177, 1995.
- MALAIYAND, M.; BENEDEK, A., HOLKO, A.P.; BANCSI, J.J. Measurement of potentially hazardous polynuclear aromatic hydrocarbons from occupational exposure during roofing and paving operations. In: COOKE, M.; DENNIS, A.J., eds. **Polynuclear aromatic hydrocarbons: physical and biological chemistry**. Columbus: Battelle Press, 1982. p.471-489.

- MALKIN, R.; KIEFER, M.; TOLOS, W. 1-Hydroxypyrene levels in coal-handling workers at a coke oven. *J. Occup. Environ. Med.*, Baltimore, v.38, n.11, p.1141-1144, 1996.
- MASTRANGELO, G.; MARZIA, V.; PARUZZOLO, P.; SAIA, B. Reduction of the lung cancer risk among dairy ranchers: dose response relationship with the traditional indicators of professional exposure. *G. Ital. Med. Lav. Ergon.*, Pavia, v.19(1), p.33-35, 1997.
- MEDINSKY, M.A.; KLASSEN, C.D. Toxicokinetics. In: KLAASSEN, C.D.; AMDUR, M.O., DOULL, J., eds. *Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons*. 5.ed. New York: Mac-Graw Hill, 1996. p.197-198.
- MENDELSON, M.L.; PEETERS, J.P.; NORMANDY, M.J., eds. **Biomarkers and occupational health: progress and perspectives**. Washington: Joseph Henry Press, 1995. 335p. (International Workshop on the Development and Application of Biomarkers, Santa Fé, 1994).
- MICHEL, O.R. *Toxicologia ocupacional*. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. 301p.
- MIELYNKA, D.; BRASZCZYNSKA, Z.; SIWINSKA, E.; SMOLIK, E.; BUBAK, A.; SOKAL, J.A. Exposure of coke-oven workers to polycyclic aromatic hydrocarbons based on biological monitoring results. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Baltimore, v.58, n.9, p.661-666, 1997.
- MILLER, J.C.; MILLER, J.N. **Statistics for analytical chemistry**. 2.ed. Chichester: Ellis Horwood, 1988. 117p. (Ellis Horwood series in analytical chemistry).
- MOEN, B.E.; NILSSON, R.; NORDLINDER, R.; OVREBO, S.; BLEIE, K.; SKORVE A.H.; HOLLUND, B.E. Assessment of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons in engine rooms by measurement of urinary 1-hydroxypyrene. *Occup. Environ. Med.*, London, v.53, p.692-696, 1996.

MORTELMANS, K.; HAWATOH, S.; LAWLOR, T.; SPECK, W.; TAINER, B.; ZEIDER, E. Evaluation of 270 chemicals for mutagenicity in the Ames *Salmonella* assay. *Environ. Mutagen.*, New York, v.7, p.1-119, 1986.

NATIONAL INSTITUTE OF OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH. **NIOSH manual of analytical methods**. 4.ed. Washington: National Institute of Occupational Safety and Health, 1998. 9p. (Method 5506, Issue 3, dated 15 January 1998).

NATIONAL INSTITUTE OF OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH. **Hazard review. Health effects of occupational exposure to asphalt**. Cincinnati: National Institute for Occupational Safety and Health, 2000. 132p. (DHHS NIOSH Publication, n.2001-110).

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. Specialized Information Services. **Hazardous Substances Data Bank (HSDB)**. Disponível em: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>. Acesso em: 20 jan. 2001.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. Specialized Information Services. **Integrated Risk Information System (IRIS)**. Disponível em: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?IRIS>. Acesso em: 20 jan. 2001.

NETTO, A.D.P.; MOREIRA, J.C.; DIAS, A.E.X.O.; ARBILLA, G.; FERREIRA, L.F.; OLIVEIRA, A.S.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitratos (NHPAs): uma revisão metodológica. *Quim. Nova*, São Paulo, v.23, n.6, p.765-773, 2000.

NIELSEN, P.S.; ANDREASSEN, A.; FARMER, P.B.; OVREBO, S.; AUTRUP, H. Biomonitoring of diesel exhaust-exposed workers. DNA and

- hemoglobin adducts and urinary 1-hydroxypyrene as markers of exposure. *Toxicol. Lett.*, Amsterdam, v.86, p.27-37, 1996.
- NORSETH, T.; WAAGE, J.; DALE, I. Acute effects and exposure to organic compounds in road maintenance workers exposed to asphalt. *Am. J. Ind. Med.*, New York, v.20, p.737-744, 1991.
- OLIVEIRA, S.L. *Tratado de metodologia científica: projetos de pesquisas, TGI, TCC, monografias, dissertações e teses*. São Paulo: Pioneira Thomson Learning, 2001. 320p.
- OMLAND, O.; SHERSON, D.; HANSEN, A.M.; SIGSGAARD, T.; AUTRUP, H.E.; OVERGAARD, E. Exposure of iron foundry workers to polycyclic aromatic hydrocarbons: benzo[a]pyrene-albumin adducts and 1-hydroxypyrene as biomarkers of exposure. *Occup. Environ. Med.*, London, v.51, p.513-518, 1994.
- OVREBO, S.; HAUGEN, A.; FARMER, P.B.; ANDERSON, D. Evaluation of biomarkers in plasma, blood, and urine samples from coke oven workers: significance of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Occup. Environ. Med.*, London, v.52, p.750-756, 1995.
- PARKINSON, A. Biotransformation of xenobiotics. In: KLAASSEN, C.D.; AMDUR, M.O., DOULL, J., eds. *Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons*. 5.ed. New York: Mac-Graw Hill, 1996. p.113-186.
- PARTANEN, T.J.; BOFFETTA, P. Cancer risk in asphalt workers and roofers: review and meta-analysis of epidemiologic studies. *Am. J. Ind. Med.*, New York, v.26, p.721-740, 1994.
- PAVANELLO, S.; GENOVA, A.; FOA, V.; CLONFERO, E. Valutazione professionale ad idrocarburi policiclici aromatici mediante l'analisi dei livelli urinari di 1-pirenenol. *Med. Lav.*, Fidenza, v.91, n.3, p.192-205, 2000.



- PETRY, T.; SCHMID, P.; SCHLATTER, C. Airbone exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and urinary excretion of 1-hydroxypyrene of carbon anode plant workers. *Ann. Occup. Hyg.*, Amsterdam, v.40, n.3, p.345-357, 1996.
- PHILLIPS, D.H. Fifty years of benzo(a)pyrene. *Nature*, London, v.303(5917), p.468-472, 1983.
- PITOT III, H.C.; DRAGAN, Y.P. Chemical Carcinogenesis. In: KLAASSEN, C.D.; AMDUR, M.O., DOULL, J., eds. *Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons*. 5.ed. New York: Mac-Graw Hill, 1996. p.201-268.
- POIRIER, M.C.; WESTON, A.; SCHOKET, B.; SHAMKHANI, H.; PAN, C.F.; McDIARMID, M.A.; SCOTT, B.G.; DEETER, D.P.; HELLER, J.M.; JACOBSON-KRAM, D.; ROTHMAN, N. Biomonitoring of United States Army soldiers in Kuwait in 1991. *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.*, Tokyo, v.7, n.6, p.545-551, 1998.
- POPP, W.; VAHRENHOLZ, C.; SCHELL, C.; GRIMMER, G.; DETTBARN, G.; KRAUS, R.; BRAUKSIEPE, A.; SCHMELING, B.; GUTZEIT, T.; VONBULOW, J.; NORPOTH, K. DNA single strand breakage, DNA adducts, and sister chromatid exchange in lymphocytes and phenanthrene and pyrene metabolites in urine of coke oven workers. *Occup. Environ. Med.*, London, v.54, n.3, p.176-183, 1997.
- PUZINAUSKAS, V.P.; CORBETT, L.W. **Differences between petroleum asphalt, coal-tar pitch and road tar**. College Park: The Asphalt Institute, 1978. 36p. (Research Report, n.78-1).
- PUZINAUSKAS, V.P. **Exposure of paving workers to asphalt emission**. College Park: The Asphalt Institute, 1980. 16p. (Research Report, n.80-1).

- PYY, L.; MAKELA, M.; HAKALA, E.; KAKKO, K.; LAPINLAMPI, T.; LISKO, A.; YRJANHEIKKI, E.; VAHAKANGAS, K. Ambient and biological monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons at coking plant. *Sci. Total Environ.*, Amsterdam, v.199, n.1/2, p.151-158, 1997.
- QUE HEE, S.S. **Biological monitoring: an introduction**. New York: ITP Van Nostrand Reinhold, 1993. 650p.
- RAVELET, C.; GROSSET, C.; MONTUELLE, B.; BENOIT-GUYOD, J.L.; ALARY, J. Liquid chromatography study of pyrene degradation by two micromycetess in a freshwater sediment. *Chemosphere*, Amsterdam, v.44, p.1541-1546, 2001.
- REGISTRY OF TOXIC EFFECTS OF CHEMICAL SUBSTANCES. In: TOMES CPS tm SYSTEM. Toxicology, Occupational Medicine and Environmental Series. Englewood: Micromedex; 2002. CD-ROM.
- REMPEL, D.M.; ROSENBERG, J.; HARRISON, R.J. **Biological monitoring**. 1991. cap.34, p.459-466.
- REVAP. ASEMA. SESAU. **Palestra técnica "O Asfalto"**. São Paulo, 1996. 55p. [Apostila].
- ROGGI, C.; MONOIA, C.; SCIARRA, G.F.; APOSTOLI, P.; MACCARINI, L.; MAGNAGHI, S.; CENNI, A.; FONTE, A.; NIDASIO, G.F.; MICOLI, G. Urinary 1-hydroxypyrene as a marker of exposure to pyrene: an epidemiological survey on a general population group. *Sci. Total Environ.*, Amsterdam, v.199, p.247-254, 1997.
- ROZMAN, K.K.; KLASSEN, C.D. Absorption, Distribution, and Excretion of Toxicants. In: KLAASSEN, C.D.; AMDUR, M.O., DOULL, J., eds. **Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons**. 5.ed. New York: Mac-Graw Hill, 1996. p.91-112.

- SAMANTA, S.K.; SINGH, O.V.; JAIN, R.K. Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation. **Trends Biotechnol.**, Londres, v.20(6), p.243-248, 2002.
- SANTELLI, G.M.M. Mutagenicidade e carcinogenicidade. In: OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. cap.1.6, p.71-84.
- SCHERER, G.; FRANK, S.; RIEDEL, K.; MEGER-KOSSIEN, I.; RENNER, T. Biomonitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons of nonoccupationally exposed persons. **Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.**, Tokyo, v.9, n.4, p.373-380, 2000.
- SENÇO, W. Materiais. In: **Pavimentação**. 2. ed. São Paulo : Grêmio Politécnico, 1979. 452 p.
- SINGH, R.; TUCEK, M.; MAXA, K.; TENGLEROVÁ, J.; WEYAND, E.H. A rapid and simple method for the analysis of 1-hydroxypyrene glucuronide: a potential biomarker for polycyclic aromatic hydrocarbon exposure. **Carcinogenesis**, Oxford, v.16, n.12, p.2909-2915, 1995.
- SIWINSKA, E.; MIELZYNSKA, D.; SMOLIK, E.; BUBAK, A.; KWAPULINSKI, J. Evaluation of intra- and interindividual variation of urinary 1-hydroxypyrene, a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Sci. Total Environ.**, Amsterdam, v.217, p.175-183, 1998.
- SIWINSKA, E.; MIELZYNSKA, D.; BUBAK, A.; SMOLIK, E. The effect of coal stoves and environmental tobacco smoke on the level of urinary 1-hydroxypyrene. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.445, n.2, p.147-153, 1999.
- SPEIGHT, J.G. Asphalt. In: KIRK-OTHMER **Encyclopedia of chemical technology**. 4.ed. New York: John Wiley, 1992. v.3, p.689-724.
- STEGEMAN, J.J.; SCHLEZINGER, J.J.; CRADDOCK, J.E.; TILLITT, D.E. Cytochrome P450 1A expression in midwater fishes: potential effects of

- chemical contaminants in remote oceanic zones. *Environ. Sci. Technol.*, Washington, v.35(1), p.54-62, 2001.
- TAYLOR, J.K. **Quality assurance of chemical measurements**. 2.ed. Chelsea: Lewis Publishers, 1987. 79p.
- THOMPSON, M. Comparability and traceability in analytical measurements and reference materials. *Analyst*, Letchworth, v.122, p.1201-1205, 1997.
- TOPPING, M.D.; WILLIAMS, C.R.; DEVINE, J.M. Industry's perception and use of occupational exposure limits. *Ann. Occup. Hyg.*, Amsterdam, v.42, n.6, p.357-366, 2000.
- TORRES, B.P. **Câncer da laringe e suas possíveis relações com o ambiente de trabalho**. São Paulo, 1999. 134p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Saúde Pública - Universidade de São Paulo.
- TSANACLIS, L.M. **Comunicação pessoal: anotação em aula**. São Paulo, mar. 1997, nov. 2000.
- UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Register (ATSDR). Toxicological profile for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). 1995. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/phs69.html>. Acesso em: 2 out. 2001.
- UNITED STATES. Environmental Protection Agency's (EPA). Integrated Risk Information System (IRIS, 2002) on Pyrene (129-00-0). 2000. Disponível em: <http://www.epa.gov/ngispgm3/iris>. Acesso em: 19 out. 2001.
- VAINIO, H.; ELOVAARA, E.; LUUKKANEN, L. Expression and co-induction of CYP1A1 and UGT1\*6 in human lungs. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.*, Geneva, p.47-48, 1995.

- VANROOIJ, J.G.M.; BODELIER-BADE, M.M.; JONGENELEN, F.J.  
Estimation of the individual dermal and respiratory uptake of PAH of 12  
coke oven workers. *Br. J. Ind. Med.*, London, v.50, p.623-632, 1993.
- VANROOIJ, J.G.M.; VEEGER, M.M.S.; BODELIER-BADE, M.M. Smoking  
and dietary intake of PAH as sources of interindividual variability in the  
baseline excretion of 1-hydroxypyrene in urine. *Int. Arch. Occup.  
Environ. Health*, Berlin, v.66, p.55-65, 1994.
- VAN SCHOOTEN, F.J.; JONGENELEN, F.J.; HILLEBRAND, M.X.J. PAH-  
DNA adducts in white blood cells and 1-hydroxypyrene in urine from  
aluminum workers. *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.*, Tokyo, v.4,  
p.69-77, 1995.
- VIAU, C.; CARRIER, G.; VYSKOCIL, A.; DODD, C. Urinary excretion  
kinetics of 1-hydroxypyrene in volunteers exposed to pyrene by the oral  
and dermal route. *Sci. Total Environ.*, Amsterdam, v.163, p.179-186,  
1995.
- VIAU, C.; VYSKOCIL, A. Patterns of 1-hydroxypyrene excretion in  
volunteers exposed to pyrene by the dermal route. *Sci. Total Environ.*,  
Amsterdam, v.163, p.187-190, 1995.
- VIAU, C.; VYSKOCIL, A.; MARTEL, L. Background urinary 1-  
hydroxypyrene levels in non-occupationally exposed individuals in the  
Province of Québec, Canada and comparison with its excretion in  
workers exposed to PAH mixtures. *Sci. Total Environ.*, Amsterdam,  
v.163, p.191-194, 1995.
- VINEIS, P.; TALASKA, G.; MALAVEILLE, C.; BARTSCH, H.; MARTONE,  
T.; SITHISARANKUL, P.; STRICKLAND, P. DNA adducts in urothelial  
cells: relationship with biomarkers of exposure to arylamines and

polycyclic aromatic hydrocarbons from tobacco smoke. *Int. J. Cancer*, New York, v.65, p.314-316, 1996.

WATERS. **Method Validation Guidelines**. Disponível em: <http://www.waters.com/watersdivision/contentd.asp?ref=JDRS-5LT6WZ>. Acesso em: 21/01/2002.

WEINSTEIN, I.B.; JEFFREY, A.M.; JENNETTE, K.W.; BLOBSTEIN, S.H.; HARVEY, R.G.; HARRIS, C.; AUTRUP, H.; KASAI, H.; NAKANISHI, K. Benzo(a)pyrene diol epoxides as intermediates in nucleic acid binding in vitro and in vivo. *Science*, Washington, v.193(4253), p.592-595, 1976.

WEIS, L.M.; RUMMEL, A.M.; MASTEN, S.J.; TROSKO, J.E.; UPHAM, B.L. Bay or baylike regions of polycyclic aromatic hydrocarbons were potent inhibitors of Gap junctional intercellular communication. *Environ. Health Perspect.*, North Carolina, v.106(1), p.17-22, 1998.

WILD, S.R., JONES, K.C. Polynuclear aromatic hydrocarbons in the United Kingdom environment: a preliminary source inventory and budget. *Environ. Pollut.*, Amsterdam, v.88, p.91-108, 1995.

WORLD OF HEALTH ORGANIZATION. **Selected non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons**. Geneva: WHO, 1998. 883p. (Environmental Health Criteria, 202).

WRBITZKY, R.; GOEN, T.; LETZEL, S.; FRANK, F.; ANGERER, J. Internal exposure of waste incineration workers to organic and inorganic substances. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v.68, p.13-21, 1995.

WU, T.W.; MAO, I.F.; HO, C.K. Urinary 1-hydroxypyrene concentrations in cokeoven workers. *Occup. Environ. Med.*, London, v.55, p.461-467, 1998.

WUNSCH FILHO, V. Riscos ocupacionais e câncer de pulmão. *Jornal de Pneumologia*, v.21, n.1, p.34-42, 1995.

ZANDER, M. Anthropogenic compounds. In: HUTZINGER, O., ed. **The handbook of environmental chemistry**. v.3, pt.A, ISBN: 3540096906, Berlin: Springer Verlach, 1980.

## 10. ANEXOS





Universidade de São Paulo  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

## TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

---

### I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome do Paciente:

Documento de Identidade nº:

Sexo: ( ) M ( ) F

Data de Nascimento: / /

Endereço:

Bairro:

Cidade:

CEP:

Telefone:

---

### II - DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa: "Monitorização ambiental e biológica da exposição aos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs)"

2. Pesquisador: Patrícia Miranda de Faria

3. Cargo/Função: Aluna Regular do Curso de pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas - nível Doutorado

4. Departamento da FCF/USP: Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

5. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

Sem Risco ( X )      Risco Mínimo ( )      Risco Médio ( )

Risco Baixo ( )      Risco Maior ( )

(Probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo. Nos projetos com coleta de sangue, incluir detalhadamente, como observação as possíveis reações decorrentes desse procedimento).

Duração da Pesquisa: 1 a 2 anos

---

**III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:**

**1. Justificativa e os objetivos da pesquisa; 2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos; incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais; 3. Desconfortos e riscos esperados; 4. Benefícios que poderão ser obtidos; 5. procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo.**

1. O conhecimento adequado dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs), presentes em muitos ambientes de trabalho, justifica plenamente a realização de uma monitorização das atmosferas destes ambientes por meio da determinação do pireno e a monitorização biológica dos trabalhadores expostos a estas substâncias. Os metabólitos dos PAHs e seus conjugados são principalmente eliminados pela urina, entre estes metabólitos pode ser citado o 1-hidroxipireno (1-HP), um metabólito do pireno, sugerido por JONGENELEN *et al.* (1986), como um marcador biológico de exposição aos PAHs e desde então muito utilizado. Desta forma, é apresentado um esquema de estudo e medida da exposição aos PAHs por meio de uma avaliação ambiental do pireno e avaliação biológica do 1-HP, que devem favorecer o recolhimento de informações e o confronto entre os dados obtidos em diferentes atividades de trabalho e por fim definir um plano de amostragem adequado para a implantação da monitorização ambiental e biológica na exposição aos PAHs. 2. Aplicação de um questionário estruturado (em anexo) para avaliar hábitos alimentares, de moradia, saúde e de trabalho, seguido por uma coleta supervisionada de ar pessoal e amostra de urina. Procedimentos analíticos para a determinação do pireno em amostras ambientais e determinação do 1-HP em amostras de urina. 3. Eventual desconforto na coleta de urina com sensação de invasão da privacidade por parte do trabalhador. 4. Avaliação da urina dos trabalhadores e auxílio na estruturação de programas de prevenção se necessários. 5. Informações e orientação para os trabalhadores e encaminhamento para tratamento se necessário.

---

**IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA**

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. Salvaguardam da confidencialidade, sigilo e privacidade.

---

**V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.**

Patrícia Miranda de Faria  
Avenida Lineu Prestes no. 580 Bloco 13-B - Cidade Universitária  
CEP 05508-900 - São Paulo - SP  
Tel. (0xx11) 3091-2197.  
E-mail: [pmfaria@usp.br](mailto:pmfaria@usp.br)

---

**VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:**

---

**VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO**

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

Assinatura do sujeito da pesquisa

---

Assinatura do pesquisador

Patrícia Miranda de Faria

<b>QUESTIONÁRIO</b>
---------------------

Data da coleta:

Hora da coleta:

Volume de urina coletada:

Densidade da urina:

---

**INFORMAÇÕES SOBRE O TRABALHO**

---

Quantas horas trabalha por dia? 6 ( ) 8 ( ) 12 ( ) Outros:

Em que setor (área, local) trabalha?

Tem outro emprego ou bico? Sim ( ) Não ( ) Qual?

Tem contato com alguma(s) substância(s) química(s) de seu conhecimento? S ( ) N ( )

Qual(is)?

Há quanto tempo trabalha na usina?

Qual a profissão anterior?

Usa equipamento de proteção individual? Sim ( ) Não ( ) As vezes ( )

Qual(is)?

---

**HÁBITOS PESSOAIS E DIETA**

---

Você é fumante? Sim ( ) Não ( ) As vezes ( )

Quantos cigarros fuma por dia?

Há quantos anos fuma?

Fuma no local de trabalho? Sim ( ) Não ( ) As vezes ( )

Qual o tempo entre o último cigarro e a hora da coleta da urina?

Você costuma beber:

Suco de fruta artificial?

Refrigerante?

Cerveja?

Café?

Pinga?

Chá?

Vinho?

Qual o tempo decorrido entre a ingestão de alguma(s) dessa(s) bebida(s) e a hora da coleta da amostra?

Número de vezes na semana que se alimenta de:

Carne

Arroz

Aves

Feijão

Peixes

Legumes

Hortaliças

Frutas

Outros ( descrever )

Tipo de água utilizada na residência: Filtrada ( ) Mineral ( ) Torneira ( )

Você poderia citar quais os alimentos e bebidas ingeridos na última refeição?

Qual o tempo decorrido entre a última refeição e a coleta da amostra?

Você tem o hábito de mexer com tintas, vernizes, solventes em sua casa? Sim ( ) Não ( )

Com que frequência?

### CONDIÇÕES AMBIENTAIS DO BAIRRO ONDE MORA:

Há muito tráfego de veículos?

Sim, somente de dia ( ) Moderadamente ( )

Sim, noite e dia ( ) Não ( )

Tipo de veículo que mais trafega?

Ônibus ( ) Carros ( ) Caminhões ( )

Mora em zona urbana ( ) ou rural ( )?

Tem fábrica(s), indústria(s), próximas ao local onde você mora? Sim ( ) Não ( )

Qual(is)?

Sabe informar o nome das mais importantes?

### INFORMAÇÕES SOBRE SUA SAÚDE

Sim Não Não sei Qual?

Você tem problema de pressão?

Tem alguma doença no coração?

Tem ou já teve algum problema renal (aparelho urinário)?

Você já teve hepatite, cirrose ou algum problema no fígado?

Tem dor de cabeça? Com que frequência?

Você é diabético?

Você já desmaiou? Por quê?

Toma algum medicamento?

Você dorme bem? Quantas horas por dia?

Você tem dificuldade para lembrar das coisas? Se concentrar?

Você se cansa fácil, com pouco esforço físico?

Tem algum outro problema de saúde? O que sente? \*

Observações: