

**“Avaliação da Contaminação Humana por Hidrocarbonetos
Policíclicos Aromáticos (PAHS): 1-Hidroxi pireno Urinário”**

POR

ALCILÉA DE FÁTIMA COSTA

Dissertação de Mestrado em Saúde Pública, Centro de
Estudos de Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana da Fundação
Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública

Orientador: Josino Costa Moreira

Co-Orientador: André Luís Albert Mazzei

Rio de Janeiro, Julho de 2001.

Esta dissertação, intitulada

**“Avaliação da Contaminação Humana por Hidrocarbonetos
Policíclicos Aromáticos (PAHS): 1-Hidroxipireno Urinário”**

apresentada por

Alciléa de Fátima Costa

foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:

Dr. João Paulo Machado Torres

Dr.^a Marta Mayumi Higarashi

Dr. Josino Costa Moreira (Orientador)

FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, Alciléa de Fátima

Avaliação da contaminação humana a Hidrocarbonetos
PolicíclicosAromáticos (PAHs): determinação 1-hidroxipireno urinário,com os
trabalhadores do CESTEH/FIOCRUZ

xviii, 81 p il.

Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública.

1. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
2. PAHs
3. CLAE
4. Contaminação humana

I. Escola Nacional de Saúde Pública, Brasil. II. Título

Tese realizada na Escola Nacional de Saúde Pública da Fundação Oswaldo Cruz, no Centro de Saúde do Trabalhador, sob orientação de Josino Costa Moreira.

Ao meu marido, Marcos Curty, amigo certo nas horas incertas; me fez acreditar que tudo poderia dar certo.

À Mirtes minha grande amiga. Às
amigas recentes que se fazem presentes
como amigas de longa data Lucineide, Suely
e Martinha, obrigada pela compreensão e
carinho .

AGRADECIMENTOS

Para a conclusão deste trabalho, a valiosa ajuda de várias pessoas, de diversas formas, foi fundamental e eu não poderia deixar de registrar os meus sinceros agradecimentos:

A Deus, por ser fonte de luz e força durante toda essa caminhada.

Aos amigos Sueli e Sérgio , pela acolhida tão calorosa em sua casa.

A minha mãe, pelo seu carinho e suas preces, que sempre me ajudam a vencer os desafios.

Aos meus familiares pelo apoio e estímulo.

Ao Marcos Curty pelo incentivo, compreensão, e por seu apoio incondicional durante a conclusão deste trabalho.

Ao meu orientador Josino Costa Moreira, pelo incentivo, apoio e competência na orientação.

Ao André Mazzei, por sua dedicação, incentivo e colaboração inestimável.

As amigas Mirtes, Marta, Lucineide que me incentivaram e deram força para que eu prosseguisse, cujo carinho e amizade foram muito importantes.

A Paula , pela sua colaboração e apoio durante a execução deste trabalho, cujo carinho e dedicação foram de suma importância para o enriquecimento deste trabalho.

Aos amigos do CESTEH, que colaboraram de forma indireta ou direta para a execução deste trabalho, especialmente Armando, Lú, Sueli, Mário, Sérgio, Ana Cristina, Allan, Regina, Marquinho, Cléber, Fátima Costa, Flávia, Perpétua, Luís Alberto, Fátima Moreira, Jefferson, Fátima Pivetta, Cláudia Rejane, Elaine, Vanilda, Rita, Jorge Machado.

Aos amigos Lú e Allan, que sempre estiveram presente de maneira prestativa , sendo importantíssimos para execução deste trabalho.

Aos amigos do INCQS, pela contibuição indispensável ao meu trabalho, especialmente Mariete, Virgínia, Elisa e Silvânia.

Aos amigos do CESTEH, que gentilmente colaboraram com esta pesquisa.

Aos funcionários da Secretaria Acadêmica, pelas informações prestadas e pelo apoio a este trabalho.

A Maria Helena Machado, pelo apoio e compreensão.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra, contribuíram para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	página
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1- INTRODUÇÃO	1
1.1 - ASPECTOS HISTÓRICOS	5
1.2 - PRINCIPAIS FONTES EMISSORAS	9
1.3 - PAHs X MEIO AMBIENTE	13
1.4 - PAHs X SAÚDE PÚBLICA	14
1.5 - METABOLISMO DOS PAHs E DE SEUS DERIVADOS NITRADOS	18
1.6 - REATIVIDADE COM MACROMOLÉCULAS BIOLÓGICAS	19
1,7 - MONITORAMENTO BIOLÓGICO	23
1.8 – 1-OHP COMO BIOINDICADOR	24
1.9 - OBJETIVOS	25
2 – CARACTERÍSTICAS DO PIRENO	26
2.1 – CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS	26
2.2 – CARACTERÍSTICAS TOXICOLÓGICAS	27
3 – EXPOSIÇÃO AO TABACO	28
4 – MATERIAIS E MÉTODOS	31

4.1 - AMOSTRAGEM	31
4.1.1 – COLETA DA AMOSTRA	31
4.1.2 – CUIDADOS COM A COLETA E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRA	32
4.2 – CARACTERÍSTICAS DO GRUPO ESTUDADO	32
4.3 – REAGENTES E SOLUÇÕES	34
4.4 - VIDRARIA	35
4.5 - EQUIPAMENTOS	36
4.6 – LIMPEZA DA VIDRARIA	37
4.7 – LIMPEZA DAS SERINGAS CROMATOGRÁFICAS	37
4.8 - MÉTODOS	38
4.8.1 – DESCRIÇÃO DA COLUNA CROMATOGRÁFICA	38
4.8.2 – CONDIÇÕES ANALÍTICAS DESCRITA	39
4.9 – DETERMINAÇÃO DE 1-OHP URINÁRIO	40
4.9.1 – PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA A DETERMINAÇÃO DE 1-OHP	40
4.9.2 – APLICAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO 1OHP NAS AMOSTRAS DE URINA	41
4.9.3 – ANÁLISE DE INFORMAÇÕES GERAIS DE HÁBITOS DE VIDA DOS TRABALHADORES	43
4.9.4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	43
4.10 – PARÂMETROS DE PERFORMANCE ANALÍTICA	44
4.11 – ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE URINA	47

5 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 – PARÂMETROS DA METODOLOGIA ANALÍTICA	48
5.1.1 - ESPECIFICIDADE	48
5.1.2 – LINEARIDADE DE RESPOSTA DO DETECTOR DE FLUORESCÊNCIA	51
5.1.3 - EXATIDÃO	54
5.1.4 - PRECISÃO	58
6 – AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS	59
6.1 – TEOR DE 1-OHP EM URINA DE NÃO FUMANTES	59
6.2 – TEOR DE 1-OHP EM URINA DE FUMANTES	60
6.3 – CARACTERÍSTICA DA POPULAÇÃO	61
7 - CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

LISTA DE TABELAS

		página
Tabela 1 -	Propriedades carcinogênicas e mutagênicas de alguns HPAs	2
Tabela 2	Constantes físico-químicas de alguns HPAs.	3
Tabela 3	Nomes e abreviaturas dos HPAs indicados pela EPA.	6
Tabela 4	Inventário das emissões de HPAs na Inglaterra em 1993.	9
Tabela 5	Emissões de HPAs nos EUA, Suécia e Noruega (toneladas por ano).	10
Tabela 6	Concentrações médias e faixas de concentração (ng/m ³) de diversos HPAs medidos em 4 cidades da Inglaterra entre 1991 e 1992.	12
Tabela 7	Concentração (ng/m ³) de HPAs e CE no Rio de Janeiro	17
Tabela 8	Razão HPAs/CE (n=12 para cada período)	17
Tabela 9	Excreção urinária de 1-OHP na população em geral	29
Tabela 10	Excreção urinária de 1-OHP em trabalhadores expostos ao PAHs	30
Tabela 11	Consumo diário de cigarros dos trabalhadores do sexo masculino do CESTEH..	33
Tabela 12	Consumo diário de cigarros dos trabalhadores do sexo feminino do CESTEH..	33
Tabela 13	Retenção relativa para a substância de interesse	49
Tabela 14	Avaliação da repetibilidade dos tempos de retenção em diferentes injeções consecutivas de amostras fortificadas	51

Tabela 15	Comparação entre os Coeficientes de Variação Relativos (CV%) obtidos nos diferentes níveis de fortificações	58
Tabela 16	Concentração de 1-OHP em amostras de urina de não fumantes	59
Tabela 17	Concentração de 1-OHP em amostras de urina de fumantes	60
Tabela 18	Atividade dos voluntários do CESTE H	61
Tabela 19	Correlações com 1-hidroxipireno por grama de creatinina	65
Tabela 20	Distância do ponto de ônibus em metros	67
Tabela 21	Número de linhas de ônibus	67

LISTA DE FIGURAS

		página
Figura 1	Estruturas dos HPAs indicados pela EPA para monitoramento ambiental	8
Figura 2	Ativação do BaP e formação de adutos com macromoléculas	22
Figura 3	Esquema de tratamento das amostras para a determinação de 1-OHP	42
Figura 4	Cromatograma referente a injeção de 20 μ L de: A) branco de reagente B) branco da matriz de urina	50
Figura 5	Cromatograma referente a injeção de 20 μ L de: A) branco da matriz de urina B) amostra fortificada	52
Figura 6	Curva de linearidade de resposta do detector de fluorescência para a substância de interesse	53
Figura 7	Relação entre “concentração adicionada” e “concentração adicionada”, para 1-OHP	55
Figura 8	Recuperação do método, obtida pela amostra fortificada, submetida ao processo analítico	56
Figura 9	Cromatograma referente a injeção de 20 μ L da amostra real	57
Figura 10	Números de pessoas versus setor que o voluntário trabalha	62
Figura 11	Porcentagem de voluntários por zona residencial	64
Figura 12	Correlação nível de 1-OHP versus distância do ponto de ônibus	66

LISTA DE ABREVIATURAS USADAS

Abreviatura	Significado
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
1-OHP	- 1-hidroxipireno
MPA	- material particulado atmosférico
NHPA	- derivados nitrados de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
OHPA	- derivados oxigenados de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
POP	- poluentes orgânicos persistentes

RESUMO

O metabólito 1-hidroxi-pireno foi determinado em amostras biológicas (urina) em trabalhadores do CESTE/ FIOCRUZ, fumantes e não fumantes.

As amostras foram coletadas no final do expediente, no período de fevereiro a março de 2001, sofreram hidrólise enzimática com a enzima β -D-glucoronidase/arilsulfatase (100.000 Fishman U/mL e 800.000 Roy U/mL), limpeza (clean-up) por extração em fase sólida (Sep – Pak Vac 6cc (1g) C-18) e foram analisadas por CLAE com detector de fluorescência.

Concentrações de 1-OHP entre 0,104 e 0,289 μ g/g de creatinina foram encontradas em amostras de fumantes. Perfis bem abaixo foram encontradas em não fumantes, entre 0,002 e 0,020 μ g/g de creatinina.

A presença de 1-OHP em algumas amostras de não fumantes foi atribuída a exposição ambiental, ativação metabólica, suscetibilidade individual, estado de saúde, nutrição, idade, variações fisiológicas provavelmente do tecido adiposo do corpo, intensidade de inspirar, o pH da urina, variações genéticas e atividade enzimática.

Amostras de urina de fumantes que não apresentaram níveis de 1-OHP, foi atribuída a fatores específicos individuais como variações fisiológicas, intensidade de inspirar, o pH da urina, variações genéticas e atividade enzimática, suscetibilidade individual e outros fatores, tais como gênero, etnia, idade, estado de saúde, nutrição e poliformismo genético.

A identificação e quantificação de 1-OHP em fumantes e não fumantes são inéditos no Brasil.

ABSTRACT

The metabolite 1-hydroxipireno was determined in biological samples (urine) in workers of CESTE/Fluorocruz, smokers and non smokers.

The samples were collected in the end of the shift, from February to March of 2001. Samples were submitted to enzymatic hydrolysis (β -D-glucuronidase/arylsulfatase 100,000 U/mL and 800,000 U/mL), and cleaning (clean-up) by extraction solid phase (Sep – Pak Vac 6cc C-18). After that, samples were analyzed by HPLC with fluorescence detector.

Concentrations of 1-OHP between 0,104 and 0,289 μ g/g creatinine were found in smokers' samples. Quite lower concentrations were found in non smokers, between 0,002 and 0,020 μ g/g of creatinine.

The presence of 1-OHP in some “non smokers” samples and its absence in others “smokers” samples can be explained by the environmental exposition, metabolic activation, individual susceptibility, health condition, nutrition, age, physiologic variations probably of the fatty acid composition of the body, intensity of inspiration, the pH of the urine, genetic variations and enzymatic activity.

The identification and quantification of 1-OHP in smokers and non smokers are unpublished in Brazil.

1 - INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são, por definição, compostos binários formados por carbono e hidrogênio com estrutura que consiste de pelo menos 2 anéis aromáticos, de 5 ou 6 átomos de carbono, condensados. Os HPAs podem apresentar estruturas similares que apresentam heteroátomos associados em sua estrutura, em amostras de origem ambiental como os derivados nitrados (NHPAs) e os oxigenados (OHPAs)

São poluentes orgânicos de grande persistência (POP) ambiental, e muitos deles e/ou seus derivados são potencialmente carcinogênicos e ou/ mutagênicos, pois precisam de ativação prévia das enzimas do P450. Dados sobre a carcinogenicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de alguns HPAs e seus derivados encontram – se na **Tabela 1**.

As propriedades químicas e físico-químicas dos HPAs são, em grande parte, determinadas por seus sistemas de duplas conjugados, que variam com o número de anéis e portanto, com suas massas moleculares. Os valores de algumas constantes físico-químicas relevantes para a compreensão do comportamento ambiental e toxicológico destes compostos, são apresentadas na **Tabela 2**.

Tabela 1: Carcinogenicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de alguns HPA.

(Bouchez et al., 1996 a partir de dados do IARC, 1986)

<i>PAH</i>	<i>Carcinogenicidade</i>	<i>Genotoxicidade</i>	<i>Mutagenicidade</i>
Fluoreno	I	L	-
Fenantreno	I	L	+
Antraceno	N	N	-
Fluoranteno	N	L	+
Pireno	N	L	+
Benzofluorenos	I	I	?
Benzofluorantenos	S	I	+
Ciclopenta(cd)pireno	L	S	+
Benzo(a)antraceno	S	S	+
Criseno	L	L	+
Trifenileno	I	I	+
Benzo(e)pireno	I	L	+
Benzo(a)pireno	S	S	+
Perileno	I	I	+
Indeno(1,2,3-cd)pireno	S	I	+
Dibenzo(ac)antraceno	L	S	+
Dibenzo(ah)antraceno	S	S	+
Dibenzo(aj)antraceno	L	I	+
Benzo(ghi)perileno	I	I	+
Antantreno	L	I	+
Coroneno	I	I	+
Dibenzo(ae)fluoranteno	L	N	
Dibenzopireno	S	I	+
2-nitronaftaleno	N	L	-
1-nitropireno	I	S	+
Dinitropireno			+

S = suficientes; I = insuficientes; L = limitados; N = não carcinogênico. Genotoxicidade foi avaliada através dos testes de deterioração do DNA; aberração cromossômica e mutagenicidade. Mutagenicidade (teste de Ames): + (positivo), - (negativo).

Tabela 2: Constantes físico-químicas de alguns HPAs.

PAHs	Peso Molecular (u.m.a.)	Ponto de Fusão (°C)	Ponto de Ebulição (°C)	de Pressão de Vapor a 25°C	de Coeficiente de partição de octanol/água (log Kow)	Solubilidade em água 25°C (ug/L)	Constante de Henry a 25°C (kPa)
Naftaleno	128,17	81	217,9	10,4	3,4	$3,17 \cdot 10^4$	$4,89 \cdot 10^{-2}$
Acenaftileno	152,20	92-93		$8,9 \cdot 10^{-1}$	4,07		$1,14 \cdot 10^{-3}$
Acenafteno	154,21	95	279	$2,9 \cdot 10^{-1}$	3,92	$3,93 \cdot 10^3$	$1,48 \cdot 10^{-2}$
Fluoreno	166,22	115-116	295	$8,0 \cdot 10^{-2}$	4,18	$1,98 \cdot 10^3$	$1,01 \cdot 10^{-2}$
Antraceno	178,23	216,4	342	$8,0 \cdot 10^{-4}$	4,5	73	$7,3 \cdot 10^{-2}$
Fenantreno	178,23	100,5	340	$1,6 \cdot 10^{-2}$	4,6	$1,29 \cdot 10^3$	$3,98 \cdot 10^{-3}$
Fluoranteno	202,26	108,8	375	$1,2 \cdot 10^{-3}$	5,22	260	$6,5 \cdot 10^{-4}$
Pireno	202,26	150,4	393	$6,0 \cdot 10^{-4}$	5,18	135	$1,1 \cdot 10^{-3}$
Benzo(a)antraceno	228,29	160,7	400	$2,8 \cdot 10^{-5}$	5,61	14	
Criseno	228,29	253,8	448	$8,4 \cdot 10^{-5}$	5,91	2,0	
Benzo(a)fluoranteno	252,32	168,3	481	$6,7 \cdot 10^{-5}$	6,12	1,2 (20°C)	$5,1 \cdot 10^{-5}$
Benzo(j)fluoranteno	252,32	165,4	480	$2,0 \cdot 10^{-6}$	6,12	2,5 (20°C)	
Benzo(k)fluoranteno	252,32	215,7	480	$1,3 \cdot 10^{-7}$	6,84	0,76	$4,4 \cdot 10^{-5}$
Benzo(a)pireno	252,32	178,1	496	$7,3 \cdot 10^{-7}$	6,50	3,8	$3,4 \cdot 10^{-5}$ (20°C)
Benzo(e)pireno	252,32	178,7	493	$7,4 \cdot 10^{-7}$	6,44	5,07 (23°C)	
Perileno	252,32	277,5	503		5,3	0,4	
Benzo(g,h,i)perileno	276,34	278,3	545	$1,4 \cdot 10^{-8}$	7,10	0,26	$2,7 \cdot 10^{-5}$ (20°C)
Indeno(1,2,3-c,d)pireno	276,34	163,6	536	$1,3 \cdot 10^{-8}$ (20°C)	6,58	62	$2,9 \cdot 10^{-5}$ (20°C)
Dibenzo(a,h)antraceno	278,35	266,6	524	$1,3 \cdot 10^{-8}$ (20°C)	6,50	0,5 (27°C)	$7 \cdot 10^{-6}$
Coroneno	300,36	439	525	$2,0 \cdot 10^{-10}$		5,4	0,14

Fonte: IPCS, 1998

A partir dos dados mostrados na **Tabela 2**, pode-se observar algumas características gerais dos HPAs: são sólidos à temperatura ambiente, tem altos pontos de ebulição e fusão, baixa solubilidade em água; são solúveis em solventes orgânicos e altamente lipofílicos; suas afinidades por fases orgânicas, lipofílicas, expressas através do coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), são elevadas (entre 3,4 a 7,1) estes elevados coeficientes de partição indicam que podem ser absorvidos através de diversos tecidos biológicos, como por exemplo a pele (Netto, 1999).

A solubilidade em água diminui com o aumento do tamanho da molécula e, com exceção do naftaleno, que é relativamente solúvel (32mg/L), os PAHs têm baixa solubilidade em água. Seus coeficientes de partição entre carbono orgânico e água (K_{ow}) também são elevados e, como resultado, em sistemas aquosos, HPA tendem a concentrar-se em sedimentos ou ficam associados à matéria orgânica em suspensão.

A pressão de vapor e a constante de Henry também diminuem com o aumento do peso molecular. Como reflexo destes fatos, HPAs de 2 ou 3 anéis tendem a concentrar-se na fase gasosa do ar, HPAs com 4 anéis distribuem-se entre as fases do ar e HPA com 5 anéis ou mais concentram-se principalmente no material particulado atmosférico.

HPAs são compostos relativamente inertes e suas reações mais comuns são as reações de substituição ou de adição eletrofílica. Como as reações de adição destroem a aromaticidade do sistema conjugado, diminuindo a estabilidade da molécula, elas são, muitas vezes, seguidas por reações de eliminação, que regeneram o sistema aromático e dão origem a um produto final de substituição.

1.1 - Aspectos Históricos

Pode – se considerar como o início da química dos HPA o isolamento do benzo(a)pireno (BaP) do carvão, em 1931 e, subsequentemente, a sua síntese no mesmo ano. A sua identificação como uma nova substância química, em 1933, permitiu demonstrar que o BaP é um forte agente cancerígeno em animais (Finlayson-Pitts, 1986).

As primeiras provas dos riscos ocupacionais e ambientais dos HPA foram obtidas em 1922 pela demonstração de que extratos orgânicos de fuligem eram cancerígenos em animais (Passey, 1922) e, também pela atividade cancerígena do extrato de material particulado ambiental (Leiter, 1943). Posteriormente, a atividade biológica foi também observada em extratos de material particulado ambiental coletado do “smog” fotoquímico de Los Angeles (Waller, 1952).

O BaP foi identificado em fuligem doméstica e posteriormente em material particulado ambiental. Em 1970 o BaP (e outros HPAs) foi caracterizado como um agente cancerígeno de distribuição mundial, em ambientes respiráveis, e como constituinte de aerossóis urbanos (Finlayson-Pitts, 1986).

Nos anos 70 foi reconhecido o excesso de carcinogenicidade dos extratos de partículas atmosféricas até então atribuído ao BaP e demonstrado que a atividade cancerígena não é somente devida a esta substância mas, também, à presença de outras substâncias orgânicas ainda desconhecidas. Estas estão presentes, também, no material orgânico policíclico (MPO) de fontes de emissão primárias (Finlayson-Pitts, 1986; Pitts Jr., 1978).

Também nos anos 70 foi introduzido um método muito sensível e eficaz para a determinação da mutagenicidade de substâncias químicas, por meio de bactérias do gênero *Salmonella* que ficaria conhecido como ensaio de mutagenicidade ou “Teste de Ames - *Salmonella*” em homenagem a seus autores (Ames et al., 1975).

A partir desta época muita atenção tem sido dada a avaliação de HPAs em matrizes ambientais e biológicas.

Os principais HPAs recomendados pela EPA para o monitoramento biológico são mostrados na **Figura 1** e seus respectivos nomes e abreviaturas estão listados na **Tabela 3**.

Tabela 3: Nomes e abreviaturas dos HPAs indicados pela EPA.

A numeração dos compostos corresponde à Fig.3.

Número	Nome	Abreviatura
1	Naftaleno	N
2	Antraceno	A
3	Pireno	Pi
4	Criseno	Cri
5	Fenantreno	Fe
6	Benzo[a]pireno	BaP
7	Dibenzo[a,h]antraceno	DiBahA
8	Benzo[a]antraceno	BaA
9	Benzo[g,h,i]perileno	BgP
10	Acenafteno	Ac
11	Acenaftileno	Ace
12	Fluoreno	Fl
13	Fluoranteno	Fluo
14	Benzo[k]fluoranteno	BkFluo
15	Benzo[b]fluoranteno	BbFluo
16	Indeno[1,2,3-c,d]pireno	IndP

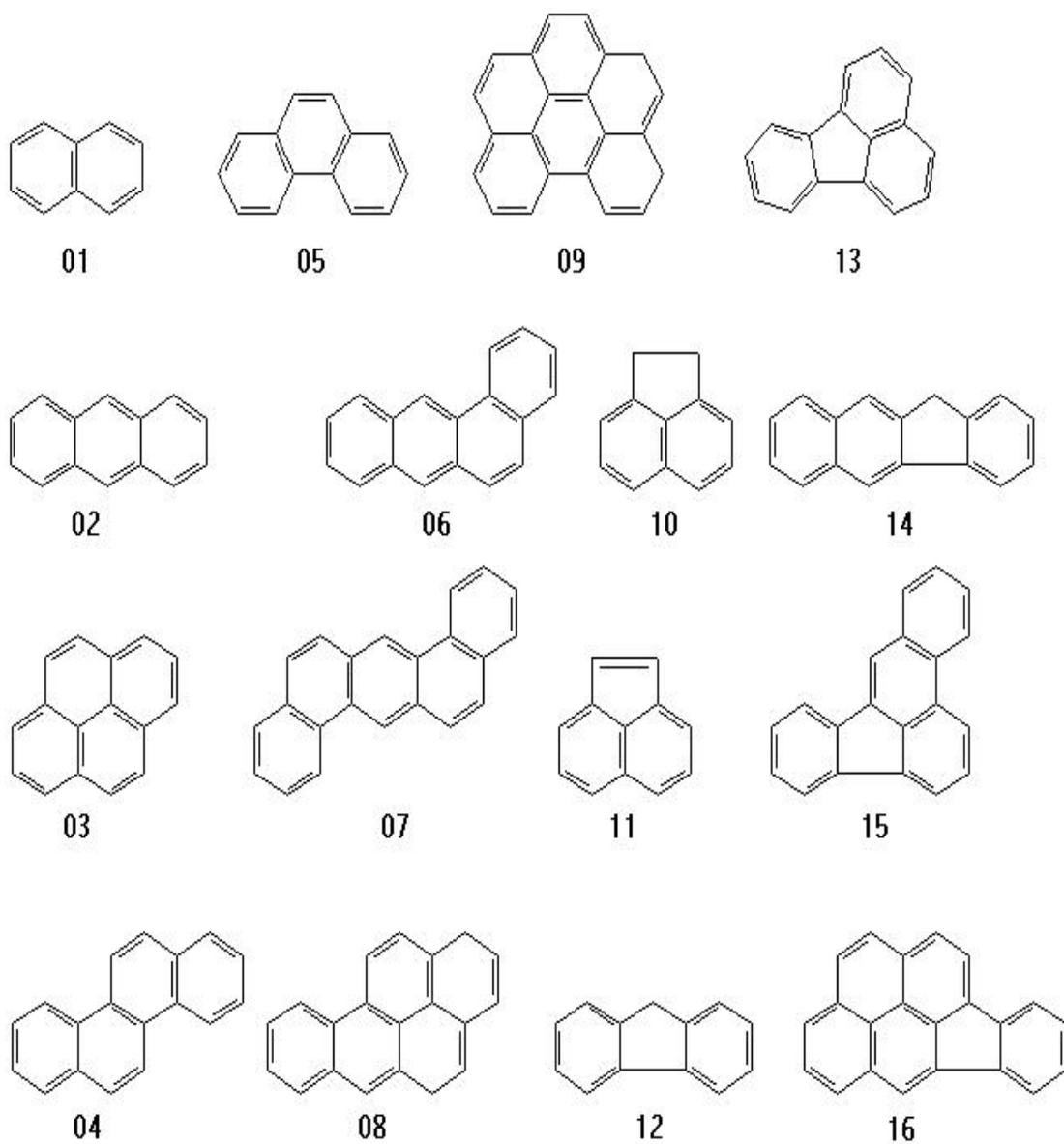


Figura 1: Estrutura química dos HPAs indicados pela EPA para monitoramento ambiental

1.2 - Principais Fontes Emissoras

Os HPAs são emitidos por fontes naturais e antropogênicas. A contribuição das fontes naturais é muito limitada restringindo-se, praticamente, à queima espontânea de florestas e emissões vulcânicas. As fontes antropogênicas representam o principal processo de produção de HPAs (Lee et al. 1981).

A queima de combustíveis como petróleo e seus derivados, carvão, madeira, gás de carvão etc; produz HPAs e muitos outros poluentes atmosféricos. A quantidade e os tipos de HPAs formados dependem das condições específicas do processo e do tipo de combustível, sendo que processos mais eficientes emitem menores quantidades de HPAs. A fumaça de cigarro, queimadas e calefação (especialmente em países de clima temperado) são importantes fontes de HPAs e derivados (Lopes et al. 1996).

Os HPAs são oriundos também de fontes tecnológicas que podem ser móveis ou estacionárias. Entre as fontes móveis, destaca-se o motor de combustão interna como o principal emissor destas substâncias para o ambiente. Este tipo de motor é o mais comum em diversos veículos de transporte de cargas e passageiros. As fontes estacionárias são subdivididas entre as utilizadas na geração de energia elétrica e calor e aquelas ligadas à atividade industrial (e.g., produção de alumínio) e de incineração (principalmente de rejeitos químicos) e podem emitir uma grande variedade de produtos de combustão incompleta (Netto et al. 1999).

As fontes veiculares de emissão têm uma grande importância devido à complexidade e quantidade, cada vez maior, de material que é lançado na atmosfera. O material particulado emitido por veículos a diesel, por exemplo, é constituído principalmente de carbono elementar que atua como superfície de condensação de HPAs e de outros compostos aromáticos.

A **Tabela 4** apresenta uma estimativa da emissão de HPAs para a atmosfera por diversas fontes na Inglaterra em 1993 (APARG, 1995). Como se pode ver, a combustão doméstica de carvão e madeira e a emissão por veículos automotores são bastante importantes.

Tabela 4: Inventário das emissões de HPAs na Inglaterra em 1993 (TOMPS, 1995).

Processo	Emissão estimada de HPAs		
	Toneladas	% min [#]	% max ^{\$}
Queima de carvão residencial	110 – 280	29,41	20,28
Produção de alumínio	100 [*]	26,74	7,24
Emissão veicular	50 – 470	13,37	34,04
Plantas de Produção de coque (coqueiras)	47 – 90	12,57	6,52
Queima doméstica de madeira	26 – 320	6,95	23,18
Queima de pneus usados	23 [*]	6,15	1,67
Fogos naturais	8 [*]	2,14	0,58
Unidades de sinterização	4,6 [*]	1,23	0,33
Queima de palha de plantação de cereais	4 – 10	1,07	0,72
Produção de energia (por queima de óleo)	0,8	0,21	0,06
Produção de energia (por queima de carvão)	0,2 – 9	0,05	0,65
Queima de madeira por indústrias	0,2 – 65	0,05	4,71
Produção de betume	0,13 [*]	0,03	0,01
Gases emitidos em resíduos domésticos	0,06 – 0,08		0,01
Incineração de resíduos sólidos domésticos	0,05 – 0,7	0,01	0,05
Fornos elétricos (produção de aço e ferro)	0,03- 4	0,01	0,29
Queima de carvão industrial e comercial	0,01 – 0,7	0,00	0,05
Incineração de resíduos químicos	0,005 – 0,07	0,00	0,01
Incineração de resíduos hospitalares	0,004 – 0,06	0,00	0,00
Incineração de lama de tratamento de esgoto	0,001 – 0,02	0,00	0,00
Crematórios	s.d.	s.d.	s.d.
Industria química	s.d.	s.d.	s.d.
Produção de cimento, cerâmicas e tijolos	s.d.	s.d.	s.d.
Produção de metais não ferrosos (*exclui alumínio)	s.d.	s.d.	s.d.
Queima de resíduos de óleo	s.d.	s.d.	s.d.
Regeneração de carvão ativos	s.d.	s.d.	s.d.
Total	380-1400	380	1400

(*) – baseado em apenas uma estimativa

(#) – percentagem calculada a partir dos valores mínimos

(\$) – percentagem calculada a partir dos valores máximos

s.d. – sem dados disponíveis.

Tabela 5: Emissões de HPAs nos EUA, Suécia e Noruega (toneladas/ano).

Adaptada a partir dos dados compilados por Baek et al. (1991)

Estimativas para os EUA realizadas por 2 autores diferentes.

FONTE	Emissão de HPA (ton/ano)			
	EUA	EUA	Suécia	Noruega
	1981	1983	1983	1983
Aquecimento residencial	3956 (36%)	1380 (16%)	132 (26%)	63 (21%)
Processos industriais	640 (6%)	3497 (41%)	312 (62%)	203 (69%)
Incineração	56 (1%)	50 (1%)	2 (1%)	1 (0%)
Fogos em áreas abertas	4025 (36%)	1100 (13%)	2 (1%)	1 (2%)
Geração de energia	88 (1%)	401 (5%)	7 (1%)	1 (0%)
Fontes móveis	2266 (21%)	2170 (25%)	47 (9%)	20 (7%)
Total	11031	8598	502	294

A **Tabela 5**, compilada por Baek et al. (1991) apresenta estimativas da emissão de HPAs na Suécia, na Noruega e nos EUA (1981 e 1983). Como se pode verificar, há acentuada discrepância nas estimativas de emissão de HPAs para os EUA e o intervalo de 2 anos não pode ser considerado responsável pela diferença dos valores. Os fatores responsáveis por esta diferença podem estar relacionadas às características das próprias metodologias empregadas e também à qualidade e quantidade de dados disponíveis para a estimativa da emissão pois estas sofrem variações sazonais e de longo tempo, além do que diferenças de características de micro regiões (bairros ou áreas de uma cidade) que também as afetam (Baek et al. 1991).

Esta diferença pode ser ilustrada pelas concentrações de HPAs medidas em 1991 e 1992 em algumas cidades da Inglaterra (**Tabela 6**) onde, embora os perfis observados de HPAs fossem os mesmos, suas concentrações eram diferentes nos diversos locais (APARG, 1995).

No Brasil não existe ainda uma base de dados que permita estimar as quantidades e as fontes de HPAs lançados na atmosfera.

Os NPAHs também são emitidos diretamente por diversas fontes de combustão. Já foram identificados em material coletado de emissão de motor a diesel e a gasolina, em fumaça de cigarro e madeira. Também, foram encontrados em toner de fotocopiadoras, negro de carbono e em material particulado de atmosferas urbanas (White et al. 1985 ; Moreira et al. 1995).

Tabela 6: Concentrações médias e faixas de concentração de (ng/m³) de diversos HPAs medidos em 4 cidades da Inglaterra entre 1991 e 1992.

HPAs	Londres		Stevenage(*)		Manchester		Cardiff	
	média	faixa	média	faixa	média	faixa	média	faixa
Ace	3,4	0,79-23	2,59	0,2-14	2,55	0,05-30	2,86	0,16-31
Fl	23	3,4-161	17	5,3-86	21	0,07-111	13	0,28-117
Fe	79	9,0-492	41	8,5-196	46	2,2-173	24	2,25-174
A	5,9	0,8-40	3,65	0,65-14	3,7	n.d.-22	2,28	n.d.-22
Fluo(#)	10,4	2,3-6,2	6,7	2,03-24	13	0,93-76	9,70	0,16-80
Pi	9,5	2,1-64	5,61	1,42-21	8,9	1,7-49	6,14	0,33-52
BaA	1,31	0,16-19	1,11	0,14-10,2	1,68	0,12-12	1,28	n.d.-13
Cri	2,27	0,41-24	1,88	0,31-14	2,18	0,13-10,3	2,10	n.d.-24
BbFluo	1,4	0,31-15	1,24	0,2-8,99	1,3	0,13-7,7	1,60	n.d.-13
D[ac]A(%)	0,34	n.d.-5,0	0,39	n.d.-4,65	1,51	0,21-8,2	1,62	n.d.-15
BkFluo	1,4	0,23-17	1,3	0,15-1,05				
BaP	0,81	n.d.-10,2	0,64	n.d.-5,2	1,51	0,18-13	1,16	n.d.-14
BgP	4,87	0,4-85	3,7	0,15-60	2,14	0,36-16	1,60	n.d.-16
Cor	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0,95	0,17-69	0,60	n.d.-6,92
Total	143		87		106		78	

(#) coeluído com metil-fenantrenos na análise das amostras de Cardiff e Manchester

(%) coeluído com BbFluo na análise das amostras de Cardiff e Manchester

(*) amostras coletadas somente até abril de 1992

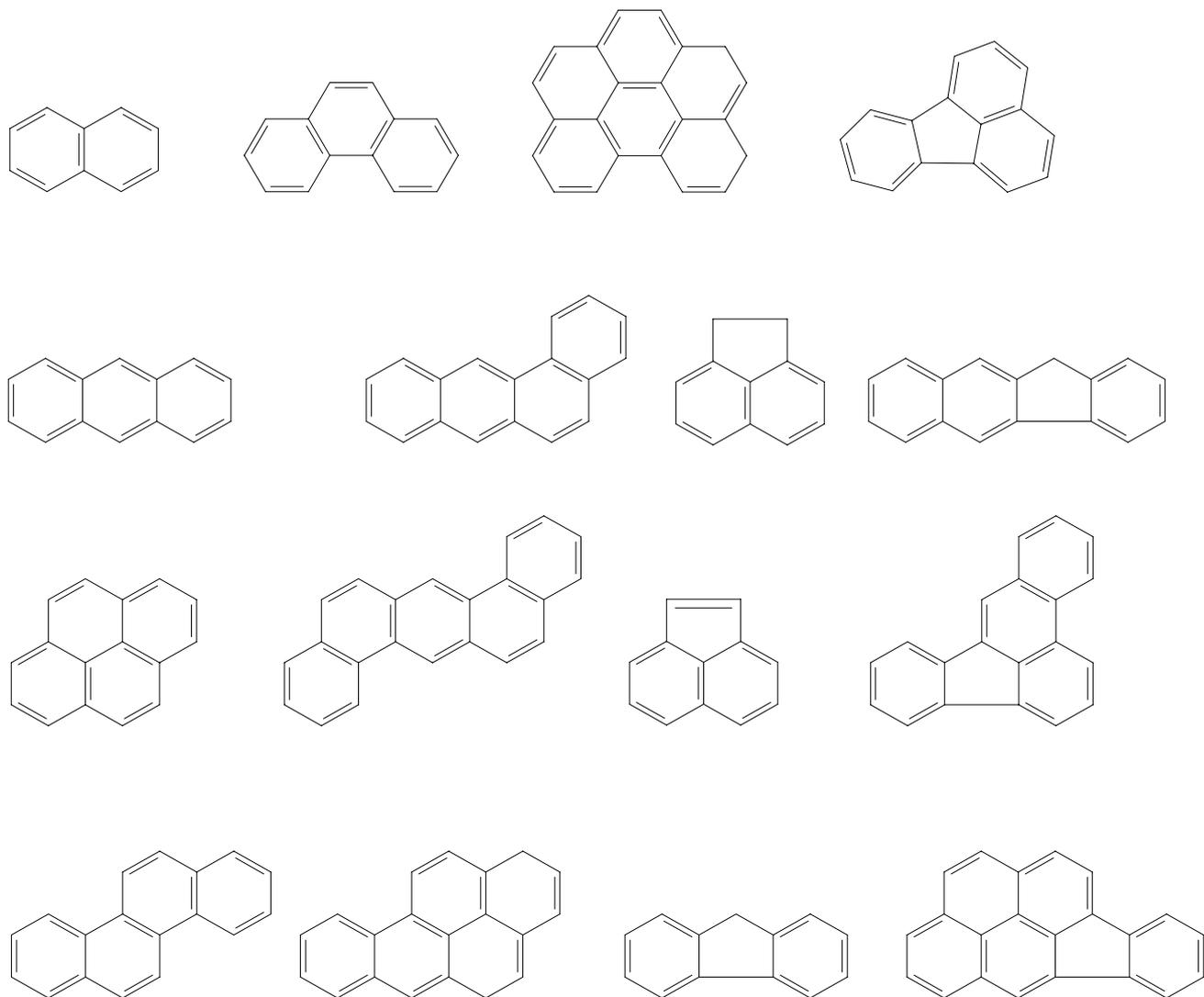


Figura 2: Ativação do BaP e formação de adutos com macromoléculas.
(Zander, 1976; IPCS, 1998).

1.3 - HPAs X Meio Ambiente

A atmosfera constitui um importante meio de transporte para os compostos orgânicos e inorgânicos emitidos por fontes naturais e antropogênicas (resultantes da ação/atividade humana). Os Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) podem estar presentes na atmosfera tanto em forma vapor quanto adsorvidos no material particulado (Netto et al 1999).

A importância ambiental dos HPAs e derivados está muito bem estabelecida e aceita pela comunidade científica. Os estudos sobre essa classe de compostos englobam uma grande variedade de aspectos como cinética e produtos de reações em fase vapor, desenvolvimento de metodologias analíticas e estudos de campo sobre concentrações atmosféricas, síntese, atividades cancerígena e mutagênica e processos de remoção da atmosfera(Netto et al. 1999).

As transformações químicas dos HPAs na atmosfera são estudadas desde 1956 quando foram publicados os trabalhos pioneiros de Falk et al. Outras matrizes como hidrosfera, solo, biota, alimentos, etc, têm sido objeto de atenção e pesquisas nessa área (Bo-Xing et alii. 1988; Krylov et alii. 1995; Jones et alii. 1989; Kostyuk et alii. 1995; Ariese et alii. 1990 ; Lawrence et alii. 1986).

Os Nitroderivados dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (NHPAs) também são emitidos para atmosfera em processos de combustão, porém, em menores quantidades que os HPAs. Contudo, a formação de NPAHs na atmosfera predomina sobre o processo de emissão direta.

1.4 - HPAs X Saúde Pública

A contaminação de rios, mares e florestas e, também da atmosfera, pode causar danos irreparáveis à natureza e à saúde humana. A ação maléfica dos HPAs sobre os organismos vivos pode ser exercida diretamente e, principalmente, através de seus derivados, muitos deles ainda desconhecidos.

Os efeitos dos HPAs sobre a saúde humana estão diretamente associados ao mecanismo de contaminação que ocorre principalmente através da inalação de aerossóis atmosféricos.

A exposição humana (e de outros animais) a HPAs ocorre por diferentes vias. As mais importantes são a inalação de ar poluído e a ingestão de alimentos ou de água contaminada. No caso de seres humanos, outros importantes modos de exposição a HPAs são o hábito (ou vício) de fumar, a inalação (passiva) de fumaça de cigarros e a exposição ocupacional em atividades e processos envolvendo a produção ou manuseio de matérias-primas que contenham estes compostos (IPCS, 1998).

HPAs já foram detectados em alimentos brutos e processados. A presença de HPAs em alimentos brutos de origem vegetal, pode ser creditada principalmente à deposição atmosférica. Animais aquáticos, como mexilhões e ostras que tendem a acumular HPAs podem, eventualmente, representar outra forma de aporte destes compostos aos seres humanos e a outros animais (Guillén et al. 1994). Em alimentos processados, a presença de HPAs está associada ao alimento *in natura* ou ainda a alguma etapa de processamento, como é o caso da defumação ou fritura dos alimentos. (Guillén et al. 1994).

Como já foi dito anteriormente, na atmosfera, os HPAs estão distribuídos entre a fase gasosa e o material particulado atmosférico em função das condições ambientais (principalmente da temperatura) e das constantes físico-químicas do composto em questão. A maior parte dos HPAs presentes em material particulado atmosférico se concentram nas partículas de menor diâmetro aerodinâmico (Miguel, et al. 1978) que, devido às características do sistema respiratório humano são capazes de atingir as vias respiratórias internas onde os processos de eliminação de HPAs associados às partículas é lento.

O trato respiratório pode ser convenientemente dividido em duas regiões distintas: a região extratorácica constituída pelas vias nasal e oral, faringe e laringe;

e a região intratorácica que inclui os brônquios, traquéia e alvéolos. Devido a deposição de partículas ambientais e organismos, a região extratorácica é muito susceptível a infecções e doenças respiratórias. A deposição de partículas na região extratorácica é considerada a primeira linha de defesa contra a penetração de partículas nas vias mais profundas mas, também é reconhecido como um sítio de efeitos tóxicos. A região intratorácica, por sua vez, é dividida em região traqueobronquial e região alveolar onde geralmente ocorre o câncer de pulmão e outras enfermidades crônicas (Cheng et alii. 1995).

Partículas menores têm um tempo de residência maior na região intratorácica, permanecendo por semanas e até anos em contato direto com a membrana alveolar. O estudo da distribuição do BaP no Rio de Janeiro, utilizando um impactador em cascata, indica que os HPAs estão preferencialmente adsorvidos em partículas menores, com diâmetro aerodinâmico entre 0,05 e 0,26 μm (Miguel et alii. 1978; Miguel et al. 1984). Outros estudos indicam que 95% dos HPAs estão associados a partículas menores que 10 μm de diâmetro o que corresponde àquelas consideradas inaláveis (d.p. $\leq 15\mu\text{m}$). Isto aumenta a possibilidade de absorção pelo organismo devido a eficiente deposição intratorácica (de Andrade et al. 1986; Hatch et alii. 1965).

Como os compostos que tendem a concentrar-se em partículas são os mais pesados, para os quais se tem maior interesse toxicológico por serem os mais carcinogênicos (**Tabela 1**), e como os processos de combustão (principalmente veicular) tendem a formar partículas muito finas, a inalação de HPAs durante a respiração é muito importante, o que faz com que tenha sido observada boa correlação entre os marcadores de exposição à HPAs (como 1-OHP) e a poluição atmosférica (Kano, 1993).

Estudos recentes indicam que a deposição na região intratorácica aumenta com o tamanho da partícula, de 0,005 μm a 0,020 μm , e decresce de modo constante até diâmetro de 0,2 μm . A deposição mais eficiente na região intratorácica ocorre, portanto, com partículas submicrométricas em torno de 200nm (Cheng, et alii.1995).

No Brasil, alguns estudos de monitoramento ambiental foram realizados principalmente na cidade do Rio de Janeiro (Daisey et alii. 1987). Em 1984 foram quantificados 9 HPAs em aerossóis atmosféricos coletados em locais de intenso tráfego de veículos automotores. As análises foram realizadas por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência. Os resultados

demonstram uma relação direta entre as concentrações de HPAs e carbono elementar (CE) sendo que a concentração dos mesmos é maior durante o dia (**Tabela 7**).

A razão HPAs/CE é aproximadamente constante para ambos os períodos (noturno/diurno) para amostras coletadas de Segunda a Sexta feira (**Tabela 8**).

Os dados indicam que ocorre perda por dessorção ou reação química durante o dia; que há aumento da concentração no período noturno, quando a temperatura cai e radiação solar está ausente; e que durante a noite ocorre preferencialmente o processo de deposição seca do CE depositado sobre partículas finas (Daisey et alii. 1987).

Dados relatam a quantificação simultânea de 11 HPAs coletados durante um período de 12 horas (7:00 – 19:00h) em dois sítios de amostragem, no túnel Santa Bárbara (1,3 Km de extensão) e no bairro de Vila Isabel (área residencial - comercial), na cidade do Rio de Janeiro, em 1986 (Miguel et alii. 1989).

Os valores encontrados refletem a origem veicular dos HPAs que estão muito mais concentrados no túnel (5 a 10 vezes) do que em área residencial –comercial (**Tabela 8**).

Trabalhos mais recentes, (Fernandes et alii. 1998,1999) relatam a determinação da concentração de benzeno e benzo(a)pireno no ar atmosférico da cidade do Rio de Janeiro em quatro pontos: Alto da Boa Vista, Ilha do Governador, Centro da cidade e avenida Brasil. As concentrações encontradas de benzo(a)pireno ($\leq 0.70 \text{ ng/m}^3$) e do benzeno ($\leq 11 \mu\text{g/m}^3$) eram relativamente baixas e a distribuição destes poluentes orgânicos no ar atmosférico do Rio está associada com o tráfego de automóveis.

A determinação de HPAs em amostras ambientais de diversas origens por Netto, demonstra que as concentrações de HPAs em material particulado atmosférico (MPA) variam entre $0,01 \text{ ng/m}^3$ e $4,0 \text{ ng/m}^3$ dependendo do local da amostragem e do horário de coleta (Netto, 1999). As menores concentrações de HPAs em MPA foram registradas no material coletado em Niterói enquanto na Avenida Brasil foram observadas as maiores concentrações de HPAs dentre estas amostras coletadas na cidade do Rio de Janeiro. No caso das amostra de casca de tronco de árvore, os teores observados variaram entre 10 e 300 ng/g, dependendo do HPA e da localização da amostra. Não foi observada uma clara dependência das distâncias às fontes emissoras e aparentemente, outros fatores ambientais têm importância fundamental nas concentrações de HPA neste meio e a possibilidade de usar este

meio como amostrador passivo para HPA, que foi uma das hipóteses iniciais deste estudo.

A avaliação e o controle da exposição humana a substâncias que possuam atividade carcinogênica/mutagênica podem trazer benefícios a população, particularmente quando sabe-se que a grande maioria dos cânceres resulta de interações genéticas e ambientais, sendo as causas externas (ambientais), em conjunção com fatores de suscetibilidade adquirida, as mais importantes.

Tabela 7: Concentração(ng m^{-3}) de HPAs e CE no Rio de Janeiro

	<i>FLT</i>	<i>PYR</i>	<i>BaA</i>	<i>CHR</i>	<i>BkF</i>	<i>BaP</i>	<i>BgP</i>	<i>IND</i>	<i>CE</i>
Dia	1,49	1,28	0,97	1,40	1,04	2,62	4,01	2,86	11,8
Noite	1,08	1,04	1,09	1,48	1,10	2,80	3,67	2,74	8,87
N/D	1,38	1,23	0,89	0,95	0,95	0,94	1,09	1,04	1,33

Fonte: Daisey, et al 1987.

Tabela 8:Razão HPAs/CE (n= 12 para cada período)

	<i>FLT</i>	<i>PYR</i>	<i>BaA</i>	<i>CHR</i>	<i>BbF</i>	<i>BkP</i>	<i>BaP</i>	<i>BgP</i>
<i>IND</i>								
Dia	1,13	0,98	0,70	1,06	1,83	0,84	1,99	3,61
Noite	1,25	1,10	1,06	1,53	2,67	1,19	2,93	4,33
								3,07

Fonte: Miguel et al, 1989

1.5 - Metabolismo dos HPAs e de seus derivados nitrados

A biotransformação dos HPAs envolve uma série de enzimas que catalisam reações de oxidação, redução e hidrólise (oxigenases de função mista, citocromo P 450, NADPH-citocromo-c-redutase) bem como as que catalisam reações de conjugação (sulfotransferase, epóxido hidrolase, glutathione-S-transferase e UDP-glicotransferase) estão distribuídas em todos os tecidos.

Monoxigenases dependentes do citocromo P 450 (CYP1A) são responsáveis pela oxidação enzimática dos PAHs. Elas agem principalmente sobre a região de elevada densidade eletrônica ou a nível da região angular da molécula do PAH formando óxidos de arenos (epóxidos) que podem espontaneamente formar fenóis ou, por ação das epóxido hidrolases, produzirem dihidrodíóis vicinais. Alguns fenóis são oxidados a quinonas e outros podem sofrer nova epoxidação levando à formação de epóxidos secundários (dihidrodiolépóxidos). O carbono benzílico dos dihidrodiol-epóxidos é capaz de reagir com as bases nucleofílicas do DNA, notadamente a guanidina e, eventualmente, iniciar um processo mutagênico.

Reações semelhantes são observadas com outras macromoléculas tais como a albumina e a hemoglobina.

Os dihidrodiol-epóxidos são altamente instáveis e, quando não reagem rapidamente, são hidrolisados a tetróis, cuja formação pode ser utilizada como bioindicador da formação de diolépóxidos.

Os fenóis, as quinonas e os dihidrofenóis podem sofrer conjugação formando sulfatos e glucuronatos. Os óxidos de arenos, as quinonas e os diol epóxidos também reagem com o glutathione e podem ser eliminados através da urina sob a forma de tioéteres.

Uma representação simplificada do metabolismo do BaP pode ser vista na **Figura 2**.

Os NPAHs são, comprovadamente, potentes mutágenos para *Salmonella typhimurium* (teste de Ames), para bactérias e células eucarióticas (células de ovário de hamsters, células epiteliais de ratos -RL 4). Estas substâncias são capazes de provocar mutações mesmo sem sofrerem qualquer tipo de ativação metabólica. Mononitro derivados são geralmente metabolizados através de processos oxidativos gerando espécies semelhantes àquelas formadas pelos HPAs (diolépóxidos e aminodiolépóxidos) capazes de formar adutos por reação com a de oxiguanosina.

1.6 - Reatividade com macromoléculas biológicas

Alguns trabalhos relacionando a atividade carcinogênica/mutagênica dos vários PAHs com suas estruturas químicas têm sido publicados (Nardini et alii. 1985). Conforme dito anteriormente, os PAHs não são mutagênicos diretos e necessitam sofrer ativação metabólica preliminar para se tornarem capazes de reagir com o DNA e outras macromoléculas.

Quatro mecanismos tem sido propostos para explicar a ativação de PAHs: 1) oxidação enzimática seguida de hidrólise com a formação de diol epóxidos (é o mecanismo mais aceito); 2) formação de ésteres benzílicos, eletrofílicos, através de uma série de reações de substituição (Stansbury et alii. 1994); 3) produção de radicais catiônicos através da oxidação enzimática com envolvimento de um elétron e 4) dehidrogenação enzimática dos metabólitos dihidrodiois produzindo quinonas capazes de reagirem diretamente com o DNA ou capazes de reagirem com o O₂ gerando espécies oxigenadas reativas, como os radicais hidroxilas ou ânions superóxidos que atacam o DNA, conforme representado nas Figura 2. Estes mecanismos não são excludentes podendo ocorrer simultaneamente (Harvey et al. 1996).

De acordo com a hipótese atualmente mais aceita, a ligação entre os diol epóxidos, resultantes da ativação metabólica destas substâncias e o DNA são favorecidas quando diol epóxidos vicinais são formados (região de “baía”), principalmente nas moléculas não lineares, como o benzo(a)pireno, cujo mecanismo de ativação metabólica pode ser visto na **Figura 2**.

Provavelmente o ataque eletrofílico do DNA aos epóxidos ocorra através de um mecanismo do tipo SN1 e se processe através de estados de transição nos quais os hidrocarbonetos exibem significativo caráter de íon carbonium. Assim, a reatividade com o DNA e, conseqüentemente a capacidade carcinogênica destes compostos, estaria diretamente relacionada com a facilidade de formação destes ions.

De fato, a reatividade observada para os metabólitos possuindo diol epóxido na região de baía comparada com aqueles que a possuem na região K (fjord) mostram maior reatividade dos primeiros, provavelmente como resultado do acesso mais fácil aos orbitais π (Fetzer et alii. 1993).

Algumas relações tem sido encontradas entre modelos teóricos que envolvem alguns parâmetros moleculares como o orbital molecular vago de mais baixa

energia, a hidrofobicidade e o número de anéis aromáticos com a mutagenicidade (Harvey et al. 1978).

Resultados de testes laboratoriais realizados com diversos HPAs para a verificação de suas atividades carcinogênicas, mutagênicas ou genotóxicas mostraram que os efeitos dos diferentes compostos são variáveis, como mostrado na **Tabela 1**.

Também pode ser observado nos dados da **Tabela 1** que a capacidade carcinogênica e mutagênica dos diferentes PAHs é significativa para aqueles que possuem mais de 4 anéis aromáticos fundidos e maior para os que têm 5 ou 6 anéis. A substituição de hidrogênio por grupos químicos, também pode afetar drasticamente a atividade dos PAHs dependendo da posição onde a substituição se dá e do grupo substituinte (Combariza et alii. 1996).

A presença simultânea de vários destes compostos no ambiente faz com que a avaliação de suas genotoxicidades a partir de amostras ambientais seja muito difícil. Isto também dificulta estudos de correlação pois a via de introdução de PAHs no organismo influencia seu poder carcinogênico/mutagênico bem como a localização dos tumores.

Estas características variam de uma espécie animal para outra (Bouchez et alii. 1996) e na espécie humana, a via respiratória é considerada a mais importante, particularmente para indivíduos ocupacionalmente expostos, mas em muitos casos, a via dérmica pode ser tão ou mais importante (Harvey et alii. 1978). Muitas destas substâncias têm efeito negativo sobre o sistema imunológico animal, característica que parece estar associada à capacidade carcinogênica (Sartorelli et alii. 1996).

Um esquema proposto para a carcinogênese por exposição ambiental considera as seguintes etapas: exposição ambiental, ativação metabólica, formação de adutos entre os PAHs e o DNA, mutação em genes críticos como, por exemplo, o P 53 (gene repressor de tumor) e sucessão de mutações em outros genes (Jones et alii. 1974; Muller et alii. 1991).

É importante realçar que o aparecimento do câncer é um processo que envolve várias etapas (não apenas a formação de adutos com o material genético), sendo também influenciado por suscetibilidade individual e outros fatores, tais como gênero, etnia, idade, estado de saúde, nutrição e polimorfismo genético.

Em geral, maior concentração de adutos PAHs-DNA é encontrada em fumantes ou pessoas ocupacionalmente expostas.

Figura 2: Ativação do BaP e formação de adutos com macromoléculas.

1.7 - MONITORAMENTO BIOLÓGICO

A exposição humana (e de outros animais) a HPAs ocorre por diferentes vias. As mais importantes são a inalação de ar poluído e a ingestão de alimentos ou de água contaminada. No caso de seres humanos, outros importantes modos de exposição a HPAs são o hábito (ou vício) de fumar, a inalação (passiva) de fumaça de cigarros e a exposição ocupacional em atividades e processos envolvendo a produção ou manuseio de matérias-primas que contenham estes compostos (IPCS, 1998).

A biotransformação de HPAs em organismos vivos está bem estudada (IPCS, 1998) e pode representar uma forma de redução dos níveis ambientais destas substâncias, mas a metabolização pode Ter dois papéis antagônicos nestes organismos: a) pode levar à formação de substâncias mais tóxicas; b) pode servir como mecanismo de detoxificação. Um exemplo é a presença de conjugados de 1-hidroxipireno com β -O-glicosídeos e β -O-glicorínídeos em plantas (Nakajima et al., 1996).

A procura de bioindicadores confiáveis para o estudo da exposição humana aos PAHs e seus derivados constitui ainda matéria para muita pesquisa. Alguns indicadores específicos, como por exemplo o 1-hidroxipireno, têm sido propostos e utilizados com sucesso nos estudos da exposição humana a determinados PAHs.

No conhecimento do paradigma clássico exposição – doença, os marcadores biológicos de exposição e efeito são de grande utilidade na produção de informações que permitem a adoção de medidas preventivas. Assim, a importância e atualidade do tema em conjunção com as limitações atualmente disponíveis justificam investimentos científicos e fazem com que esta área seja bastante atraente para desenvolvimentos futuros.

1.8 – 1-OHP COMO BIOINDICADOR

O 1-OHP, principal metabólito do pireno tem sido amplamente utilizado como indicador de exposição aos HPAs, devido à sensibilidade, simplicidade e rapidez em sua análise. Além disto, o pireno é encontrado em um percentual consistente da mistura de HPAs presentes no ar e no ambientes de trabalho.

O nível de 1-OHP presente na urina reflete a exposição global a HPAs, considerando sua exposição por via respiratória e por via cutânea. Na avaliação da exposição ocupacional a HPAs deve-se considerar o estilo de vida do trabalhador, como o hábito de fumar, a alimentação, a poluição atmosférica da região de sua residência e do trabalho, pois estes fatores influenciam na excreção urinária de 1-OHP (Apostoli et alii. 1996).

Geralmente, os HPAs são metabolizados em diferentes poli-hidroxi-HPAs, com exceção do pireno que é quase que completamente (geralmente cerca de 90%) metabolizado a 1-OHP em todas as espécies animais estudadas (Apostoli et alii. 1996).

1.9 - OBJETIVOS

- Implementação da metodologia analítica para análise de 1 hidroxipireno em urina humana.
- Verificar a influência de algumas variáveis gerais (hábitos de vida e características sócio-econômicas) sobre os resultados.

2 – CARACTERÍSTICAS DO PIRENO

2.1 – CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

a) Sinônimos e Nome Comercial

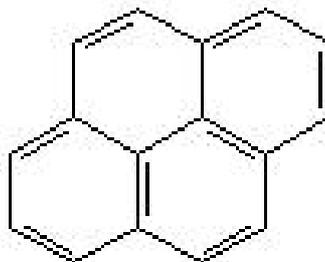
Chem. Abstr. Services Reg. N° :129-00-0

Chem. Abstr. Name : Pireno

IUPAC Systematic Name : Pireno

Sinônimos: Benzo[def]fenantreno; β -pireno.

b) Fórmula Estrutural e Molecular, Peso Molecular



C₁₆H₁₀

P.M.=202.26

c) Propriedades Físicas:

Ponto de Ebulição: 393 ° C

Ponto de Fusão: 149-151° C.

Coeficiente de partição: log K_{ow} 5,18.

Gravidade Específica: d₂₃ 1.271

Solubilidade: Água: 135 µg/L. Solvente Orgânico: acetona, etanol, benzeno, éter dietil, carbono disulfido, tolueno.

d) Ocorrência: Em combustível fóssil. Ocorre em produtos de combustão incompleta, incluindo tabaco e combustível fóssil. Resíduos têm sido identificados em águas naturais e comerciais, sedimentos e peixes.

2.2 – CARACTERÍSTICAS TOXICOLÓGICAS

Do ponto de vista toxicológico, a principal importância dos HPAs são as evidências de sua associação a diversos tipos de cânceres em seres humanos, principalmente os de pulmão, bexiga, colo, reto e esôfago (IPCS, 1998; Boffetta et al. 1997; Mastrangelo et al. 1996; Warshawsky, et al. 1999). Esta associação é sustentada por estudos epidemiológicos em populações ocupacionalmente expostas e por estudos realizados em animais de laboratório. A **Tabela 1** apresenta uma compilação das propriedades carcinogênicas, genotóxicas (de curto prazo) e mutagênicas de alguns HPAs (Bouchez et al. 1996).

a) ABSORÇÃO

Devido ao seu caráter lipofílico os PAHs podem ser absorvidos no trato respiratório, no trato gastrointestinal e através da pele, sendo rapidamente distribuídos pelo organismo. A exposição dérmica pode ser muito significativa em algumas indústrias, pode ser responsável por até 90% da quantidade absorvida pelo organismo.

b) METABOLISMO

O metabolismo do pireno é relativamente simples. Ele é metabolizado no organismo humano com formação do intermediário 1-hidroxipireno e 1-hidroxipireno-glucuronidase que são excretados pela urina. Outra substância, o 1,2-dihidroxi-1,2-dihidropireno tem sido considerada um metabólito secundário por estar presente na urina de humanos contaminados por pireno.

c) EXCREÇÃO

A excreção dos metabólitos de HPAs tem sido estudada em animais. Cerca de 85-95% dos metabólitos resultantes da exposição de camundongos ao benzo(a)pireno, são excretados pelas fezes; uma pequena fração é encontrada na urina. Depois da aplicação dérmica de (¹⁴C)pireno em camundongos, 20-23% da dose foi excretada pelas fezes durante 6 dias, sugerindo uma excreção semelhante em urina e fezes. No homem, 1-hidroxipireno é excretado na urina como um metabólito conjugado imediato a exposição por pireno.

3 – EXPOSIÇÃO À FUMAÇA DE TABACO

A exposição à fumaça de cigarro pode se dar tanto pelo fumo ativo quanto pela inalação passiva, sendo que neste último caso nenhum efeito sobre a concentração de 1-OHP urinário tem sido relatado. Na população em geral, é explicável a baixa concentração de 1-OHP urinário encontrada, já que na inalação passiva ocorre uma baixa absorção em relação ao total de HPAs. Valores mais elevados deste metabólito foram encontrados na urina de fumantes em relação a indivíduos não fumantes. Dados da literatura relatam uma concentração urinária média de 1-OHP, que varia de 0,10 a 0,50 $\mu\text{g/g}$ creatinina para o grupo de não fumantes, enquanto que no grupo de fumantes tais concentrações estão compreendidas entre $< 0,07$ a 1,37 $\mu\text{g/g}$ creatinina (**Tabela 9**) e correlacionado ao número de cigarros fumados, sugerindo a existência de uma relação dose-resposta entre este metabólito e o fumo (Jongeneelen et alii. 1990; Van Rooij et alii. 1994). O cigarro de tabaco geralmente contém de 5 a 27 μg de pireno por 100 cigarros. Então, fumar 10 cigarros ao dia significa uma ingestão de 0,5 a 2,7 μg de pireno (Jongeneelen et alii. 1986).

Assim, o vício de fumar pode tornar-se um importante fator de confundimento, quando se faz um monitoramento de exposição ocupacional a baixas concentrações de HPAs (**Tabela 10**). Por outro lado, o hábito de fumar pode ter efeito sinérgico de potencialização sobre a excreção do 1-HOP, provavelmente nos fumantes, se têm uma diminuição da “clearance” mucociliar e da indução da enzima responsável pelo metabolismo dos HPAs. A contribuição relativa do fumo parece, todavia, desprezível quando os indivíduos em observação estão expostos ocupacionalmente a elevadas concentrações de HPAs (Apostoli et alii. 1996).

Tabela 9 : Excreção urinária de 1-OHP na população em geral.

1-OHP ($\mu\text{g/g}$ Creatinina) Fumantes X (D.S.)	1-OHP ($\mu\text{g/g}$ Creatinina) Não Fumantes X (D.S.)
1,37 (0.59)	0.48 (0.52)
0,91 •	0.30•
0.59 (0.34)	0.42 (0.23)
0.46	0.28
0.44•	0.21•
0.28(0.17)	0.15(0.14)
0.20•	0.10•
<0.07•	0.50•
0.18•	0.30•

• Mediana

Fonte: Apostoli, P. et al., 1996.

Tabela 10: Excreção urinária de 1-OHP em trabalhadores expostos ao PAHs .

Trabalhadores	1-OHP ($\mu\text{g/g}$ Creatinina)	
	Fumantes	Não Fumantes
	X (D.S.)	X (D.S.)
Fumaça de Betume	1,19 (0.53)	0.94 (0.80)
Fundição	0.75 •	0.19 •
	0.05 •	0.03 •
Fumaça de Incineração	0.38 (0.17)	0.25 (0.17)
	0.30 (0.22)	0.10 (0.08)
Autoreparação	0.46 (0.27)	0.27(0.18)

•, Mediana

Fonte: Apostoli, P. et al., 1996.

4- MATERIAIS E MÉTODOS

4.1) : AMOSTRAGEM

4.1.1) Coleta da Amostra

Com o objetivo de avaliar a contaminação humana por Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs) através da determinação de 1-hidroxipireno (1-OHP) urinário, foi elaborado um estudo que inclui o monitoramento biológico de indivíduos fumantes e não fumantes, com vista a detectar a presença de 1-OHP em amostras de urina.

No CESTEJ existem 76 funcionários sendo 16 fumantes e 60 não fumantes. Devido ao pequeno número de fumantes optou-se, então, por envolvê-los em sua totalidade neste estudo (16 indivíduos) comparando-os com um grupo de 25 não fumantes. O modelo encontra-se na **Figura 3**.

Foi coletada uma amostra de 50 ml de urina de cada voluntário fumante dos quais 7 eram mulheres e 9 homens. As amostras foram coletadas no período da tarde.

Do grupo de não fumantes, 13 eram do sexo feminino e 12 masculino.

Durante a coleta das amostras, foram aplicados questionários e obtidas informações sobre: idade, consumo diário de cigarros, região aonde morava, presença de indústrias perto de suas residências, se haviam outros fumantes em suas residências e no trabalho, se o ambiente em que eles fumavam eram abertos ou fechados.

O modelo do questionário aplicado encontra-se no **Anexo 1**.

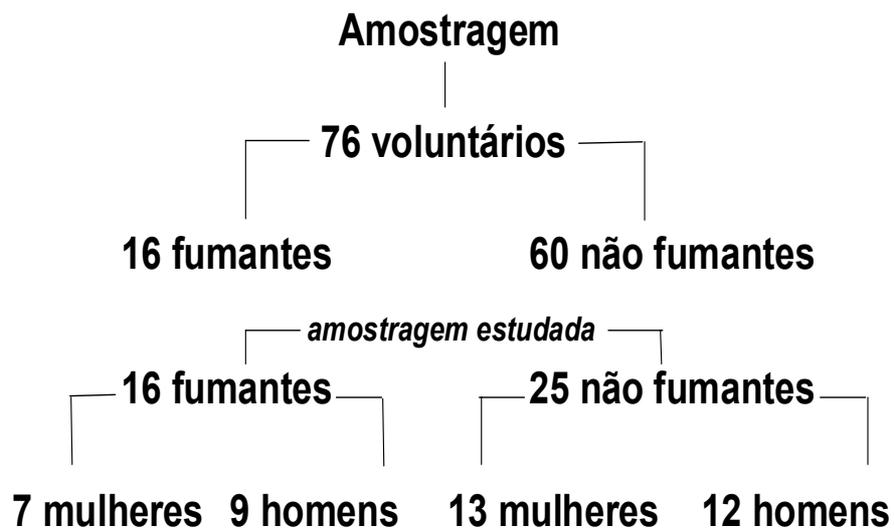


Figura 3: Fluxograma da amostragem estudada.

4.1.2) Cuidados com a coleta e armazenamento das amostras

a) Tempo de Amostragem

As amostras de urina foram coletadas no final da jornada de trabalho.

b) Contaminação

A contaminação das amostras é rara uma vez que o 1-hidroxipireno, é um metabólito resultante do metabolismo do pireno no organismo humano.

c) Plano de Amostragem

As amostras devem ser coletadas em recipientes limpos de plástico com tampa. Aproximadamente 25mL de urina são suficientes para uma análise em duplicata.

d) Preservação, estocagem, estabilidade

A urina deve ser coletada em recipientes sem o auxílio de conservantes. Embora a amostra deva ser estocada no escuro e a -18°C , pode ser guardada por até um ano sem perda de 1-hidroxipireno. Este metabólito é estável e não deve haver problemas mesmo quando a estocagem é prolongada(WHO, 1996).

4.2) Características do grupo estudado

O objetivo principal deste estudo foi implementar a metodologia analítica e estimar a contaminação dos indivíduos estudados através da determinação do 1-OHP, buscando-se correlacionar os valores encontrados em amostras de urina com alguns fatores de confundimento, além de compará-los com indivíduos não fumantes.

Participaram deste estudo todos os 16 indivíduos fumantes e 25 não fumantes.

O consumo diário de cigarros dos fumantes, está relacionado na **Tabela 11 e 12.**

Tabela 11) Consumo diário de cigarros pelos trabalhadores do sexo masculino

Voluntários Homens	Consumo diário de cigarros
Voluntário 4	5
Voluntário 9	20
Voluntário 12	3
Voluntário 15	3
Voluntário 16	5
Voluntário 22	20
Voluntário 26	20
Voluntário 27	20
Voluntário 34	20

Tabela 12) Consumo diário de cigarros pelos trabalhadores do sexo feminino.

Voluntários Mulheres	Consumo diário de cigarros
Voluntário 7	5
Voluntário 11	20
Voluntário 29	5
Voluntário 30	20
Voluntário 32	20
Voluntário 39	20
Voluntário 41	3

4.3 - Reagentes e Soluções.

- 1-Hidroxipireno (pureza > 98%), Accu Standards (USA).
padrão sólido de 1-OHP fornecido pela Accu Standards (USA), foi utilizado no preparo da solução padrão para a quantificação de 1-OHP em urinas.
- solução padrão de 41 ppm : foram pesados 4,10 mg de 1-hidroxipireno em balança analítica, com precisão de 0,0001mg, e dissolvidos em metanol, em balão volumétrico de 100mL com tampa de vidro esmerilada.
Para o preparo da solução estoque de 1-OHP, foi feita diluição de 1mL da solução padrão em 100 mL metanol.
- β -D-glucoronidase/arilsulfatase (100.000 Fishman U/mL e 800.000 Roy U/mL, Roche Molecular Biochemical ,GE).
- acetato de Sódio p.A, referência 983815 - VETEC.
- acetonitrila grau cromatográfico, referência 002888 - VETEC.
- ácido Clorídrico p.A. , referência 920418 - VETEC.
- metanol grau cromatográfico, referência 995262 - VETEC.
- nitrogênio alta pureza, Aga.
- água Milli-Q
- 0,1 M tampão acetato (pH=5).
- coluna para extração em fase sólida, Sep – Pak Vac 6cc C-18, referência WAT 051910 - Waters.
- extran alcalino, Merck – para lavagem do material.

- acetona p.A. , referência 972906 - VETEC.

4.4 – VIDRARIA

- pipetas volumétricas automáticas, capacidades 10, 20, 50 e 100 μ L.
 - provetas graduadas, capacidade 500 e 1000 mL.
 - erlenmeyers, capacidade de 250 mL.
 - balões volumétricos, capacidades 10, 50 e 100 mL.
 - bastão de vidro.
 - béquer , capacidade de 100 mL.
 - tubos de vidro graduados, capacidade de 10 mL.
- Toda vidraria foi lavada segundo os procedimentos de lavagem que seram apresentados no item **4.6**.

4.5 - Equipamentos:

- cromatógrafo líquido HP 1090, Hewlett Packard
- detector de fluorescência, SHIMADZU;
- agitador Shayker, New Brunswick Scientific;
- centrífuga Excelsa Baby II (206R), FANEM;
- estufa UT6 (Temp máxima = 250°C), Heraeus;
- banho de Ultrassom, Branson;
- pHmetro PM 608, Analion;
- balança AE 200, Metler;
- coluna RP 18 - 5 μ m, 150 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, Sigma – Aldrich.

4.6) Limpeza da Vidraria

A vidraria usada neste trabalho foi sempre lavada com Extran (Merck). Toda a vidraria era imersa em solução aquosa deste detergente a 5% por 1 a 2 horas e em seguida no ultrassom durante 10 min. Este processo se repetia por 3 vezes, trocando a solução de Extran a cada vez. Em seguida a vidraria era lavada em água corrente, durante 5 min.

A vidraria era então imersa em água de Milli-Q e colocada no ultrassom durante 10 min, repetindo-se esse processo por 3 vezes. Logo após, a vidraria era rinsada com acetona e seca em estufa em temperatura maior ou igual a 100°C.

4.7) Limpeza das Seringas Cromatográficas

Uma seringa cromatográfica de 250 μ L foi utilizada para introdução das soluções das amostras no cromatógrafo. A seringa era previamente “rinsada” repetidas vezes com as soluções das amostras a serem introduzidas no equipamento e posteriormente eram lavadas com metanol.

De tempos em tempos entre as injeções das amostras, eram feitos brancos da seringa, realizado pela injeção de 50 μ L da solução de lavagem. Este procedimento foi utilizado para se verificar a eficiência da limpeza.

4.8 - MÉTODOS

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

4.8.1. - Descrição da coluna cromatográfica utilizada:

- Lichrosorb RP 18 - 5 μ m.
- Comprimento Nominal: 150mm.
- Diâmetro Interno: 4,6mm.
- Fabricante: Sigma – Aldrich.
- Temperatura máxima recomendada: 40°C.

4.8.2 - Condições Analíticas Descrita:

- Volume de injeção: 20 μ L
- Fase: acetonitrila/água (70:30)
- Temperatura: 25°C
- Pressão: 188 psi
- Fluxo: 2,0 mL/min

Detector por Fluorescência:

- Fabricante: Shimadzu
- λ de Excitação: 252 nm
- λ de Emissão: 400 nm

4.9 - DETERMINAÇÃO DE 1-OHP URINÁRIO

4.9.1) PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA A DETERMINAÇÃO DE 1-OHP.

Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Toxicologia/CESTEH, Fundação Oswaldo Cruz.

O procedimento analítico utilizado para a determinação de 1-OHP nas amostras de urina foi o recomendado pela WHO (1996).

Este método baseia-se na extração do 1-OHP da urina, utilizando-se a técnica de extração em fase sólida (EFS) e sua determinação por cromatografia líquida de alta resolução, com detector por fluorescência. Um esquema simplificado da metodologia utilizada está apresentado na **Figura 4**.

Após o descongelamento, as amostras de urina foram lentamente homogeneizadas com o uso de um bastão de vidro. Após atingirem a temperatura ambiente, uma alíquota de 10mL foi transferida para um “becker” de 100mL ao qual adicionou-se cerca de 20mL de solução tampão acetato 0,1M (pH=5,0) até se obter um volume total de 30mL.

O pH da amostra de urina diluída foi ajustado para 5,0 com solução de HCl 4,0 N. Em seguida, este volume total foi transferido para um “erlenmeyer” de 125 mL e devidamente tampado.

A mistura foi incubada “overnight” (16h) após adição de 12,5µL de solução **β-D-Glucoronidase/Arilsulfatase** mantendo-se uma agitação constante de 210 rpm .

Para eliminar possíveis interferentes, foi feita uma etapa preliminar de limpeza nas amostras. Este tratamento consistiu em uma passagem das amostras através de uma coluna C-18 fase reversa a um fluxo de aproximadamente 1mL/min, sem auxílio de vácuo.

Antes da extração, as colunas foram ativadas pela passagem de 5mL de metanol, seguido por 10mL de água destilada.

Após a passagem das amostras de urina, o 1-OHP foi eluído pela passagem de 9mL de metanol. Este solvente foi coletado e evaporado sob pequeno fluxo de nitrogênio a 40°C. O resíduo obtido foi redissolvido em 2,0 mL de metanol com o

auxílio de um banho de ultrasson (4 min) sendo então submetido a centrifugação a 2500 rpm por 5 min.

Após a centrifugação uma alíquota de 2,0 mL foi filtrada e, em seguida, transferida para um tubo de ensaio com tampa. A seguir análise quantitativa foi feita com 20 μ L via CLAE/Fluorescência nas condições previamente descritas.

4.9.2) DETERMINAÇÃO DE 1-OHP NAS AMOSTRAS DE URINA

A concentração total de 1-hidroxi pireno foi determinada por CLAE/Fluorescência após a hidrólise enzimática com a consequente liberação da parte conjugada. Em todos os casos, os resultados foram normatizados pela concentração de creatinina urinária.

A presença do 1-hidroxi pireno na urina foi determinada através do tempo de retenção comparado com padrões.

“CLEAN-UP” das AMOSTRAS

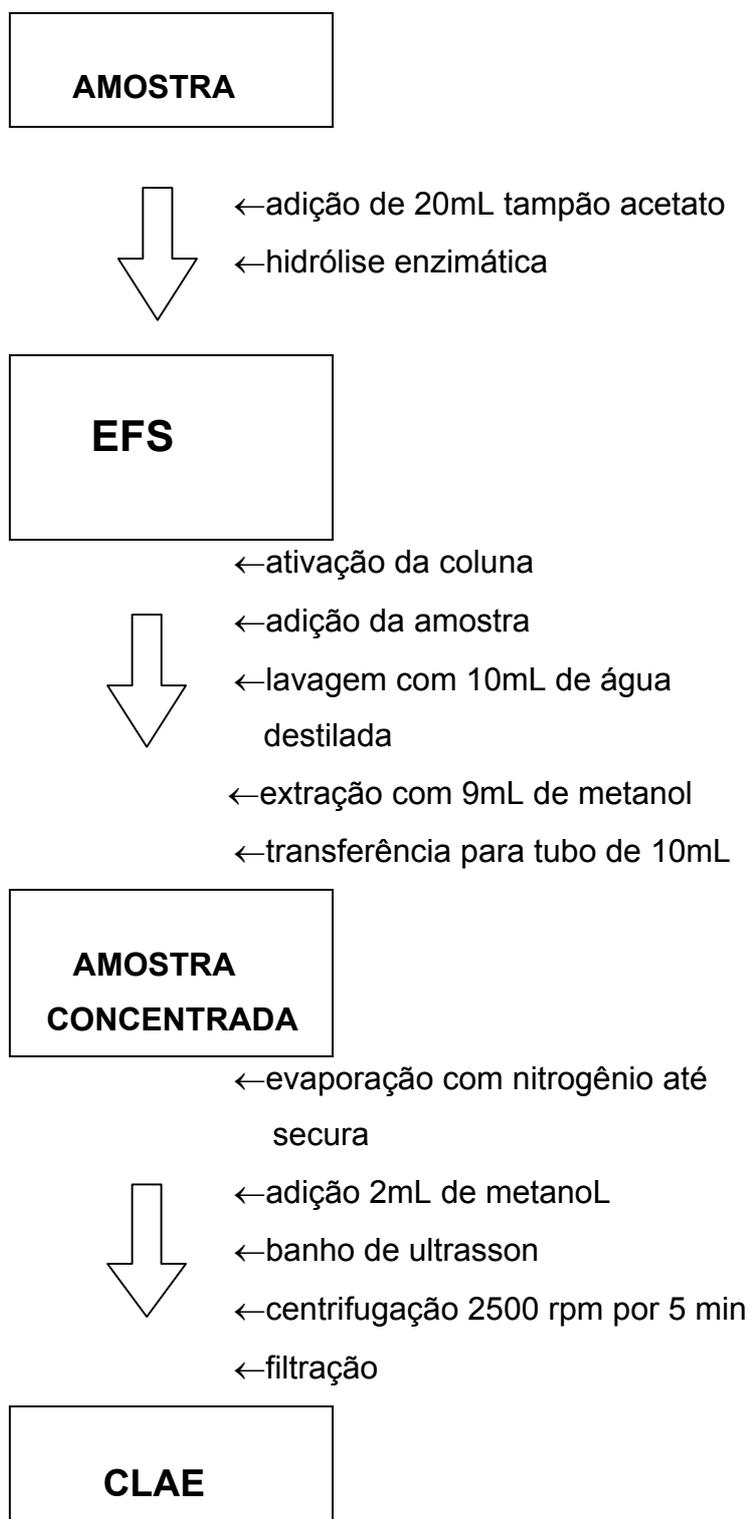


Figura 4: Esquema de tratamento das amostras para a determinação de 1-OHP

4.9.3) ANÁLISE DAS INFORMAÇÕES GERAIS DE HÁBITOS DE VIDA DOS TRABALHADORES DO CESTEJ, COMO POSSÍVEIS INTERFERENTES.

O objetivo desta etapa foi obter informações gerais sobre os hábitos de vida e características sócio-econômicas dos trabalhadores expostos, verificando suas influências sobre os níveis de **1-OHP** detectado na urina destes trabalhadores.

Inicialmente, foi obtido o consentimento dos indivíduos participantes neste trabalho através da assinatura do termo de consentimento (**Anexo 2**). A seguir foram realizadas entrevistas onde, através da aplicação de questionário próprio (**Anexo 1**), procurou-se obter informações básicas tais como: moradia, consumo diário de cigarros, fatores hereditários, região onde mora, presença de indústrias perto de sua residência, se há fumantes em casa ou no trabalho e se o ambiente dos fumantes é aberto ou fechado.

A análise estatística destes dados e as relações com a concentração de OHP urinária foi realizada utilizando-se o programa estatístico SPSS versão 9.0.

4.9.4) Análise Estatística dos Dados

Uma análise estatística descritiva foi feita para todas as variáveis assim como os gráficos de distribuição de frequência para as variáveis contínuas. A variável resposta de interesse para este estudo foi “níveis de hidroxipireno na urina”, expressos em $\mu\text{g/g}$ de creatinina. Para avaliar uma possível associação entre a variável resposta e as demais investigadas no estudo, foram utilizados os testes de correlação bivariada de Pearson. A influência de um conjunto de variáveis sobre a variável de interesse foi avaliada através de análise de regressão linear múltipla, e foram selecionadas para a análise, somente as variáveis independentes com correlação bivariada estatisticamente significativa com a variável resposta.

4.10) Parâmetros de performance analítica

Em todos os processos analíticos, a qualidade da informação analítica deve ser garantida, e os valores devem apresentar precisão e exatidão adequadas aos objetivos do estudo.

Todas as medidas analíticas estão sujeitas a erros e é essencial que sejam realizados experimentos que permitam a estimativa desses erros (Miller & Miller, 1988).

Resultados de análises de resíduos podem ser afetados por fatores associados aos procedimentos analíticos, tais como: extração, eliminação de interferentes, etc (DFG, 1992). Em análises de traços, os erros são também devidos à dificuldade em identificar uma resposta relativamente baixa, sobre um ruído alto e variável. Dependendo dos níveis de concentração, erros totais de 50% ou mais, são comuns, mesmo para procedimentos validados, executados por analistas experientes (National Research Council, 1993).

Os parâmetros mais utilizados para caracterizar a performance de um método analítico são: especificidade, linearidade, exatidão e precisão.

Para o estudo da especificidade, neste estudo, foi feita a identificação dos tempos de retenção e a determinação das retenções relativas para 1-OHP.

Para isto, primeiramente foi injetada uma solução padrão de 1-OHP e posteriormente, uma amostra biológica fortificada com adição de 1-OHP. As retenções relativas foram determinadas nas seguintes concentrações: $4,4\mu\text{g.L}^{-1}$; $3,3\mu\text{g.L}^{-1}$; $2,2\mu\text{g.L}^{-1}$ e $1,1\mu\text{g.L}^{-1}$ com fluxo de 2,0 mL/min sob as condições descritas no ítem **4.9**.

Em seguida, verificou-se a repetibilidade dos tempos de retenção, através das variações observadas para uma série de 5 injeções consecutivas da mesma amostra de urina fortificada. Os resultados deste estudo são apresentados na **Tabela 13, Capítulo 5**.

Foi necessário conhecer os perfis cromatográficos do ensaio em branco dos reagentes e da matriz biológica, para que se pudesse verificar a ocorrência de outros picos cromatográficos com o mesmo tempo de retenção da substância de interesse que pudessem interferir na análise.

Os resultados deste estudo podem ser visto na **Figura 5**, no capítulo seguinte.

A comparação entre os cromatogramas obtidos a partir de uma amostra de urina (matriz) e a matriz fortificada é apresentada na **Figura 6, Capítulo 5**.

Como pode ser observado, a metodologia analítica empregada, produz perfis cromatográficos adequados a uma análise quantitativa, ou seja, isentos de picos interferentes.

A relação entre a resposta do detector (medida da área) e a concentração do metabólito em estudo 1-OHP, foi estudada através da análise de regressão, para verificar se a mesma era linear.

Para este estudo utilizaram-se soluções contendo misturas de padrões em 5 níveis diferentes de concentração (0 a 4,4 μ g/g), sendo cada solução injetada 5 vezes. Os resultados desta avaliação são apresentados no **Capítulo 5**, através da **Tabela 14 e Figura 7**.

A exatidão de um método é determinada através da concordância entre o valor real da substância de interesse na amostra e o valor estimado pelo processo analítico, referindo-se, portanto, à habilidade do método em medir o valor real (Chasin et al, 1994; Conacher, 1990).

Embora seja muito difícil determinar exatamente o valor real de uma dada substância em um amostra, a estimativa deste valor pode ser realizada. No presente estudo, avaliou-se a recuperação de 1-OHP adicionada à matriz de interesse, em uma faixa de concentração apropriada, ou seja, na faixa de linearidade do detector (Conacher, 1990).

Para a construção da curva de recuperação do método, foram realizadas adições de quantidades conhecidas de 1-OHP, em uma matriz de urina previamente analisada na qual não foi possível identificar e/ou quantificar este metabólito.

Os resultados do estudo de recuperação são apresentados nas **Figuras 8 e 9, Capítulo 5**.

A precisão representa o grau de concordância entre os resultados obtidos, quando uma mesma amostra homogênea é analisada diversas vezes pelo método em estudo, sob idênticas condições de análise. A precisão é geralmente expressa pelo desvio padrão ou desvio padrão relativo (Coeficiente de Variação) entre os resultados obtidos (Chasin et al. 1994; Moraes et al. 1998).

Para a determinação da precisão do método foram realizadas fortificações em duplicata, para cada um dos níveis de concentração estudados e comparou-se os desvios padrão encontrados para cada nível, **Tabela 15, Capítulo 5**.

O limite de determinação (LDM) de um método representa o menor valor determinado, em confiabilidade de precisão e exatidão aceitáveis, utilizando-se um determinado procedimento experimental.

Recomendações anteriores, ainda utilizadas atualmente por alguns autores, relacionam os limites de detecção e de quantificação aos valores do branco ou ruído do instrumento e aos seus desvios-padrão. A medida do sinal pode, então, ser considerada significativa, se o seu valor médio diferir do valor médio do branco ou do ruído por um certo múltiplo do desvio-padrão. Entretanto, esse tipo de avaliação só pode ser justificado se os erros inerentes nos procedimentos de medida são causados, exclusivamente por condições instrumentais. O resultado de uma determinação quantitativa de resíduos, é geralmente mais afetado por fatores que ocorrem nas etapas que precedem à determinação instrumental.

Por esta razão, tanto o LDC quanto o LDM, devem ser determinados a partir de resultados obtidos através de procedimentos analíticos completos. O LDM é atualmente definido como a menor concentração da substância de interesse que satisfaz aos três seguintes requisitos:

- I – O LDM deve ser maior que, e significantivamente diferente do LDC.
- II – A recuperação ao nível do LDM deve ser igual a, ou maior que 70%.
- III – O coeficiente de variação (CV), ao nível do LDM, para determinação em replicata, deve ser igual, ou menor que 0,2 (equivalente a 20%).

4.11) ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE URINA

As amostras de urina foram analisadas em duplicata. Os resultados apresentados no Capítulo 5, referem-se a média dos valores obtidos.

Os resultados das concentrações encontradas nas amostras analisadas neste trabalho, foram calculados a partir de uma curva de calibração, preparada com 5 pontos do intervalo (0 a $4,4\mu\text{g.L}^{-1}$). Os cálculos das concentrações do 1-OHP nas amostras, foram efetuados através do “software” HP Chem Station, acoplado ao cromatógrafo.

Os resultados para os teores de 1-OHP nas amostras analisadas são apresentados nas **Tabelas 16 e 17**, no **Capítulo 5**.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 – PARÂMETROS DA METODOLOGIA ANALÍTICA

5.1.1 – Especificidade

Para o estudo da especificidade do método, foram identificados os tempos de retenção relativos, apresentados na **Tabela 13**. Observa-se que a eluição do 1-OHP se dá em uma região onde não foram observados picos em nenhuma amostra de urina analisada, o que demonstra que é possível identificar e quantificar a substância de interesse, conforme pode ser observado na **Figura 5**.

A repetibilidade dos tempos de retenção do 1-OHP é apresentada na **Tabela 14**. Para todas as injeções, de cinco amostras fortificadas diferentes, a variação entre as injeções consecutivas foi : inferior a 0,5%, com coeficientes mínimo de 0,14% (amostra 5) e máximo de 0,45% (amostra 1).

Tabela 13: Retenção relativa para a substância de interesse, substância de referência: Solução Padrão de 1-OHP.

Solução	Tempo de Retenção (min)
Solução Padrão	6,3
Amostra 1	6,4
Amostra 2	6,5
Amostra 3	6,3
Amostra 4	6,7
Amostra 5	6,9

Figura 5: A) Cromatograma referente a injeção de 20 μL de branco de reagente
B) Cromatograma referente a injeção de 20 μL de branco da matriz de Urina

Tabela 14 : Avaliação da repetibilidade dos tempos de retenção em diferentes injeções consecutivas de amostras fortificadas.

Amostra Fortificada	T.R.(médio)^a	Desv.Padrão	%CV^b
Amostra 1	6,4	0,029	0,45
Amostra 2	6,5	0,024	0,37
Amostra 3	6,3	0,017	0,27
Amostra 4	6,7	0,024	0,36
Amostra 5	6,9	0,010	0,14

a – Média dos tempos de retenção em minutos, para n=5 injeções

b – Coeficiente de variação

Os resultados obtidos no estudo do branco de reagentes e da amostra fortificada podem ser apreciados nas **Figuras 5 e 6** onde fica claro a ausência de quaisquer picos na região de eluição do metabólito estudado.

5.1.2 – Linearidade de Resposta do Detector de Fluorescência.

Através dos coeficientes de correlação, calculados pelo método dos mínimos quadrados e da observação visual da média dos gráficos obtidos (**Figura 6**), verificou –se que a relação entre a resposta do detector e a concentração de 1-OHP na região estudada é linear. Os valores de r variaram de 0,994 a 0,999 , indicando uma excelente correlação entre as concentrações e as respostas obtidas.

Figura 6: A) Cromatograma referente a injeção de 20 μ L de branco da matriz de urina.

B) Cromatograma referente a injeção de 20 μ L da amostra fortificada.

Curva-Padrão 1-OHP

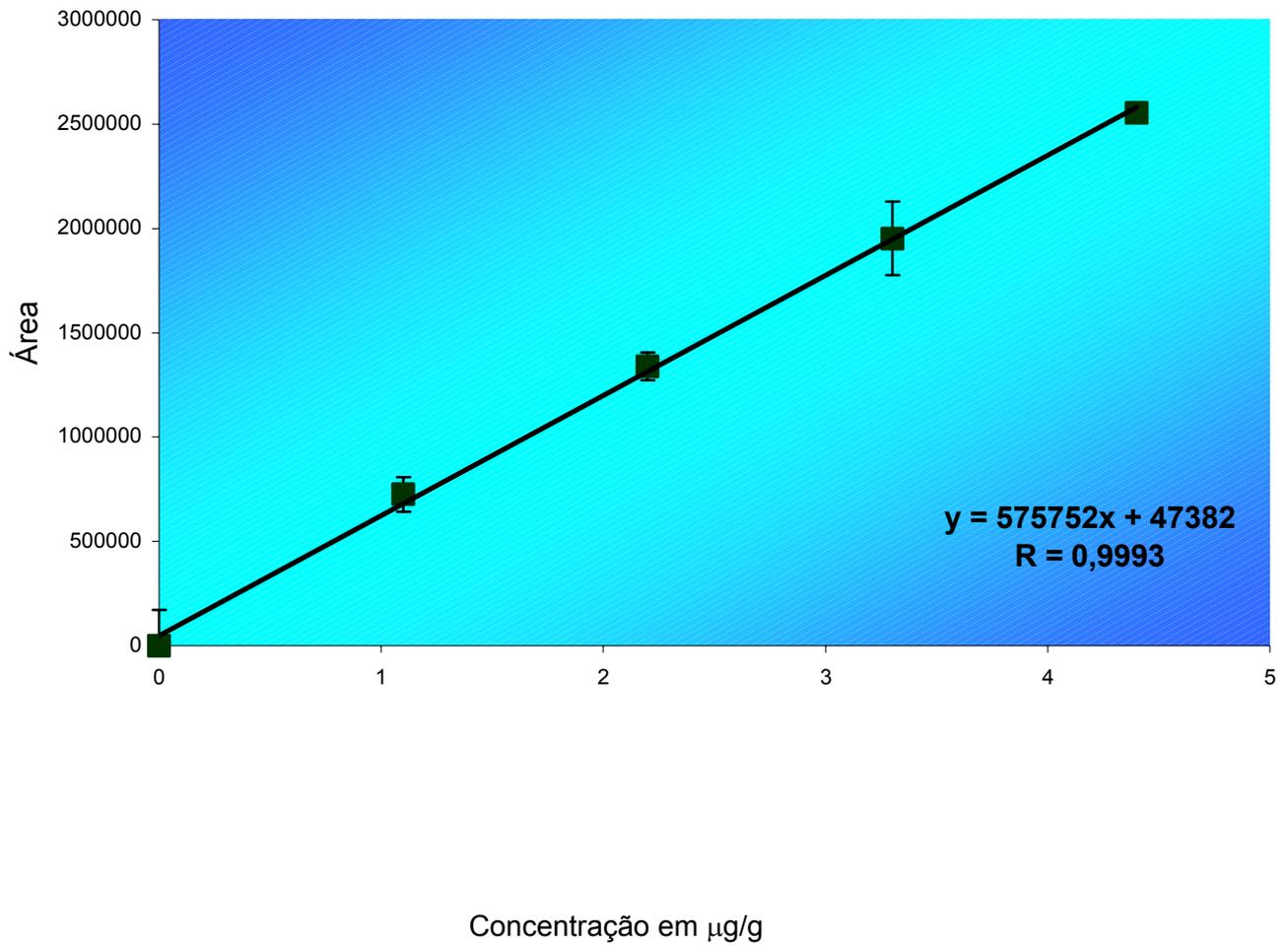


Figura 7): Curva de resposta do detector de fluorescência para diferentes concentrações da substância de interesse na faixa de concentração de 0 a 4,4µg/g.

5.1.3) Exatidão

A exatidão do método analítico, foi avaliada conforme descrito anteriormente (item **4.10**).

Os coeficientes angulares das curvas de concentração obtidos com 1-OHP em metanol ou em amostra de urina são concordantes, indicando um grau de equivalência muito bom (DFG, 1992; Moraes, 1998). Estas curvas foram construídas com concentrações entre $1,1\mu\text{g.L}^{-1}$ a $4,4\mu\text{g.L}^{-1}$, submetendo-se a matriz fortificada ao procedimento analítico completo, enquanto que as amostras das soluções-padrão em metanol eram injetadas diretamente. A **Figura 8** ilustra este estudo, através da curva obtida para a substância 1-OHP.

Os valores de recuperação para cada nível de fortificação estão apresentados na **Figura 9**.

Assim, foi constatado que os valores de recuperação encontrados para a substância encontram-se dentro da faixa aceitável para análise de resíduos, de 70 – 120% (Conacher, 1990; Parker, 1991; Fillion & Thorp, 1995; Codex Alimentarius Commission, 1996).

Na **Figura 6**, pode-se observar os perfis cromatográficos da matriz de urina sem e com adição de 1-OHP.

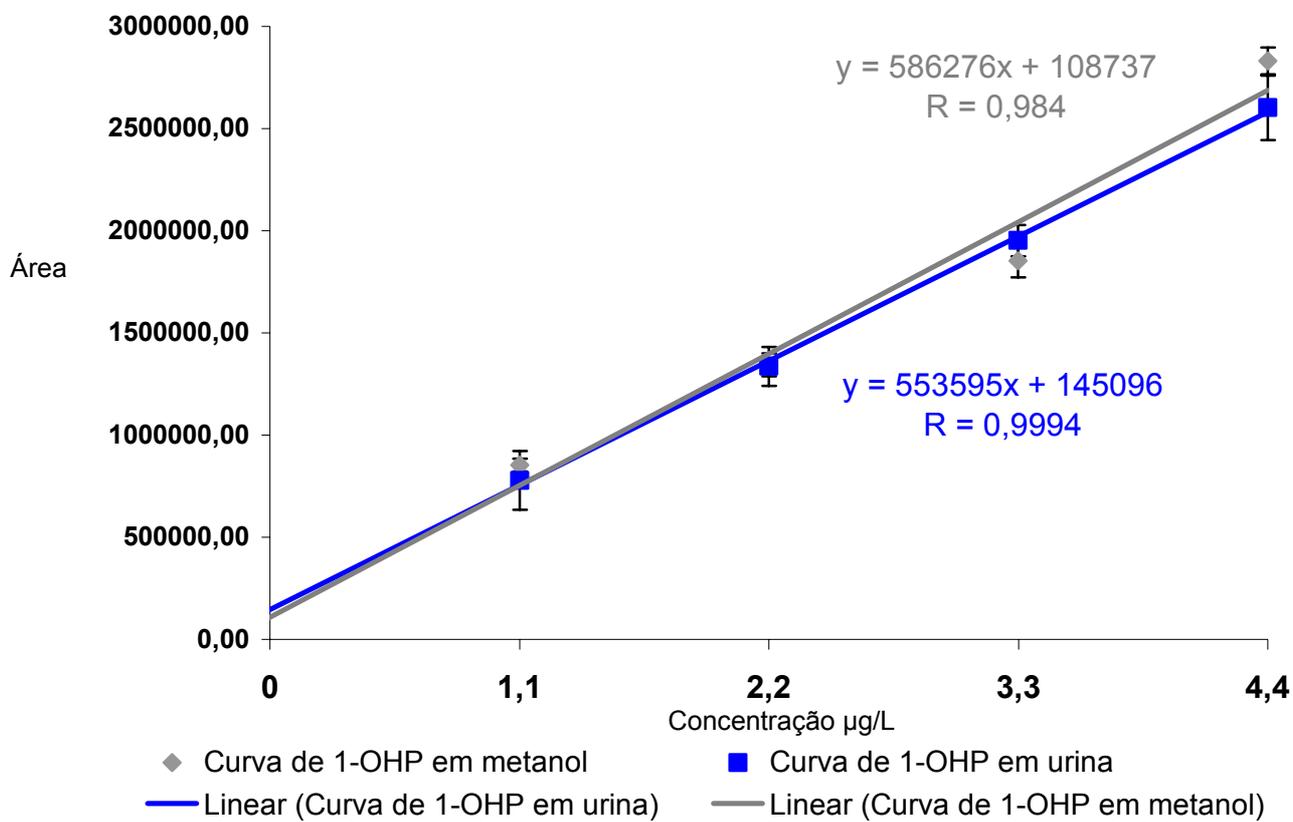


Figura 8) Relação entre “concentração adicionada” e “concentração encontrada”, para 1-OHP.

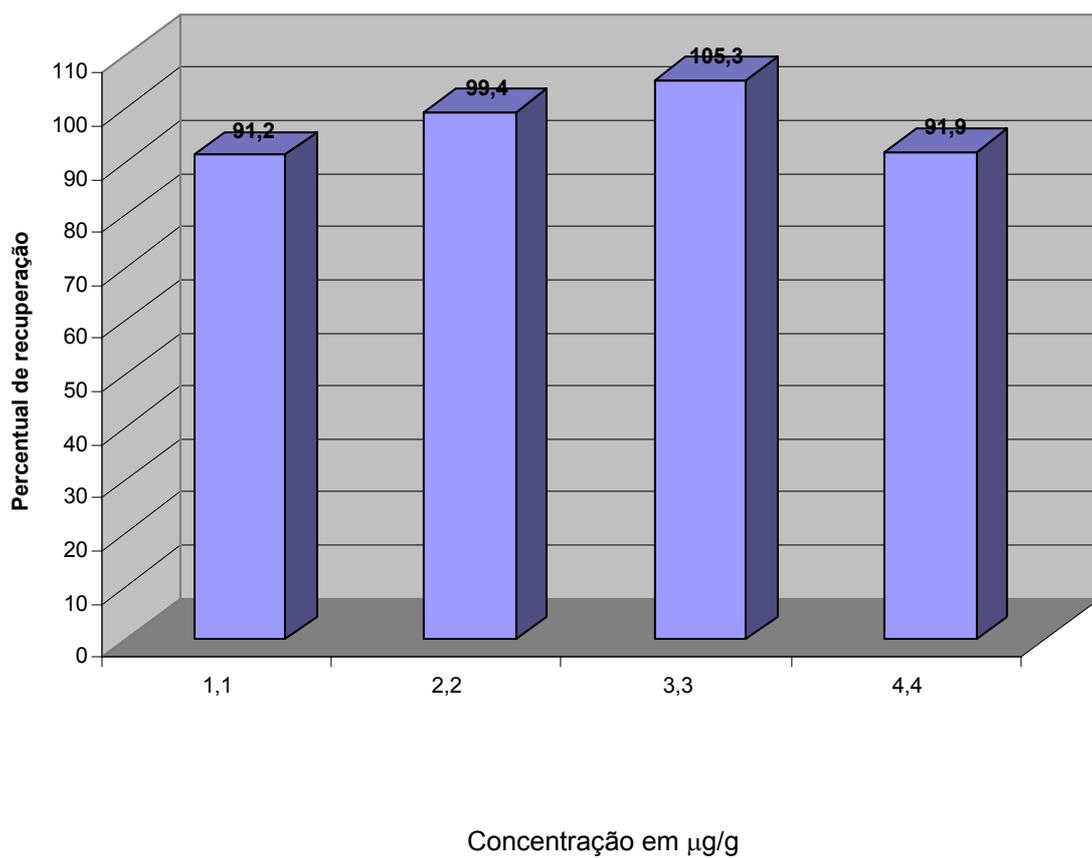


Figura 9 : Valores percentuais da recuperação de 1-OHP obtidos a partir de amostras fortificadas submetidas ao processo analítico completo.

5.1.4) Precisão

A precisão foi avaliada estatisticamente para os diferentes níveis de fortificação para a substância estudada.

Os valores de coeficientes de variação obtidos situaram-se entre 0,124 a 0,339%, Os coeficientes de variação obtidos estão apresentados na **Tabela 15**.

Os coeficientes de variação obtido ao nível do limite de determinação calculado pelo procedimento adotado (0,0055 $\mu\text{g/g}$) para a substância estudada, foi de 0,336.

Tabela 15) Comparação entre os Coeficientes de Variação Relativos (CV%) obtidos nos diferentes níveis de fortificação.

Nível de Fortificação $\mu\text{g/g}$	CV(%)
1,1	0,124
2,2	0,296
3,3	0,266
4,4	0,339

6 - AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS

6.1) Teor de 1-OHP em urina de não fumantes

No total de 25 amostras de indivíduos não fumantes avaliados, somente 4 obtidas de voluntários do sexo masculino apresentaram teores quantificáveis de 1-OHP. Os teores obtidos para estas 4 amostras estão apresentados na **Tabela 16**.

Os valores encontrados para essas 4 amostras, devem-se, muito possivelmente, ao fato destas pessoas residirem em locais com intenso fluxo de veículos e por conviverem com fumantes no local de trabalho ou em sua residência.

Os voluntários convivem com fumantes em ambientes fechados e abertos, tendo portanto, uma exposição pela inalação (passiva) de fumaça de cigarro. Constatou-se que todos os voluntários residem e trabalham em regiões com bastante fluxo veicular, trabalham e moram neste endereço há mais de 3 meses e, os não fumantes, nunca fumaram. Dados mais detalhados obtidos pela análise estatística encontram-se na **Tabela 17**.

Comparando-se estes resultados com os encontrados na literatura (**Tabela 9**), observa-se que os valores de 1-OHP nas amostras do grupo de não fumantes, são valores inferiores aos relatados em outros estudos.

Tabela 16: Concentração de 1-OHP em amostras de urina de não fumantes.

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/g}$ de creatinina).
Amostra 6	0,002
Amostra 8	0,009
Amostra 14	0,008
Amostra 28	0,020

Os resultados correspondem ao valor médio de 2 determinações.

Tabela 17: Alguns dados dos voluntários “não fumantes” que participaram deste estudo

Voluntário Dados	Nº 6	No 8	No 14	No 28
Idade	32	31	48	35
Zona Residencial	Nova Iguaçu	Norte*	Oeste*	Sul*
Distância do ponto de ônibus(m)	50	50	500	100
No de linhas de ônibus	Até 3	Acima de 3	Acima de 3	Acima de 3
Setor na empresa	Zeladoria	Informática	Ambulatório	Laboratório
Jornada de trabalho (h)	Mais de 8	8	8	8
Fumante na residência	não	sim	não	não
Quantos Fumantes	-	01	-	-
Caso de câncer na família	não	não	sim	não

* Zonas do Município do Rio de Janeiro

6.2) Teor de 1-OHP em urina de fumantes.

No total de 16 amostras de indivíduos fumantes avaliados, somente 3 voluntários do sexo masculino apresentaram teores de 1-OHP. Os teores obtidos para as 3 amostras que apresentaram níveis de 1-OHP, estão apresentados na **Tabela 18**. Os dados obtidos pela análise estatística das características da população encontram-se na **Tabela 19**.

Ao observar-se estes valores, verifica-se que os níveis de 1-OHP são maiores que os apresentados no grupo de não fumantes, como era de se esperar.

Comparando-se os dados obtidos para amostras de urina de fumantes, com os resultados encontrados na literatura (**Tabela 9**), observa-se também que os valores de 1-OHP nas amostras do grupo de fumantes, são valores inferiores aos encontrados em estudos descrito pela OMS.

Tabela 18) Concentração de 1-OHP em amostras de urina de fumantes em $\mu\text{g/g}$.por creatinina

Amostra	Concentração ($\mu\text{g/g}$.por creatinina).
Amostra 26	0,186
Amostra 27	0,289
Amostra 34	0,104

Os resultados correspondem ao valor médio de 2 determinações.

O consumo diário de cigarros pelos voluntários fumantes é em média de 20 cigarros. A ausência de quantidades mensuráveis de 1-OHP em amostras de urina dos demais fumantes pode ser devido a fatores específicos individuais tais como variações fisiológicas, polimorfismo genético, diminuição da “clearance” mucociliar, que podem promover uma retenção dos HPAs em seus organismos. A suscetibilidade individual e outros fatores como gênero, etnia, idade, estado de saúde e hábito alimentares são igualmente importantes.

Nenhum voluntário do sexo feminino, fumante ou não, apresentou níveis quantificáveis de 1-OHP urinário pela metodologia utilizada. Provavelmente, isto se

deve ao fato das mulheres apresentarem um maior percentual de tecido adiposo em seu organismo, como os HPAs são altamente lipofílicos, pode-se suspeitar que ocorra uma retenção dos mesmos nestes tecidos diminuindo-se a concentração no tecido sanguíneo e conseqüentemente na urina. O pequeno número de indivíduos avaliados prejudica uma avaliação mais aprofundada destes fatores. Assim, para objetivamente testar-se esta hipótese seria necessário a estratificação tanto do grupo feminino como do masculino em relação ao teor de gordura corpórea o que não era o objetivo deste trabalho. Entretanto esta hipótese traz à tona a possibilidade de que em determinados momentos da vida da mulher possam ocorrer superexposição a estes agentes devido a maciça mobilização de gordura, como, por exemplo, nos processos radicais de emagrecimento ou mesmo na gravidez e lactação.

Tabela 19: Alguns dados dos voluntários “fumantes” que participaram deste estudo

Voluntário	Nº 26	Nº 27	Nº 34
Dados			
Idade	32	67	44
Zona Residencial	Norte*	Sul*	Norte*
Distância do ponto de ônibus(m)	100	10	10
No de linhas de ônibus	Acima de 3	Acima de 3	Acima de 3
Setor na empresa	Laboratório	Pesquisa	Pesquisa
Jornada de trabalho (h)	Mais de 8	Mais de 8	8
Fumante na residência	não	não	não
Caso de câncer na família	sim	não	não

* Zonas do Município do Rio de Janeiro

6.3) Características da População

No total dos voluntários estudados (25 são não fumantes e 16 fumantes), a idade situou-se entre 18 e 67 anos, sendo 51,2% do sexo masculino e 48,8% do sexo feminino.

Participaram da pesquisa trabalhadores dos seguintes setores: ambulatório; informática; laboratório; pesquisa; recepção; secretaria e zeladoria. A **Tabela 20** e a **Figura 10** exemplifica este estudo.

Tabela 20: Atividade dos Voluntários e percentual destas atividades em termos do total da amostragem

Atividade do Voluntário	Frequência	Percentual
Auxiliar de Escritório	1	2,4
Auxiliar de Serviços gerais	3	7,3
Bolsista	1	2,4
Estagiário	9	21,9
Médico	1	2,4
Pesquisador	13	31,8
Química	2	4,9
Recepcionista	1	2,4
Secretária	2	4,8
Técnico em Química	1	2,4
Técnico em Laboratório	2	4,8
Técnico em Segurança	1	2,4
Tecnologista	1	2,4
Telefonista	1	2,4
Zelador	2	4,8
Total	41	100,0

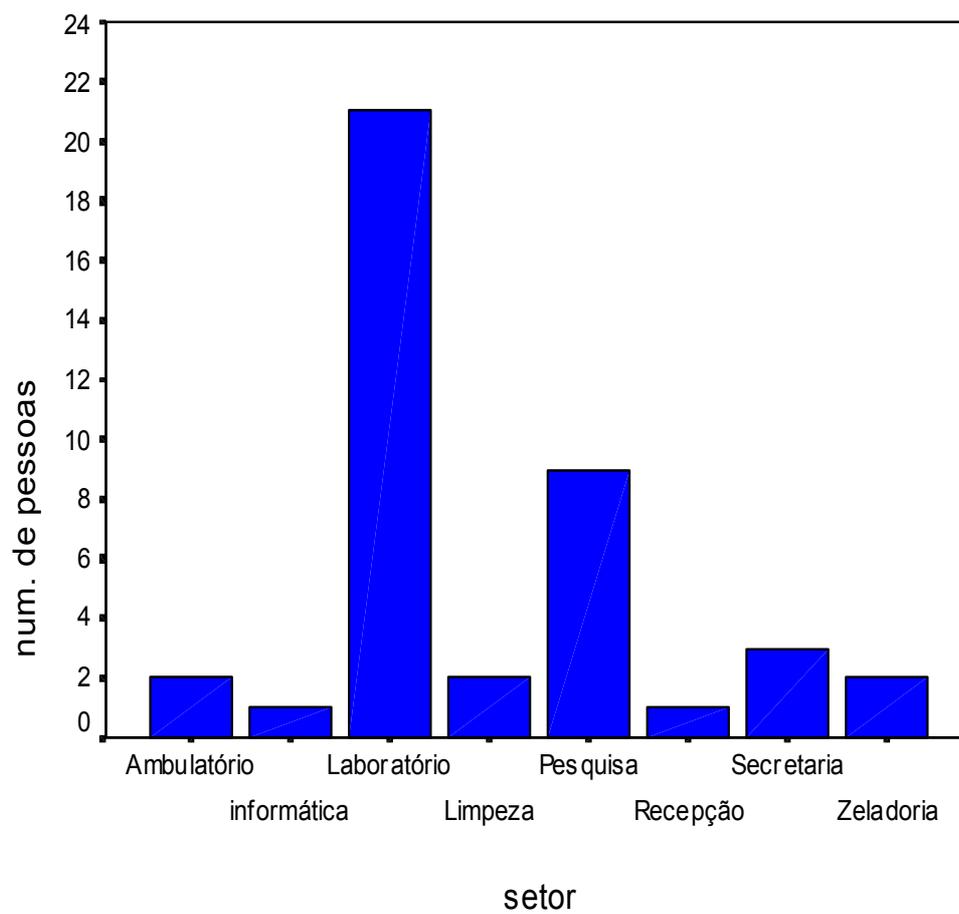


Figura 10: Números de pessoas versus setor que o voluntário trabalha

Dos voluntários avaliados, 90,2% moram na cidade do Rio de Janeiro e 9,8% moram no grande Rio.

Uma análise mais detalhada encontra-se na **Figura 11**.

Em relação ao tempo de residência, observa-se que 95% dos voluntários moram neste endereço a mais de 3 meses e 5% até 3 meses.

A **Tabela 21** apresenta as correlações calculadas entre a variável resposta (concentração de 1-OHP) e as variáveis independentes (idade, distância do ponto de ônibus, número de linhas de ônibus, quantas horas por dia de trabalho, se fuma, presença de fumante dentro da sua casa, tipo de ambiente e algum caso de câncer na sua casa) observados neste estudo.

Os níveis de hidroxipireno apresentaram uma correlação positiva elevada e significativa com a variável “fuma atualmente” ($r=0,876$, $p=0,01$). Embora as outras variáveis não tenham se correlacionado significativamente. Mesmo com o pequeno tamanho da amostra estudada, é interessante observar o sentido da associação com variável “distância do ponto de ônibus”, com $r= -0,373$, ou seja, maiores níveis de contaminação quanto menor for a distância, evidenciando uma coerência nos dados estudados. Os resultados deste estudo são mostrados na **Tabela 21** e na **Figura 12**.

Comportamento semelhante foi observado para a variável “tipo de ambiente”, que avalia a influência da exposição ao cigarro em ambientes abertos ou fechados. A correlação negativa observada ($r= -0,557$, $p= 0,194$) indica que as pessoas que relataram a presença de fumantes em locais fechados de trabalho apresentaram maiores níveis de “hidroxipireno na urina”.

Como apenas a variável “fuma” apresentou correlação significativa com “hidroxipireno na urina”, efetuou-se um teste de tendência, com um coeficiente de determinação calculado de $0,876$ ($p= 0,01$), ou seja, o fumo explica em cerca de 88% os níveis de hidroxipireno na urina, nos indivíduos que participaram do estudo. O modelo de regressão obtido apresentou os seguintes resultados:

$$Y = -0,173 + 0,183 X$$

Y= variável resposta “níveis de hidroxipireno”.

X= variável independente “fuma”.

Observa-se portanto um incremento de $0,183 \mu\text{g/g}$ de creatinina de hidroxipireno na urina dos trabalhadores avaliados neste estudo, pelo fato do indivíduo ser fumante.

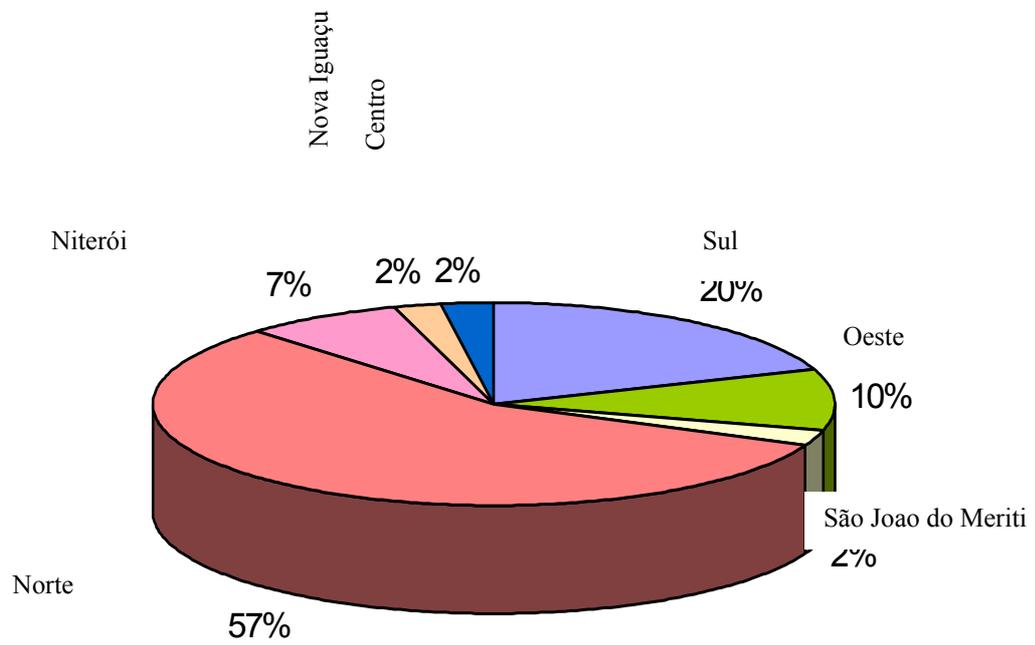


Figura 11: Porcentagem de voluntários por zona residencial.

Tabela 21: Correlações com hidroxipireno por grama de creatinina.

		1-hidroxipireno por grama de creatinina
1-hidroxipireno por grama de creatinina	Correlação de Pearson	1,000
	p	
	N	7
Idade	Correlação de Pearson	,662
	p	,106
	N	7
Distância do ponto de ônibus em metros	Correlação de Pearson	-,373
	p	,410
	N	7
Número de linhas de ônibus	Correlação de Pearson	,340
	p	,456
	N	7
Quantas horas por dia de trabalho	Correlação de Pearson	,592
	p	,161
	N	7
Fuma	Correlação de Pearson	,876
	p	,010
	N	7
Alguém fuma dentro da sua casa	Correlação de Pearson	,314
	Sig. (bicaudal)	,493
	N	7
Tipo de ambiente	Correlação de Pearson	-,557
	p	,194
	N	7
Algum caso de cancer na sua família	Correlação de Pearson	-,370
	p	,415
	N	7

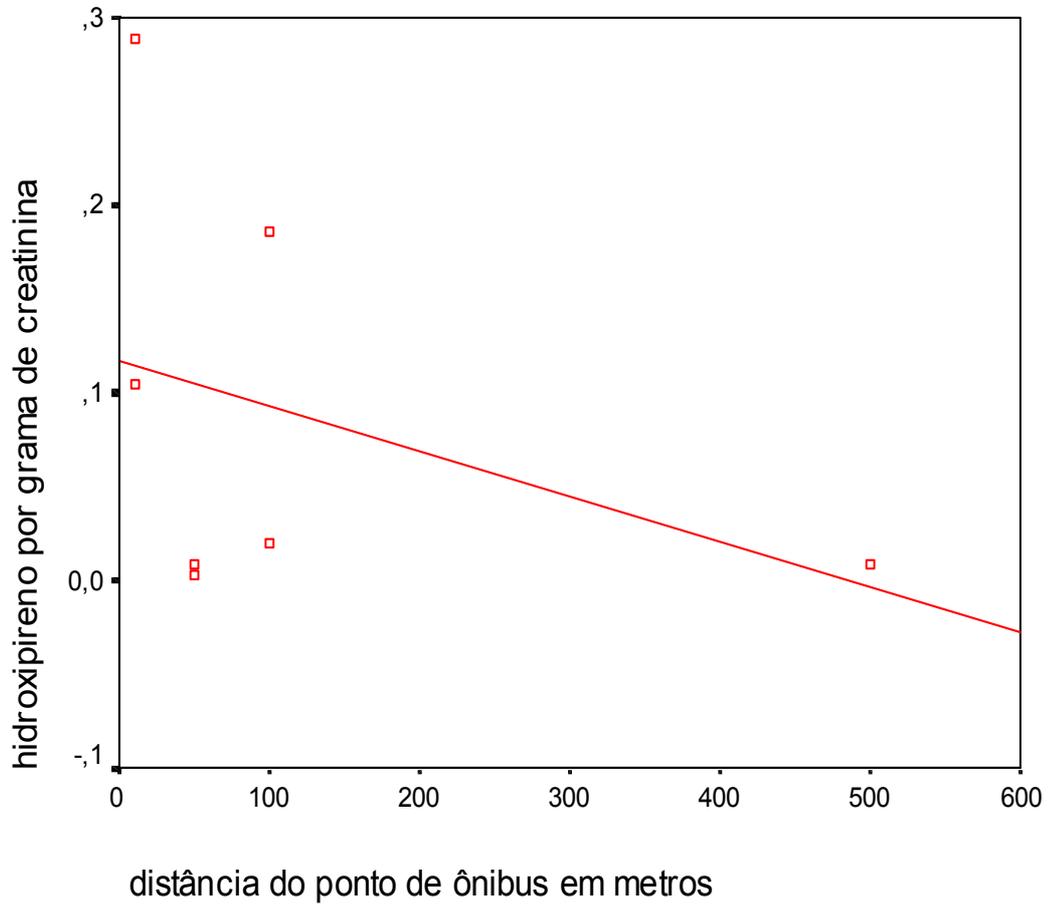


Figura 12: Correlação nível de 1-OHP versus distância do ponto de ônibus.

Tabela 22: Distância do ponto de ônibus em metros

Distância em metros	Frequência	Percentual
10	4	9,8
20	2	4,9
30	1	2,4
50	12	29,3
100	11	26,8
150	1	2,4
200	6	14,6
300	1	2,4
500	2	4,9
600	1	2,4
Total	41	100,0

Tabela 23: Número de linhas de ônibus

	Frequência	Percentual
Até 3	10	24,4
Mais de 3	31	75,6
Total	41	100,0

7 - CONCLUSÕES

O método analítico selecionado apresentou-se adequado para a determinação dos níveis de 1-OHP, sendo seletivo, exato e preciso e com sensibilidade suficiente para a quantificação das amostras. O uso da extração em coluna sep –pak foi eficiente na eliminação de eventuais interferentes na análise.

As amostras de urina de fumantes, apresentaram níveis de 1-OHP superiores às aquelas obtidas nas amostras dos não-fumantes, como esperado.

Os resultados encontrados para o 1-OHP, nas amostras de urina, foram significativamente diferentes entre os fumantes e não fumantes, confirmando que os fumantes estão propensos a níveis superiores de 1-OHP, uma vez que além do hábito de fumar soma-se fatores como a exposição aos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (PAHs) pelo ar atmosférico.

As amostras de urina dos fumantes apresentaram concentrações de 1-OHP, de até 10 vezes a encontrada nas amostras dos não fumantes.

A presença de níveis de 1-OHP observada em algumas amostras de não fumantes pode ser atribuída principalmente a exposição ambiental.

Amostras de urina de fumantes que não apresentaram níveis de 1-OHP, se deve ao fato de fatores específicos individuais como variações fisiológicas, intensidade de inspirar, o pH da urina, variações genéticas e atividade enzimática, suscetibilidade individual e outros fatores, tais como gênero, etnia, idade, estado de saúde, nutrição e poliformismo genético.

Nenhum voluntário do sexo feminino, fumante ou não, apresentou níveis quantificáveis de 1-OHP urinário pela metodologia utilizada. Provavelmente, isto deve ao fato das mulheres apresentarem um maior percentual de tecido adiposo em seu organismo, como os HPAs são altamente lipofílicos, pode-se suspeitar que ocorra uma retenção dos mesmos nestes tecidos diminuindo-se a concentração no tecido sanguíneo e conseqüentemente na urina. O pequeno número de indivíduos avaliados prejudica uma avaliação mais aprofundada destes fatores.

Referências Bibliográficas

- AIR POLLUTION ABATEMENT REVIEW GROUP (APARG). *Report on the abatemente of Toxic Organic Micropollutants (TOMPs) form Stationary Sources*, 1995. Oxfordshire, UK.
- AMES, B. N.; MCLANN, J.; YAMASHAKI, E., 1975. *Mutat. Res.* 31: 347-64.
- ANGERER, J.; MANNUSCHRECK, C.; GÜNDEL, J., 1997. *Int. Arch. Environ. Health*, 70,:365.
- APOSTOLI, P.; MINOIA, C.; ALESSIO, L., 1996. Idrocarburi Policiclici aromatica negli ambienti di vita e di lavoro: esposizione ed effetti, Gargnano, 27 – 29 marzo.
- ARIESE, F.; GOOIJER, C.; VELTHROST, N.H.; HOFSTRAAT, J.W., 1990. *Anal. Chim. Acta* , 232, 245.
- BAEK, S. O.; FIELD, R. A.; GOLDSTONE, M.E.; KIRK, P.W.; LESTER, J.N.; PERRY, R., 1991. *Water, Air, Soil Pollut.* 60: 279-300.
- BEACH, A C.; GUPTA, R.C., 1992. *Carcinogenesis*,13, 1053.
- BERLIN, A.; DRAPER, M.; HEMMINKI, D.; VAINIO, H., 1994. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* , 54, 369.
- BISHOP, J., 1991. *Cell* , 64, 235.
- BRINDLE, I.D.; LI, X-F.; 1990. *J. Chromatogr.* 498: 11-24.
- BOUCHEZ, M.; BLANCHET, D.; HAESELER, F.; VANDECASTEELE, J-P., 1996. *Rev Inst. Fr. Petr.*, 51, 407.
- BLUMER, M.,1976. *Sci. Amer.* 234 : 34-45.

- BHATNAGAR, V. K.; TALASKA, G., 1999. *Toxicology Letters* 108:107-116.
- BIOLOGICAL MONITORING OF CHEMICAL EXPOSURE IN THE WORKPLACE, 1996.
World Health Organization, Geneva 1996, 2: 190 - 203.
- CHASSEAUD, L.F.; in SIES, H.; KEFFERE, B., 1988. Academic Press, p. 391-413.
- CLONFERO, E.; ZORDAN M.; VENIER, P. 1989; *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 61, 363.
- CHASIN, A. A. M.; CHASIN, M. & SALVADOR, M. C., 1994. *Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo*, 30 (2): 49 – 53.
- CICIOILLI, P.; CECINATO, A; BRANCALEONI, E.; FROTONI, M.; ZACCHEI, P.; MIGUEL, H.; VASCONCELLOS, P.C., 1996. *J. Geophys. Res.* 101 (D14): 19567 – 19581.
- COMBARIZA, J.E.; HAJOS, A.K.D.; WINSTON, G.W., 1995. *J. Phys. Chem.*, 99, 14539.
- CONNAY, A.H., 1982. *Cancer Res.* 42, 4875.
- CONACHER, H.B. S., 1990. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 73 (2): 332 – 334.
- DAY, B.W.; SINGH, K., 1994. *Methods Enzimol.*, 231, 674.
- DAY, B.W.; T.T., SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; COGLIN, J.; HAMMOND S.K.; GANN, P.; TANNENBAUM, S.R., 1990. *Chem. Res. Toxicol.*, 3, 340.
- DAY, B.W.; NAYLOR, S.; GAN, L-S.; SAHALI, Y.; NGUYEN, T.T.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S.; TANNENBAUM, S.R., 1991. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 562, 563.
- DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft), 1992., v. 2, pp. 1-23. New York: VCH.
- FARMER, P.B.; NEUMANN, H.G.; HENSCHLER, D., 1987. *Arch. Toxicol.*, 60, 251.

- FERREIRA., JR, M.; BUCHETT. J. P., BURRION J.B., 1994. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, 65, 329.
- FERREIRA., JR, M.F., TAS., S., DELLÓMO, M., 1994. *Occup. Environ. Med.*, 51, 451.
- FERNANDES, M.B.; BRICKUS, L. S. R.; MOREIRA. J.C.; CARDOSO, J.N., 1999. *Reviews on Environmental Health*,14, 145.
- FINLAYSON-PITTS, B. J.; PITTS JR., J.N.; 1997. *Science*, 276: 1045-51.
- FETZER, S.M.; HUANG, C-R.; HARVEY, R.G.; LE BRETON, P.R.,1993.*J.Phys.Chem.*, 97, 2385
- FIEDLER., H., MUCKE, W., 1991., in *The Handbook of Environmental Chemistry, O. Hutzinger* (ed), vol 3G, Berlin.
- GARRIGUES, P.; EWALD, M., 1987. *Chemosphere* ,16: 485.
- GEACINTOV, N.E.; HIBSHOOSH, H., 1984. *Biophys. Chem.*, 20, 121.
- GOOIJER, C.; ARIESE, F.; HOFSTRAAT, J.W.; VELTHROST, N.H., 1994. *Trends in Anal Chem.*,13, 53.
- GOVERNMENT OF SWEDEN, 1995. *Report on the Abatement of toxic micropollutants from stationary sources.*
- GRIMMER, G.; DETTBARN, G.; JACOB, 1993. J.; *Int Arch Occup Environ Health* , 65, 189.
- GUILLÉN, M. D., 1994. *Food additives Contam.* 11(6): 669-684.
- GUPTA, R.C., 1985. *Cancer Res* , 45, 5656.
- HAGEN, I.; HERIKSTADT, B.V., 1988. *Hereditas* ,108,119.
- HARVEY, R.G., 1984. (ed), Polycyclic Hydrocarbons and Carcinogenesis, *American Chemical Society* .

HARVEY, R.G., 1996. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 9, 1-23.

HARVEY, R.G.; DUNNE, F.B., 1978. *Nature* , 273, 566.

HARVEY, R.G.; GEACINTOV, N.E., 1988. *Acc. Chem. Res.*,21, 66.

HARVEY, R.G., 1991. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Carcinogenesis*, Cambridge University Press, Cambridge, England.

HERIKSTADT, B.V.; OVREBO, S.; HAUGEN, A.; HAGEN, 1993. I.; *Carcinogenesis* ,14, 307.

IARC, 1970 – 97. *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Chemicals, Industrial Processes and Industries Associated with Cancer in Humans*, vol. 1 - 55, IARC, Lyon .

INTERNATIONAL PROGRAMME ON CHEMICAL SAFETY (IPCS), 1998. *Environmental Criteria 202. Selected Non-heterocyclic PAHs*, World Health Organization, Geneva.

JACOB, J.; KARCHER, W.; BELLIARDO, J.J.; DUMLER, R.; BOENKE, A., 1991. *Fresenius J. Anal. Chem.*,340, 755.

JONES, D.W.; MATTHEWS, R.S., 1974. *in Progress in Medical Chemistry, edited by Ellis, G. and West, G.B., North Holland, Amsterdam* , vol 10, p. 159.

JONGENELEN, F.J.; ANZION, R.B.; HENDERSON, P.T., 1987 *J. Chromatogr.*, 413, 227.

JONGENELEN, F.J., 1997. *Sci Total Environ* ,199, 141.

JONGENELEN F.J., BOS R.P, ANZION R. B. M., 1986. et al: *Scand J Work Environ Healt.*; 12: 137-143.

JONGENELEN F.J., OOSTERINK. S., 1990. *Br J INd Med* ; 47: 454 – 461.

- KIRKBRIGHT, G.F.; LIMA, C.G., 1974. *Analyst* , 99,338.
- KOZIN, I.; GOOIJER, C.; VELTHROST, N.H.; HELLOU, J.; ZITKO,V., 1996.
Chemosphere, 33, 1435.
- KRULL, I. S. & SWARTZ, M. E., 1998. *LC.GC*, 16 (5): 464 – 467.
- LATIMER J.S.; HOFFMAN, E.J.; HOFFMAN, G.; FASHING; J.L.; QUIMM, 1990. J.G.;
Water, Air, Soil Poll.,52, 1.
- LE BRETON, P.R. HARVEY, R.G., 1985 (ed), American Chemical Society, Washington
DC, p209-2238.
- LEE, H. K.; 1995. *J. Chromatogr.* 710: 79-92.
- LEHR, R.E.; KUMAR, S.; LEVIN, W.; WOOD, A.W.; CHAANG, R.L.; CONEY, A.H.;
YAGI, H.; SAYER, J.M.; JERINA, D.M., HARVEY, 1985. R.G. (ed), *American Chemical
Society, Washington DC*, p. 63-84.
- LI, K.; M.; TODOROVIC, R.; ROGAN, E.C.; CAVALIERI, E.L.; ARIESE, F.; SUH, M.;
JANKOVIK, R.; SMALL, 1995. G.J.; *Biochemistry* ,34, 8043.
- LOPES, W.A.; ANDRADE, J.B., 1996. *Quim. Nova* , 19, 497.
- MACLEOD, M.C.; MANSFIELD, B.K.; SELKIRK, J.K., 1982. *Carcinogenesis* ,3, 1031.
- MACLEOD, M.C.; SELKIRK, 1982. J.C.; *Carcinogenesis* ,3, 287.
- MASTRANGELO, G.; FADDA, E.; MARZIA, 1996. V.; *Environ. Health Persp.*;104, 1166.
- MILLER, J. C. & MILLER, J. N., 1988. A review. *Analyst*, 113: 1351 – 1356.
- MIGUEL, A. H.; FRIEDLANDER, S. K., 1978. *Atmos. Environ.* 12: 2407-2413.
- MIGUEL, A. H.; PEREIRA, P. A. P., 1989. *Aerosol Sci. Technol.* 10: 292-295.

Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: vol. 33, Polynuclear Aromatic Compounds, 1970 –97. Parts 1 and 2, IARC, Lyon.

MORAES, O. M. G., 1998. *Validação de metodologia analítica*. In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE CONTAMINANTES INORGÂNICOS, 6, SIMPÓSIO SOBRE ESSENCIALIDADE DE ELEMENTOS NA NUTRIÇÃO HUMANA, pp. 42 – 50, 1998. Campinas: ITAL.

MOREIRA, J.C.; BAREK, J., 1995. *Quim. Nova*, 18, 362.

MOREIRA, J.C.; KURYIAMA, G.S.; BAREK, J.; APOSTOLI, P., MINOIA, C. and ALESSIO, A., ATTI, Gargnano, 1996, p 63; CVACKA, J.; BAREK, J.; FOGG, A.G.; MOREIRA, J.C.; ZIMA, J.; 1998. *Analyst*, 123, 9R; BAREK, J.; CVACKA, J.; MOREIRA, J.C.; ZIMA, J.; 1996. *Chem. Listy*, 90, 805-817.

MULLER, P., RAHA, D., 1991. Polycyclic aromatic compounds (*PAH XIII*), Bordeaux.

NAKAJIMA, D.; KOJIMA, E.; IWAYA, S.; YOSHIDA, Y.; SUSUKI, J.; SUSUKI, S., 1996. *Environ. Health Perspect.* 103: 103-114.

NARDINI, B.; GRANELLA, M.; CLONFERO, E., 1994. *Mutat. Res.*, 322, 193.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1993. D. C.: National Academy Press. 386 pp.

NETTO, D. P. ; 1999. Determinação de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Amostras Ambientais, *Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil*.

O'NEIL, I.K.; FISHBEIN, K., 1986. *Intern. Environ. Anal. Chem.*, 26, 229.

PAVANELLO, S.; FAVRETTO, D.; BRUGNONE, F.; MASTRANGELO, G.; DAL PRA, G.; CLONFERO, E., 1999. *Carcinogenesis* ,20,431.

PERERA, F., 1997. *Science* , 278, 1068.

- Polycyclic Hydrocarbons and Carcinogenesis, HARVEY, R.G., 1985. (ed), *American Chemical Society, Washington DC*.
- POTT, P; in HAWES, C., COLLINS ., 1962. (eds), *National Cancer Institute Monograph*, 10, 7-13.
- PITTS, JR, J. N.; 1987. *Environ.* 21(12): 2531-2547.
- REDDYN, M.V.; RANDEPATH, K., 1986. *Carcinogenesis* ,7, 1543.
- REUTERVALL, C.; ARINGER, L.; ELINDER, C.G., 1991. *Scand. J. Work Environ. Health* 17, 123.
- SANTELLA, R.M., 1988. *Mutat Res* , 205, 271.
- SARTORELLI, P.; CENNI, A., NOVELLI, M.T.; SCIARRA, G.F.; in APOSTOLI, P.; MINOIA, C.; ALESSIO, L., 1996. (eds), *ATTI, Gargnano*, p 199.
- SHEPPERS, P.T.J.; BEENAKKERS, M.F.M.; de LEPPER, A.J.G.M.; BOS, R.P., 1992. *Fresenius J. Anal. Chem.*,343,169.
- SHEPPERS, P.T.J.; THUIS, H.J.T.M.; MARENS, M.H.J.; BOS, P.P., 1994. *Toxicol. Lett.*,72, 191.
- SINGH, P. P.; BATTU, R. S.; SINGH, B. & KALRA, R. L., 1993. *Toxicology*, 50: 798 – 801.
- SELKIRK, J.K., 1980. in *Carcinogenesis: A Comprehensive Survey*, *Slaga, T.J.* (ed) vol 5 (Modifiers of Chemical Carcinogenesis) Raven Press, N. York.
- SORSA, M.; HEMMINKI, K.; VAINIO, H., 1982. *Teratog. Carcinog. Mutag.*,2, 137.
- STANSBURY, K.H.; FLESHER, J.W., 1994. Gupta, R.C.; *Chem. Res. Toxicol.*, 7, 254.
- STIBOROVÁ, M.; FREI, E.; BIELER, C. A.; SCHMEIZER, H.H., 1998. *Chem Listy* , 92, 661.

- SWARTZ, M. E. & KRULL, I. S., 1998. *Technology*, 2 (3): 12 – 20.
- TALASKA, G.; UUDERWOOD, P.; MAIER, A ; LEWTAS, J.; ROTHMAN, N.; JAEGER, M., 1996. *Environ. Health Persp.*, 104, 901.
- TRIEBIG, G.; SCHALLER, H.K.; WAGNER, M.; WELTLE, D.; MOSER, W.; VALENTIN, H., 1988. *Sci. Total Environ.*, 71, 231.
- URANO, S.; PRICE, H.L.; FETZER, S.M.; BRIEDS, A.V.; MILLIMAN, A.; LEBRETON, P.R., 1991. *J. Am. Chem. Soc* (1991), 113, 3881.
- VANROOIJ, J.G.; BODELIER-BADE, M.M., JONGENEELLEN, F.J., 1993. *Br J Ind Med* (1,50, 623.
- WHITE, C.M.(ed), 1985. *Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, Huethig, Heidelberg .
- WHITE, K.L.J.R., 1986. *Environ. Carcin. Revs (J. Environ. Sc. Hlth)*, C4, 163.
- WILD, S.R.; JONES, K.C., 1995. *Environm. Poll.*, 88, 91.
- WISHNOK, J.S., 1992. *Anal. Chem.* 64, 1126 A.
- VAN ROOIJ J. G. M., VEEGER M. M. S., BODELIER-BADE M. M, 1994. *Arch Occup Environ Health* ; 66: 55-65.

ANEXO 1

ESTUDO I – INGRESSO QUESTIONÁRIO

Como voluntário, o Sr. está sendo solicitado a participar de uma investigação científica, patrocinada pela Fundação Oswaldo Cruz, com o objetivo de determinar a concentração de 1-hidroxi-pireno presente na sua urina. Essa substância é produzida pelo corpo humano quando algumas substâncias presentes no cigarro (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) penetram no organismo através do ar contaminado. Nessa pesquisa iremos avaliar o grau de contaminação dos trabalhadores do CESTEH/FIOCRUZ através dos níveis de 1-hidroxi-pireno presente na urina.

Horário de início da aplicação do questionário:

Número:

Data:/...../.....;

Instituição: pública

I. IDENTIFICAÇÃO DO TRABALHADOR:

Nome: _____

Idade: _____

Data de nascimento: -----/-----/-----

1. Você mora na cidade do Rio de Janeiro?

1 - sim 2 - não _____

2. Endereço: -----

3. Há quanto tempo você reside neste endereço?

até 3 meses acima de 3 meses

4. Em relação a sua residência existe alguma indústria neste lugar ?

sim não

5. O que esta Indústria produz ?

6. A que distância fica o ponto do ônibus mais próximo de sua casa?

7. Quantas linhas de ônibus passam?

até 3 mais de 3

8. Atividade que exerce na empresa? -----

9. Qual é o setor que você trabalha? -----

10. Sempre exerceu esta atividade?

sim não

em caso negativo passe para a pergunta 11

Descreva essa função:

11. Qual a outra atividade desenvolvida? -----

Descreva essa função:

12. Há quanto tempo você está neste trabalho?

até 3 meses acima de 3 meses

13. Há quanto tempo você está neste setor?

até 3 meses acima de 3 meses

14. Normalmente quantas horas por dia de trabalho?

4 h 8 h mais de 8 h

III) HÁBITOS

15. Você fuma atualmente?

sim não

se não passe para a pergunta 17

16. Quantos cigarros por dia?

até 5 mais de 5 não sabe

17. Já fumou anteriormente?

sim não

se não passe para a pergunta 19

18. Há quanto tempo você parou?

menos de 3 meses mais de 3 meses

19. Alguém fuma dentro da sua casa ?

sim não

20. Quantas pessoas fumam? -----

21. No ambiente em que você frequenta (escola, trabalho) tem fumantes?

sim não

se não, passe para a pergunta 23.

22. Descreva o ambiente :

fechado aberto

23. Você bebeu no almoço?

sim não

24. Você toma algum medicamento de uso contínuo?

sim não

25. Qual ?

III-ANTECEDENTES HEREDITÁRIOS

26. Já teve algum caso de câncer na família?

sim não não sabe

26. Quantos?

	SIM	NÃO	NÃO SABE
Avô paterno			
Avó paterna			
Avô materno			
Avó materno			
Pai			
Mãe			
Irmã(o)			

ANEXO 2

Termo de Consentimento

De acordo com as Normas da Resolução nº 196, do Conselho Nacional de Saúde de 10 de outubro de 1996.

Título do Projeto: "Avaliação do nível de 1-hidroxiperino urinário em trabalhadores do CESTEHE/FIOCRUZ,".

Instituições participantes do projeto:

- Centro de Estudo da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana - Escola Nacional de Saúde Pública - Fundação Oswaldo Cruz

Coordenador da Pesquisa: Josino Costa Moreira

Nome Voluntário: _____

Endereço:

Este termo fornece informações sobre o problema de saúde em estudo, os exames, benefícios e inconvenientes que poderão acontecer durante este projeto.

O Centro de Estudos de Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana - CESTEHE, é um centro da Escola Nacional de Saúde Pública - ENSP, da Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, do Ministério da Saúde, que tem por objetivos realizar pesquisas, atividades de ensino e criar tecnologias, na área da Saúde Pública

Um dos projetos do CESTEHE é a avaliação da exposição humana a compostos policíclicos aromáticos no ambiente, com fumantes e não fumantes do CESTEHE. O objetivo é determinar o nível de contaminação humana por estes compostos através da determinação da concentração urinária da substância 1-hidroxipireno. No caso da identificação de elevados níveis de contaminação, algumas soluções serão oferecidas. O problema de saúde correlacionado com a exposição humana a alguns policíclicos aromáticos é a suspeita que estes compostos sejam carcinogênicos, embora não exista ainda comprovação científica para a espécie humana.

Em um período de 6 meses faremos coletas de urina. Caso os seus resultados estejam acima dos valores normais, serão necessários novos exames para confirmação dos resultados. A urina será coletada em frasco plástico adequado, com capacidade para 50 ml (aproximadamente uma xícara de café).

ETAPAS DO TRABALHO EM PARCERIA

1ª Etapa: contato com as empresas e apresentação da proposta de trabalho;
Considerando a aceitação em participar do trabalho, as etapas seguintes serão implementadas.

2ª Etapa: solicitação da colaboração dos trabalhadores para este trabalho;

3ª Etapa: coleta de amostras de urina ;

4ª Etapa: apresentação e discussão dos resultados obtidos.