



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
(UNIRIO)

JULIANA BARROSO GOMES

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO AO BENZENO EM
TRABALHADORES DE POSTOS DE REVENDA DE COMBUSTÍVEIS NO MUNICÍPIO
DO RIO DE JANEIRO**

RIO DE JANEIRO

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO- UNIRIO

INSTITUTO BIOMÉDICO – IB

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

JULIANA BARROSO GOMES

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO AO BENZENO EM
TRABALHADORES DE POSTOS DE REVENDA DE COMBUSTÍVEIS NO MUNICÍPIO
DO RIO DE JANEIRO**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação, apresentado no Instituto Biomédico da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito parcial para a obtenção de grau de Bacharel em Biomedicina. Área de concentração: Toxicologia.

Orientadora acadêmica: Prof.^a Dra. Marcia Sarpa de Campos Mello.

Orientadora científica: Prof.^a Dra. Barbara Rodrigues Geraldino.

RIO DE JANEIRO

2019

Catálogo informatizada pelo(a) autor(a)

G633 Gomes, Juliana Barroso
Avaliação de biomarcadores de exposição ao benzeno em trabalhadores de postos de revenda de combustíveis no município do Rio de Janeiro / Juliana Barroso Gomes. -- Rio de Janeiro, 2019.
117 p.

Orientadora: Marcia Sarpa de Campos Mello.
Coorientadora: Barbara Rodrigues Geraldino.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Graduação em Biomedicina, 2019.

1. Ácido s-fenilmercaptúrico. 2. Ácido trans, trans-mucônico. 3. Benzeno. 4. Exposição ocupacional. 5. Postos de revenda de combustíveis. I. Mello, Marcia Sarpa de Campos, orient. II. Geraldino, Barbara Rodrigues, coorient. III. Título.

JULIANA BARROSO GOMES

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO AO BENZENO EM
TRABALHADORES DE POSTOS DE REVENDA DE COMBUSTÍVEIS NO MUNICÍPIO
DO RIO DE JANEIRO

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação
apresentado ao Instituto Biomédico da Universidade
Federal do Estado do Rio de Janeiro, como requisito
parcial para a obtenção do grau de Bacharel em
Biomedicina. Área de concentração: Toxicologia.

Aprovado em: 01/07/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Marcia Sarpa de Campos Mello (Orientadora Acadêmica), Doutora em Ciências,
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro – UNIRIO.

Prof.^a Barbara Rodrigues Geraldino (Orientadora Científica), Doutora em Ciências, Instituto
Nacional de Câncer – INCA.

Prof. Rafael Braga Gonçalves, Doutor em Ciências, Universidade Federal do Estado do Rio
de Janeiro – UNIRIO.

Prof.^a Katia Soares da Poça, Doutora em Ciências, Instituto Nacional de Câncer – INCA.

Dedico esta monografia aos meus pais, Deizi Gomes e Marcelo Gomes, que foram os verdadeiros protagonistas dessa conquista. Sem vocês nada disso seria possível, obrigada por tudo que fazem por mim. Meu amor e gratidão por vocês serão eternos.

AGRADECIMENTOS

Ao longo desses anos de faculdade tive pessoas ao meu lado que foram fundamentais para que eu conseguisse continuar lutando pelo meu sonho. Cada uma teve um papel essencial nessa caminhada e graças a todo esse apoio posso estar hoje aqui agradecendo por essa conquista.

Assim, gostaria de dedicar meus agradecimentos:

A Deus, por todas as bênçãos, proteção e por sempre me iluminar nos momentos difíceis.

A minha mãe, Deizi, ao meu pai, Marcelo, e ao meu irmão, Luis Felipe, que sempre estiveram ao meu lado em todos os momentos. Obrigada por toda a dedicação, esforço, educação, paciência e por sempre acreditarem em mim.

Ao meu namorado, Lucas, meu grande companheiro nessa jornada. Obrigada por cada incentivo, cada palavra e gesto de apoio, por nunca me deixar desistir e por estar ao meu lado sempre, dividindo os melhores e os piores momentos também.

A Barbara Geraldino, que é muito além de uma orientadora científica, se tornou uma amiga ao longo desses anos, carinhosamente minha mãe acadêmica. Obrigada por todo o aprendizado, experiências e conhecimentos compartilhados. Sem ela nada disso seria possível.

A minha orientadora acadêmica, Marcia Sarpa, pela oportunidade, pelo apoio, dedicação e por confiar tanto no meu trabalho e na minha capacidade. Obrigada por tudo que faz por mim.

A todos os meus amigos e a família LMA, que contribuí imensamente no desenvolvimento deste projeto. Obrigada a todos os integrantes desse incrível grupo, por toda a ajuda, apoio e companheirismo ao longo dessa caminhada. Agradeço também aos companheiros de andar, família LBE, em especial, Rafael Braga, por ter os melhores conselhos e por sempre me ajudar nos momentos de maiores dúvidas.

A todos os professores da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) que contribuíram para a minha formação acadêmica.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

(José de Alencar)

GOMES, Juliana Barroso. **Avaliação de biomarcadores de exposição ao benzeno em trabalhadores de postos de revenda de combustíveis no município do Rio de Janeiro.** 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Instituto Biomédico, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

RESUMO

A maioria dos casos de câncer está relacionada à exposição a agentes carcinogênicos como o benzeno (IARC, Grupo I), presente na gasolina. O indicador biológico de exposição a esta substância é o ácido trans, trans-mucônico (AttM) (Portaria 34, 12/20/01), mas o mesmo sofre influência de outros fatores, como o tabagismo, alimentação e a coexposição ao tolueno. Para superar essa limitação, vem sendo proposto o monitoramento desses trabalhadores expostos através da determinação do ácido s-fenilmercaptúrico (AFM), um metabólito específico do benzeno. O objetivo deste estudo consistiu em avaliar o nível de exposição de trabalhadores de postos de revenda de combustíveis (PRC) no município do Rio de Janeiro ao benzeno através da utilização de biomarcadores de exposição (AFM e AttM). Tratou-se de um estudo epidemiológico do tipo transversal com 43 trabalhadores de PRC (grupo exposto). O grupo controle foi formado por 25 trabalhadores não expostos ocupacionalmente. Informações sociodemográficas, clínicas, ocupacionais e de exposição a substâncias químicas foram coletadas por meio de questionários, assim como a coleta de amostras biológicas (urina) no final do dia de trabalho. A metodologia do AttM foi implementada, validada e padronizada obtendo a equação da curva de calibração ($\text{Área} = 127536x$) e $R^2 = 0,9957$, assim como a metodologia do AFM ($\text{Área} = 14026x$ e $R^2 = 0,9958$). Após a análise da creatinina urinária, 4 participantes do grupo exposto e 4 participantes do grupo controle foram excluídos do estudo por apresentarem valores de creatinina fora da faixa permitida. Em relação a análise das amostras de urina dos participantes, os valores médios de AttM e AFM urinário foram muito maiores no grupo exposto (AttM= 1,02 mg/g creatinina e AFM= 17,62 $\mu\text{g/g}$ creatinina) quando comparados ao grupo controle (AttM= 0,14 mg/g creatinina e AFM= 1,26 $\mu\text{g/g}$ creatinina), sendo os maiores valores encontrados na Zona Sul. Houve correlação significativa entre ambos os indicadores biológicos. Os níveis de AttM urinário também apresentou correlação significativa em relação a localidade dos postos, talvez por sofrer influência de fatores ambientais. A frequência dos indivíduos com AttM urinário acima do limite biológico aceitável (0,5 mg/g creatinina) foi maior quando comparado ao indicador biológico AFM (limite recomendado de 25 $\mu\text{g/g}$ creatinina). Os altos níveis de excreção dos metabólitos do benzeno confirmam a alta exposição destes indivíduos a este solvente, sendo necessárias medidas de prevenção e vigilância da saúde do trabalhador que minimizem os riscos e danos à saúde.

Palavras-chave: Ácido s-fenilmercaptúrico; Ácido trans, trans-mucônico; Benzeno; Exposição ocupacional.

GOMES, Juliana Barroso. **Evaluation of biomarkers of benzene exposure in fuel resale jobs in the city of Rio de Janeiro.** 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Instituto Biomédico, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2019.

ABSTRACT

Most cancer cases are related to exposure to carcinogenic agents such as benzene (IARC, Group I), present in gasoline. The biological indicator of exposure to this substance is trans, trans-muconic acid (AttM) (Portaria 34, 12/20/01), but it is influenced by other factors, such as smoking, feeding and coexposure to toluene. To overcome this limitation, the monitoring of these exposed workers through the determination of s-phenylmercapturic acid (AFM), a benzene-specific metabolite, has been proposed. The objective of this study was to evaluate the level of exposure of workers at gasoline resellers in the city of Rio de Janeiro to benzene through the use of biomarkers of exposure (AFM and AttM). It was a cross-sectional epidemiological study with 43 workers of resellers of fuels (exposed group). The control group consisted of 25 workers who were not occupationally exposed. Sociodemographic, clinical, occupational and chemical exposure data were collected through questionnaires, as well as the collection of biological samples (urine) at the end of the workday. The AttM methodology was implemented, validated and standardized by obtaining the equation of the calibration curve (Area= 127536x) and $R^2= 0.9957$, as well as the AFM methodology (Area= 14026x and $R^2= 0.9958$). After urinary creatinine analysis, 4 participants from the exposed group and 4 participants from the control group were excluded from the study because they presented creatinine values outside the allowed range. Regarding the analysis of urine samples from the participants, the mean values of AttM and urinary AFM were much higher in the exposed group (AttM= 1.02 mg/g creatinine and AFM= 17.62 $\mu\text{g/g}$ creatinine) when compared to the control group (AttM= 0.14 mg/g creatinine and AFM= 1.26 $\mu\text{g/g}$ creatinine), being the highest values found in the South Zone. There was a significant correlation between both biological indicators. The urinary AttM levels also showed a significant correlation in relation to the locality of the stations, perhaps due to influence of environmental factors. The frequency of subjects with urinary AttM above the acceptable biological limit (0.5 mg/g creatinine) was higher when compared to the AFM biological indicator (recommended limit of 25 $\mu\text{g/g}$ creatinine). The high levels of excretion of the benzene metabolites confirm the high exposure of these individuals to this solvent, being necessary measures of prevention and vigilance of the health of the worker that minimize the risks and damages to the health.

Keywords: S-phenylmercapturic acid; Trans-, trans-muconic acid; Benzene; Occupational exposure.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Fórmula simplificada do benzeno.....	18
Figura 2- Representação simplificada do metabolismo hepático do benzeno.....	25
Figura 3- Áreas de planejamento do município do Rio de Janeiro.	33
Figura 4- Coleta de amostras de urina nos postos de revenda de combustíveis.....	35
Figura 5- Amostras de urina preparadas para a determinação da creatinina urinária através da leitura de absorvância no espectrofotômetro UV-VIS.	36
Figura 6- Esquema de extração em fase sólida.	37
Figura 7- Sistema de EFS composto pelo Manifold® (1), cartucho (2) e bomba à vácuo (3)	38
Figura 8- Hidrólise do ácido pré-mercaptúrico em ácido s-fenilmercaptúrico.	39
Figura 9- Etapa da secagem das amostras sob fluxo de nitrogênio.....	40
Figura 10- Esquema simplificado da técnica para a determinação do AFM.....	41
Figura 11- Cromatograma do AttM evidenciando o pico do analito em 14,825 minutos.....	45
Figura 12- Curva de calibração do AttM obtida a partir de 5 concentrações.....	45
Figura 13- Cromatogramas obtidos a partir do método 1, onde A) picos característicos dos compostos presentes no metanol sem adição de AFM (branco); B) solução padrão com adição de AFM.....	48
Figura 14- Cromatogramas obtidos a partir do método 2, onde A) picos característicos dos compostos presentes no metanol sem adição de AFM (branco); B) solução padrão com adição de AFM.....	48
Figura 15- Cromatogramas obtidos a partir do método 4, onde A) picos característicos dos compostos presentes na fase móvel (pH 3,0) sem adição de AFM (branco); B) solução padrão com adição de AFM.	49
Figura 16- Cromatogramas obtidos a partir do método 5, onde A) picos característicos dos compostos presentes na fase móvel (pH 3,0) sem adição de AFM (branco); B) solução padrão com adição de AFM.	49
Figura 17- Cromatogramas obtidos a partir do método 6, onde A) picos característicos dos compostos presentes na fase móvel sem adição de AFM (branco); B) solução padrão com adição de AFM.	49
Figura 18- Cromatogramas obtidos a partir do método 7, onde A) picos característicos dos compostos presentes na fase móvel sem adição de AFM (branco); B) solução padrão com adição de AFM.	50

Figura 19- Cromatogramas obtidos a partir do método 8, onde A) picos característicos dos compostos presentes na fase móvel sem adição de AFM (branco); B) solução padrão com adição de AFM.	51
Figura 20- Cromatogramas obtidos a partir da adição de 400 uL de NaOH 2M antes da etapa de derivatização, onde A) picos característicos dos compostos presentes na fase móvel sem adição de AFM (branco); B) solução padrão com adição de AFM.....	51
Figura 21- Curva de calibração do AFM em fase móvel obtida a partir de 9 concentrações.	52
Figura 22- Curva de calibração do AFM em urina obtida a partir de 6 concentrações.....	53
Figura 23- Cromatograma do AttM evidenciando o pico do analito em 7,165 minutos.....	53
Figura 24- Nível de creatinina urinária (g/L) dos trabalhadores expostos ocupacionalmente ao benzeno, evidenciando os limites adotados de 0,3 e 3,0 g/L.....	54
Figura 25- Nível de creatinina urinária (g/L) dos trabalhadores não expostos ocupacionalmente ao benzeno (grupo controle), evidenciando os limites adotados de 0,3 e 3,0 g/L.....	54
Figura 26- Boxplot dos níveis de AttM urinário (mg/g creatinina) nos postos da Zona Sul e do Centro.	59
Figura 27- Boxplot dos níveis de AFM urinário (μ g/g creatinina) nos postos da Zona Sul e do Centro.	61
Figura 28- Níveis de AttM urinário e frequência de indivíduos com os valores de AttM superiores ou inferiores a 0,5 mg/g creatinina na Zona Sul (à esquerda) e no Centro (à direita).	62
Figura 29- Níveis de AttM urinário e frequência de indivíduos com os valores de AttM superiores ou inferiores a 0,5 mg/g creatinina no grupo não exposto ocupacionalmente ao benzeno.....	62
Figura 30- Níveis de AFM urinário e frequência de indivíduos com os valores de AFM superiores ou inferiores a 25 μ g/g creatinina na Zona Sul (à esquerda) e no Centro (à direita).	63
Figura 31- Níveis de AFM urinário e frequência de indivíduos com os valores de AFM superiores ou inferiores a 25 μ g/g creatinina no grupo não exposto ocupacionalmente ao benzeno.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Resumo das condições cromatográficas para análise do AttM.	38
Tabela 2- Resumo das condições cromatográficas para análise do AFM.	41
Tabela 3- Características da população de estudo.	55
Tabela 4- Sinais e sintomas declarados pelos participantes da pesquisa (Grupo não exposto e exposto).	57
Tabela 5- Distribuição do AttM em trabalhadores expostos e não expostos.....	59
Tabela 6- Distribuição do AFM em trabalhadores expostos e não expostos.....	60
Tabela 7- Relação entre os níveis dos biomarcadores (AttM e AFM) e o grupo exposto e não exposto.....	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Agentes classificados pela Monografia da IARC.	19
Quadro 2- Estimativa do número de casos incidentes de câncer e morte relacionada a esta doença de 2018 a 2040 no mundo.	21
Quadro 3- Estimativa do número de casos incidentes de câncer em 2018 no Brasil.	21
Quadro 4 - Levantamento bibliográfico específico para os biomarcadores urinários na base de dados Pubmed e Portal Periódicos CAPES/MEC.	27
Quadro 5- Etapa de adição de reagentes para a determinação da creatinina urinária.	36
Quadro 6- Métodos testados para a implementação da metodologia do AFM.	47
Quadro 7- Teste de normalidade para níveis de AttM urinário nos grupos de estudo.	59
Quadro 8- Teste de normalidade para níveis de AFM urinário nos grupos de estudo.	61
Quadro 9- Correlação entre os níveis de AFM e AttM e entre os níveis e o grupo exposto...	64

LISTA DE ABREVIATURAS

AFM	Ácido s-fenilmercaptúrico
AP	Área de Planejamento
AttM	Ácido Trans, Trans-Mucônico
CYP2E1	Citocromo P450 2E1
EFS	Extração em Fase Sólida
GSH	Glutationas
GSTM1	Glutathione S-transferase Mu 1
GSTT1	Glutathione S-transferase teta-1
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HPLC-MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas
HPLC-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector UV/visível
IARC	Agência Internacional de Pesquisa em Câncer
IBE	Indicador Biológico de Exposição
LD	Limite de Detecção
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LQ	Limite de Quantificação
MB	Monobromobimane
NaOH	Hidróxido de Sódio
PPB	Parte Por Bilhão
PRC	Postos de Revenda de Combustíveis
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SNC	Sistema Nervoso Central
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UV-VIS	Ultravioleta-Visível

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	Micrograma
$\mu\text{g/g}$	Microgramas por Grama
$\mu\text{g/L}$	Microgramas por Litro
$\mu\text{g/mL}$	Microgramas por Mililitro
μL	Microlitros
μm	Micrometros
λ	Comprimento de Onda
L	Litro
mg	Miligramas
mg/g	Miligramas/grama
mg/L	Miligramas por litro
min	Minutos
mL	Mililitro
mL/min	Mililitros por Minuto
mm	Milímetros
nm	Nanômetro
Nº	Número
°C	Grau Celsius
PPB	Parte Por Bilhão
T_R	Tempo de Retenção
v/v	Volume por Volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 <i>Benzeno</i>	18
2.2 <i>Benzenismo</i>	19
2.3 <i>Câncer</i>	20
2.4 <i>Postos de Revenda de Combustíveis</i>	21
2.5 <i>Monitoramento Biológico</i>	22
2.6 <i>Ácido trans, trans-mucônico</i>	23
2.7 <i>Ácido s-fenilmercaptúrico</i>	26
2.8 <i>Validação de métodos analíticos</i>	27
2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	29
3. OBJETIVOS	30
3.1 <i>Objetivo Geral</i>	30
3.2 <i>Objetivos Específicos</i>	30
4. METODOLOGIA	31
4.1 <i>Instrumentos e Aparatos utilizados</i>	31
4.2 <i>Padrões e reagentes</i>	32
4.3 <i>Local de estudo</i>	33
4.4 <i>População de estudo</i>	34
4.5 <i>Coleta de dados e das amostras</i>	35
4.6 <i>Análise da creatinina urinária</i>	35
4.7 <i>Preparação das amostras</i>	36
4.8 <i>Implementação, validação e análise do AttM</i>	37
4.9 <i>Metodologia do AFM</i>	39
4.10 <i>Validação da metodologia para análise do AFM na urina</i>	42
4.11 <i>Análise estatística</i>	42
5. RESULTADOS.....	44
5.1 <i>Implementação e validação do AttM</i>	44
5.2 <i>Implementação e validação do AFM urinário</i>	46
5.2.1 <i>Otimização das condições do sistema analítico HPLC-Fluorimétrico</i>	46
5.2.2 <i>Curva de calibração do AFM em fase móvel</i>	52
5.2.3 <i>Curva de calibração do AFM em matriz biológica</i>	52

5.3 Análises da creatinina urinária	53
5.4 Características da população de estudo.....	55
5.5 Análises do ácido trans, trans-mucônico.....	58
5.6 Análises do ácido s-fenilmercaptúrico	60
5.7 Correlação entre os biomarcadores AttM e AFM.....	61
6. DISCUSSÃO.....	65
6.1 Implementação e validação do AttM	65
6.2 Implementação e validação do AFM urinário.....	65
6.2.1 Otimização das condições do sistema analítico HPLC-Fluorimétrico.....	65
6.2.2 Curva de calibração do AFM em fase móvel.....	67
6.2.3 Curva de calibração do AFM em matriz biológica	67
6.3 Análises da creatinina urinária	67
6.4 Característica da população de estudo	68
6.5 Análises do ácido trans, trans-mucônico.....	69
6.6 Análises do ácido s-fenilmercaptúrico	70
6.7 Correlação entre os biomarcadores AttM e AFM.....	71
6. CONCLUSÃO	75
7. REFERÊNCIAS	76

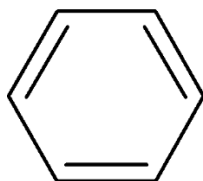
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

Neste tópico serão abordadas informações, baseando-se na literatura, sobre o benzeno e os danos provocados por esta substância nos indivíduos expostos (benzenismo), assim como a principal doença associada a esta exposição (câncer). Devido à gravidade da exposição a este solvente, é de extrema relevância o monitoramento biológico de trabalhadores dos postos revendedores de combustíveis através de biomarcadores de exposição (ácido trans, trans-mucônico e ácido s-fenilmercaptúrico).

2.1 Benzeno

O benzeno é um hidrocarboneto aromático (Figura 1), com aspecto incolor e um odor adocicado. É um líquido altamente inflamável, evaporando no ar com muita facilidade, porém com uma ligeira dissolução em água (ATSDR, 2007). Esta substância está amplamente distribuída no ambiente sendo utilizada em diversos processos industriais, como na fabricação de químicos, detergentes, corantes, produtos farmacêuticos, plásticos e resinas. Ademais, está presente no petróleo bruto, gasolina e na fumaça do cigarro (ATSDR, 2007; O'NEIL *et al.*, 2006). A Agência Nacional do Petróleo (ANP) estabeleceu o valor máximo de concentração de benzeno de um por cento (1%), volume por volume (v/v) na gasolina, conforme a Resolução 40, de 25 de outubro de 2013 (BRASIL, 2013).

Figura 1- Fórmula simplificada do benzeno.



Fonte: Do autor.

No Brasil, o Valor de Referência Tecnológico ponderado pelo tempo da concentração de benzeno no ar, para jornada de 8 horas de trabalho, é de 2,5 parte por milhão (ppm) para siderúrgicas e 1,0 ppm para outras indústrias (BRASIL, 1994; BRASIL, 1995). Já a União Europeia definiu como limite para a exposição ocupacional o valor de 1 ppm (COMISSÃO EUROPEIA, 1997) e a Conferência Americana de Higienistas Industriais Governamentais

(ACGIH) estabeleceu o limite de 0,5 ppm (média ponderada por 8 horas de exposição) (ACGIH, 2014).

A principal forma de absorção do benzeno ocorre através da via inalatória, podendo também ser absorvido, em menor proporção, por via dérmica ou por via oral (geralmente de forma acidental) (ASTDR, 2007). Em contato com o organismo, esta substância é capaz de causar danos celulares, incluindo as alterações genéticas, alterações hematológicas, aplasia medular e câncer (IARC, 1982; LOVREGLIO *et al.*, 2014; RINSKY, YOUNG, SMITH, 1981; RINSKY *et al.*, 1987).

O órgão responsável por avaliar o risco carcinogênico dos produtos químicos e as classificações de acordo com a carcinogenicidade da substância é a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC) (IARC, 2012; IARC, 2018). Atualmente, 1.012 agentes foram categorizados pela a IARC entre os Grupos 1, 2A, 2B e 3 (Quadro 1), sendo o benzeno classificado como Grupo 1, isto é, como carcinogênico para seres humanos (IARC, 2018).

Quadro 1- Agentes classificados pela Monografia da IARC.

GRUPO	CLASSIFICAÇÃO	Nº TOTAL
1	Carcinogênico para humanos.	120
2^a	Provavelmente carcinogênico para humanos.	82
2B	Possivelmente carcinogênico para humanos.	311
3	Não é classificado como carcinogênico para humanos.	499

Fonte: (adaptado pelo autor) IARC, 2018.

*Dados referentes ao número de agentes/substâncias classificadas nos grupos até o presente momento da escrita da monografia (janeiro de 2019).

2.2 Benzenismo

A exposição ao benzeno provoca um conjunto de sinais, sintomas e complicações reunidas em um quadro intitulado por benzenismo. Esses sintomas variam de acordo com o grau da exposição que o indivíduo é submetido – aguda ou crônica – e a forma de absorção, podendo apresentar complicações a médio ou a longo prazo localizadas principalmente no sistema hematopoiético (formador de sangue) e neurológico (FUNDACENTRO, 2012).

Em relação à exposição aguda ao benzeno, os principais sintomas são irritações nas mucosas e, quando inalado, edema pulmonar e hemorragias nas áreas que tiveram contato com a substância. Além disso, o sistema nervoso central (SNC) também é afetado proporcionalmente a quantidade absorvida, ou seja, quanto maior a exposição maior será os

efeitos tóxicos sofridos, como tontura, dor de cabeça, enjojo, náusea, taquicardia, tremores, convulsão, dificuldade respiratória, perda de consciência e morte – por à arritmia cardíaca (ATSDR, 2007).

Os metabólitos, isto é, os subprodutos do benzeno, são altamente tóxicos e se depositam com facilidade na medula óssea e nos tecidos gordurosos. Devido a isso, nos casos de intoxicação crônica pode ocorrer alteração na medula óssea, no sangue, nos cromossomos, no sistema imunológico e até o surgimento de casos de leucemia (FUNDACENTRO, 2012).

2.3 Câncer

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e foi responsável por cerca de 9,6 milhões de óbitos em 2018 (Quadro 2). Em nível global, uma em cada seis mortes são relacionadas a esta doença (GLOBOCAN, 2018; OPAS, 2018).

No que se refere ao benzeno, baseada predominantemente em evidências da epidemiologia ocupacional, a exposição a esta substância tem sido associada ao aumento da incidência de leucemia em humanos, em particular a leucemia mieloide aguda (LMA) (IARC, 2018). Entretanto, o câncer relacionado ao trabalho (ocupacional) é o agravo com menor número de notificações no país, em decorrência da grande dificuldade de estabelecimento do nexos causal, devido à escassez de pesquisas sobre o tema no território nacional, quando comparado a outros fatores de risco (MS, 2013).

A cada ano o número de novos casos de câncer e de mortes relacionadas a esta doença no mundo aumenta. De acordo com a Organização Mundial de Saúde o risco estimado de desenvolver leucemia é de cerca de seis casos por milhão de pessoas que são expostas ao longo da vida a concentrações de $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ de benzeno no ar (WHO, 2000). O aumento da incidência de casos de leucemia no mundo é muito preocupante (Quadro 2), tendo em vista a associação do benzeno com este câncer no âmbito ocupacional (GLOBOCAN, 2018; IARC 2012). No Brasil, o panorama não é distinto, de acordo com a estimativa mais recente realizada pelo INCA (2017) dos 582.590 casos incidentes estimados para 2018, aproximadamente 10.800 foram leucemias, cerca de 2% dos casos totais de câncer (Quadro 3).

Quadro 2- Estimativa do número de casos incidentes de câncer e morte relacionada a esta doença de 2018 a 2040 no mundo.

Ano	Número estimado de casos incidentes		Número estimado de mortes	
	2018	2040	2018	2040
Todos os cânceres*	18.078.957	29.532.994	9.555.027	16.388.459
Leucemia	437.033	656.345	309.006	491.261

Fonte: (adaptado de GLOBOCAN, 2018).

Considerou-se todas as idades (faixa etária de 0-70+ anos) e ambos os sexos (masculino e feminino).

*Câncer de: ânus, bexiga, cérebro (sistema nervoso), mama, colo uterino, cólon, corpo uterino, vesícula biliar, linfoma de Hodgkin, hipofaringe, sarcoma de karposi, rim, laringe, leucemia, lábio, cavidade oral, fígado, pulmão, melanoma de pele, mesotelioma, mieloma múltiplo, nasofaringe, linfoma não-Hodgkin, de pele não melanoma, esôfago, orofaringe, ovário, pâncreas, pênis, próstata, reto, glândulas salivares, estômago, testículo, tireoide, vagina e vulva.

Quadro 3- Estimativa do número de casos incidentes de câncer em 2018 no Brasil.

Número estimado de casos incidentes em 2018			
Sexo	Homens	Mulheres	Total
Todos os cânceres*	300.140	282.450	582.590
Leucemia	5.940	4.860	10.800

Fonte: (adaptado de INCA, 2017).

Números arredondados para múltiplos de 10.

*Câncer de: próstata, mama feminina, colo do útero, traqueia, brônquio, pulmão, cólon, reto, estômago, cavidade oral, laringe, bexiga, esôfago, ovário, linfoma de Hodgkin, linfoma de não Hodgkin, glândula tireoide, sistema nervoso central, leucemias, corpo do útero, colo do útero, pele melanoma, pele não melanoma e outras localizações.

2.4 Postos de Revenda de Combustíveis

O benzeno, como citado anteriormente é um dos componentes da gasolina, combustível comercializado nos postos de revenda de combustíveis (PRCs). Os PRCs são definidos como instalações onde se exerce a atividade de revenda varejista de combustíveis líquidos derivados de petróleo, álcool e outros combustíveis automotivos, que disponha de equipamentos medidores e sistemas para o armazenamento (BRASIL, 2000a).

Em muitos países, principalmente no Brasil, a poluição do ar tem sido agravada devido ao crescimento da população, que resultou em um rápido aumento no número de postos de combustíveis, gerando mais emissões de substâncias voláteis, entre elas o benzeno, que representa grandes riscos para a saúde pública (CORREA *et al.*, 2012).

Atualmente, no Brasil, existem cerca de 41.984 Postos Revendedores Varejistas de Combustíveis Líquidos, sendo 16.281 localizados na região Sudeste. O Rio de Janeiro, por sua vez, engloba 2.107 PRCs (ANP, 2018), que empregam milhares de trabalhadores que estão expostos ocupacionalmente ao benzeno. De acordo com a Portaria do Ministério da

Saúde nº 776, de 28 de abril de 2004, entende-se como exposição ocupacional a exposição decorrente de atividades laborais em níveis acima dos observados na população (BRASIL, 2004).

Os 2.107 postos de combustíveis no estado do Rio de Janeiro são responsáveis por abastecer cerca de 2.981.274 veículos movidos à gasolina, onde, 41% (1.235.226) localizam-se no Município do Rio de Janeiro (DETRAN, 2019), abrangendo um grande número de indivíduos expostos – tanto funcionários de postos de combustíveis, moradores da região e também usuários de veículos que se expõe ao benzeno com frequência. Costa (2001) observou que trabalhadores de PRCs, durante o abastecimento de gasolina, estavam expostos a concentrações deste solvente no ar que variavam de 40 a 700 parte por bilhão (ppb).

Estudos realizados com populações brasileiras acerca do tema – exposição ao benzeno em postos de combustíveis– se diferem dos trabalhos desenvolvidos em outros países (como por exemplo, os Estados Unidos) onde a ocupação de frentista é inexistente e as bombas de autosserviço são operadas pelo próprio consumidor nos postos de abastecimento. No Brasil, entretanto, a ocupação de frentista é assegurada pela Lei nº 9.956/2000 que proíbe a operação das bombas de combustíveis pelo próprio consumidor (BRASIL, 2000b), definindo outro cenário de exposição.

2.5 Monitoramento Biológico

Devido ao teor carcinogênico da substância, o monitoramento biológico do benzeno é essencial para avaliar os níveis de exposição a este hidrocarboneto e associar a possíveis riscos à saúde. Porém, apenas uma pequena parcela do benzeno que nós respiramos é absorvida e se acumula, principalmente, em tecidos com alto teor de lipídios, enquanto que a maior parcela deste solvente inalado é eliminada, na sua forma inalterada, através do ar expirado. A pequena parcela que continua no organismo é transformada principalmente no fígado e na medula óssea e eliminada na urina na forma de metabólitos, dificultando o biomonitoramento (ATSDR, 2007).

Esses metabólitos do benzeno excretados na urina pelo organismo são utilizados como biomarcadores de exposição na monitorização biológica. No Brasil, a Portaria 34 do Ministério do Trabalho e do Emprego estabelece que os dados toxicológicos dos grupos de

risco obtidos pela avaliação de indicadores biológicos de exposição devem ser instrumentos utilizados para o propósito de vigilância da saúde e que não existe limite seguro de exposição a substâncias carcinogênicas, como o benzeno, tendo em vista que o estabelecimento de baixos limites de exposição, reduz o risco de contaminação, mas não assegura a proteção absoluta (MTE, 1978; WALLACE, 1996).

Dessa forma, o biomarcador de exposição compreende toda substância ou seus metabólitos, cuja sua determinação nos fluidos biológicos avalia a intensidade da exposição e o risco à saúde, podendo ser influenciado por fatores pessoais, como tabagismo e ingestão de alimentos (PANEV *et al.*, 2002; WHO, 1996).

2.6 Ácido *trans*, *trans*-mucônico

No Brasil, a mesma Portaria 34 do Ministério do Trabalho e do Emprego se refere ao uso do ácido *trans*, *trans*-mucônico (AttM) como biomarcador de exposição ao benzeno (MTE, 2001). É sugerido o valor de 0,5 mg AttM/g creatinina como limite biológico de exposição que representa o nível de exposição aceitável e encontrado na população não exposta ocupacionalmente. Contudo tal limite não exclui o indivíduo do risco, visto que não existe limite seguro de exposição a substâncias carcinogênicas, como o benzeno.

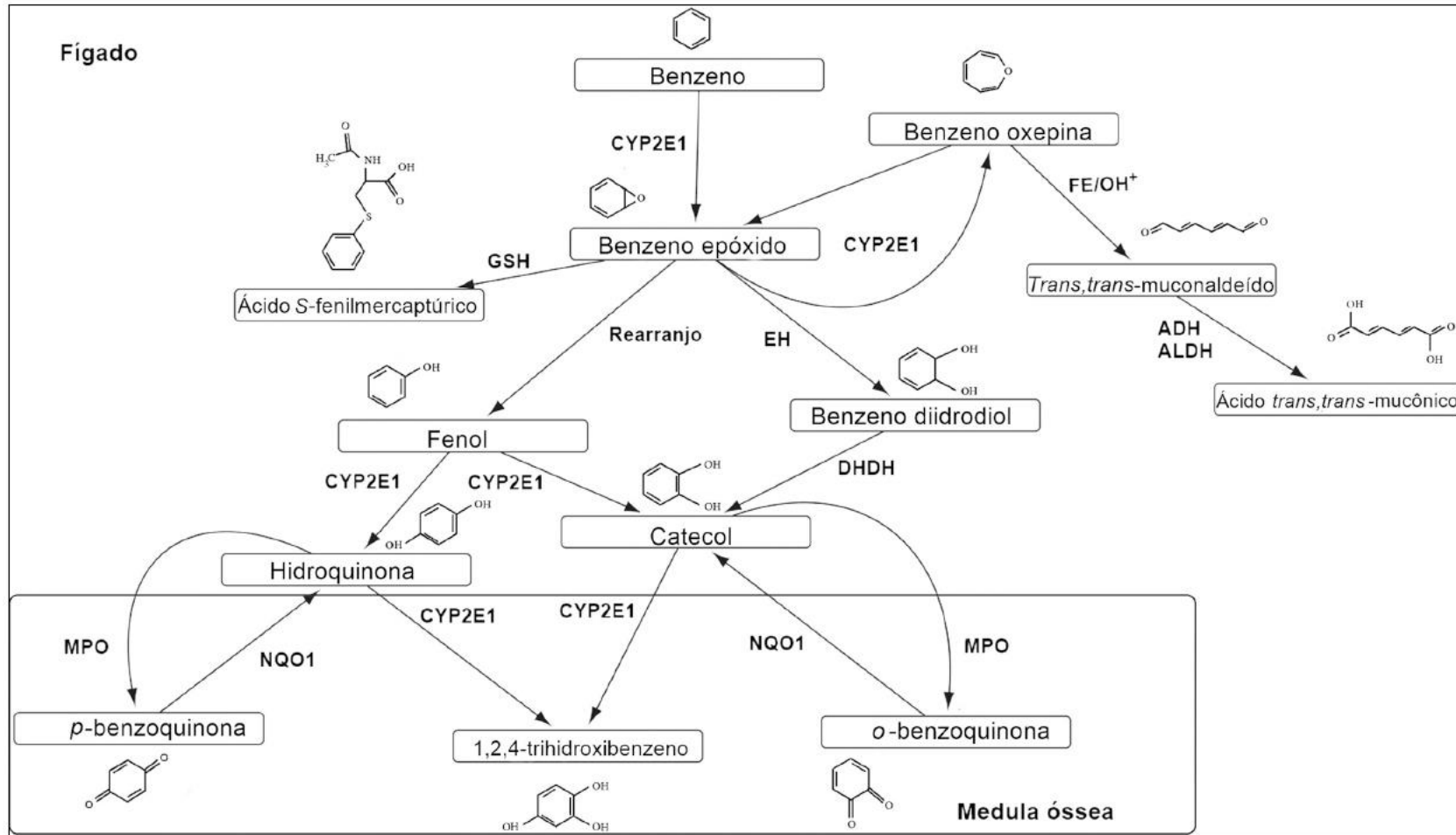
O AttM é produto secundário gerado após o processo de ativação metabólica, originado de um intermediário altamente reativo, o *trans*, *trans*-muconaldeído, ao qual tem sido atribuída, dentre outros produtos da biotransformação benzênica, a ação tóxica da substância. Durante o seu metabolismo (Figura 2), o benzeno pode ser convertido em benzeno epóxido, que é transformado em benzeno oxepina, em seguida em *trans*, *trans*-muconaldeído, que então é metabolizado em ácido *trans*, *trans*-mucônico (SCHERER, RENNER, MEGER, 1998). Todo este processo de biotransformação ocorre principalmente no fígado (GROTZ *et al.*, 1994). Vale ressaltar que o tempo de meia vida deste indicador biológico é de 5,1 horas (BOOGAARD, VAN SITTEERT, 1995).

Dentre as vantagens da utilização do AttM como biomarcador de exposição ao benzeno pode-se destacar a facilidade de desenvolver a técnica e a sensibilidade analítica de sua determinação urinária, além de apresentar boa correlação com os níveis atmosféricos de benzeno (FUNDACENTRO, 2012), o que evidencia a potência do AttM como um Indicador

Biológico de Exposição (IBE). No entanto, alguns estudos apontam que o AttM não é um metabólito exclusivo do metabolismo do benzeno, pois sofre influência de alguns fatores que podem modificar sua concentração na urina, como o hábito de fumar, devido à presença do benzeno na fumaça do cigarro (PEZZAGNO, MAESTRI, FIORENTINO, 1999), a dieta contendo ácido sórbico, utilizado como conservante de alguns alimentos, e a coexposição ao tolueno, competidor inibitório da biotransformação do benzeno (MARRUBINI *et al.*, 2002). Estudo revela que os fumantes são expostos a concentrações médias de 55 microgramas (μg) de benzeno por cigarro (COSTA, COSTA, 2002) e que o hábito de fumar aumenta em 5-20 vezes a concentração urinária de benzeno (PEZZAGNO, 1995).

Em relação à interferência nos níveis de AttM na urina provocada pela alimentação, alguns alimentos, principalmente os industrializados, possuem o ácido sórbico (conservante), que ao ser ingerido, cerca de 0,12% a 0,18% é absorvido pelo organismo humano e excretado na urina sob a forma de AttM. Ou seja, indivíduos que possuem uma dieta rica em ácido sórbico – cerca de 500 miligrama(mg)/dia – ao serem expostos a baixos níveis de benzeno podem ter seus níveis de exposição alterados não pela presença do benzeno, mas pelo fator de confusão que é esse conservante (DUCOS *et al.*, 1990; MAESTRI *et al.*, 1996; RUPPERT *et al.*, 1997).

Figura 2- Representação simplificada do metabolismo hepático do benzeno.



Fonte: SANTOS *et al.*, 2017.

2.7 Ácido *s*-fenilmercaptúrico

Em função da falta de especificidade do AttM o desenvolvimento de um novo biomarcador mais específico e sensível surge como uma necessidade no processo de avaliação da exposição ao benzeno. Nesse contexto, o ácido *s*-fenilmercaptúrico (AFM) começa a ser utilizado com esta finalidade. De acordo com a Figura 2, o benzeno é metabolizado em benzeno epóxido, que pode ser biotransformado em ácido *s*-fenilmercaptúrico, composto este que pode ser utilizado como biomarcador de exposição a esta substância (SNYDER, HEDLI, 1996). A biotransformação corre devido à ação de enzimas importantes como o citocromo P450 2E1 (CYP2E1) e as glutations (GSH). Dentre as glutations, as destacadas são a glutationa S-transferase teta-1 (GSTT1) e a glutationa S-transferase Mu 1 (GSTM1), havendo uma forte relação entre os seus polimorfismos e a hematotoxicidade do benzeno (PALMA, MANNO, 2014; KIM *et al.*, 2007).

Diversos estudos mostram que o AFM é um marcador confiável e bem específico, mesmo para exposição ao benzeno que ocorre em concentrações abaixo de 0,5 ppm, uma vez que o mesmo não sofre influência de outros fatores como o AttM (LOVREGLIO *et al.*, 2013; KAMPEERAWIPAKORN *et al.*, 2016). De acordo com Van Sittert e colaboradores (1993) apenas 0,11% do benzeno que é absorvido pelo corpo humano é biotransformado em AFM, com tempo de meia vida de eliminação igual a 9,6 horas. Assim, a determinação deste metabólito na urina requer técnicas analíticas extremamente sensíveis, capazes de identificar e quantificar esse biomarcador na ordem de micrograma por litro ($\mu\text{g/L}$), exigindo técnicas analíticas com alta precisão. A técnica mais utilizada é a de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (HPLC-MS), que apresenta como desvantagem o alto custo para a realização da análise. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada ao detector de fluorescência é uma alternativa mais acessível e de menor custo, porém sendo necessária a implementação e validação de uma metodologia, tendo em vista a escassez de pesquisas de AFM por esta análise.

Atualmente, alguns países já estabeleceram o AFM como biomarcador do benzeno no biomonitoramento. Nos Estados Unidos, o Instituto Nacional de Segurança e Saúde Ocupacional (NIOSH) e a Conferência Americana de Higienistas Industriais Governamentais (ACGIH) recomendam a utilização deste biomarcador, com o limite biológico de exposição

de 25 microgramas por grama ($\mu\text{g/g}$) de creatinina, com o valor de benzeno no ar de 0,5 ppm (ACGIH, 2014).

No Brasil, entretanto, 17 anos se passaram desde a publicação da Portaria 34 do Ministério do Trabalho e do Emprego e nenhuma atualização foi realizada até o presente momento. Tendo em vista essa desatualização, estudos sobre ambos os biomarcadores (AFM e AttM) e a comparação entre eles é de extrema importância para que as propostas de alteração do biomarcador de exposição tenham embasamento científico suficiente que justifique a substituição do AttM pelo AFM. Entretanto, como observado no Quadro 4, são poucas publicações científicas sobre o ácido s-fenilmercaptúrico em estudos sobre o benzeno, número que reduz para zero quando associado à técnica por HPLC.

Quadro 4 - Levantamento bibliográfico específico para os biomarcadores urinários na base de dados Pubmed e Portal Periódicos CAPES/MEC.

Base de Dados	Palavras-chave	Nº
Pubmed	“s-phenylmercapturic”[MESH] AND “benzene”[MESH]	154
	“s-phenylmercapturic”[MESH] AND “HPLC” [MESH]	39
	“s-phenylmercapturic”[MESH] AND “HPLC” [MESH] “benzene”[MESH]	36
	“s-phenylmercapturic”[MESH] AND “HPLC” [MESH] AND “fluorescence” [MESH]	4
Portal Periódicos CAPES	“ácido s-fenilmercaptúrico” AND “benzeno”	1
	“ácido s-fenilmercaptúrico” AND “HPLC”	3
	“ácido s-fenilmercaptúrico” AND “HPLC” AND “benzeno”	0
	“ácido s-fenilmercaptúrico” AND “HPLC” AND “fluorescência”	0

Fonte: (adaptado pelo autor) Pubmed e Portal Periódico Capes, 2019.

*Dados referentes as quantidades de publicações científicas publicadas até o presente momento da escrita da monografia (abril de 2019).

2.8 Validação de métodos analíticos

A etapa de validação para fins analíticos necessita da comprovação prévia de que os mesmos apresentem as características necessárias para produzir resultados que atendam ao propósito do seu uso, sendo precisos, exatos e reprodutíveis (INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA QUALIDADE E TECNOLOGIA- INMETRO, 2011). Esta verificação é realizada por meio da validação analítica, que de acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 166, de 24 de julho de 2017 é definida como uma “avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências

objetivas de que os requisitos específicos para seu uso pretendido são atendidos” (ANVISA, 2017).

Durante a validação são verificadas as características de desempenho do método proposto, como a seletividade/especificidade; linearidade; precisão; exatidão; e limites de detecção e quantificação. A seletividade é um dos primeiros parâmetros a serem determinados durante a validação e demonstra a identificação ou quantificação do analito de interesse, na presença de componentes que podem estar presentes na amostra, como impurezas, diluentes e componentes da matriz (ANVISA, 2017).

Para a quantificação de um analito exige-se que a concentração desta substância e o que foi medido pelo equipamento esteja diretamente relacionada (INMETRO, 2011). Dessa forma, a linearidade é a capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra, através de uma equação matemática do tipo $y=f(x)$, que relaciona o sinal obtido e a concentração da espécie de interesse (ANVISA, 2017; ARAUJO, 2009). Já a precisão avalia a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado, sendo expressa por meio da repetibilidade (avaliação da concordância dos resultados de medições sucessivas realizadas em curto período de tempo pelo mesmo analista), da precisão intermediária (medida da variabilidade dos resultados obtidos por diferentes analistas) e da reprodutibilidade (comparação interlaboratorial dos resultados) (ANVISA, 2017; INMETRO, 2011).

Outro parâmetro determinado na validação é a exatidão que, de acordo com a RDC Nº 166, é obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro, ou seja, é a relação entre a média do valor observado e o valor esperado expressa em porcentagem (ANVISA, 2017; EURACHEM, 2014). Em relação ao limite de detecção (LD) a determinação é realizada através da detecção da menor quantidade do analito presente em uma amostra, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. Já o limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. (ANVISA, 2017). Em relação ao efeito de matriz, o mesmo refere-se às substâncias naturalmente presentes na matriz biológica que coeluem com o analito de interesse podendo modificar a detecção do mesmo (CASSIANO *et al.*, 2009).

2. RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Inúmeras substâncias presentes no meio ambiente são nocivas aos seres vivos, afetando não somente o ambiente onde vivem, mas também a saúde dos mesmos. O benzeno é um exemplo de agente químico que está presente na matéria prima de inúmeros compostos comercializados, dentre eles, pode-se citar a gasolina (ATSDR, 2007). Amplamente utilizada no município do Rio de Janeiro e em todo o Brasil, a gasolina faz parte do grupo de compostos de maior comercialização de grandes centros urbanos (ANP, 2018; DETRAN, 2019), e que diversos trabalhadores dos postos de revenda de combustíveis (PRCs) são expostos aos vapores, sendo de extrema importância monitorar os níveis aos quais estes indivíduos podem estar expostos e quais as consequências disso para a saúde deles.

A exposição ao benzeno de forma contínua provoca diversas alterações e danos na saúde dos indivíduos expostos, como alterações genéticas, alterações hematológicas e aplasia medular, e para estabelecer onexo causal (causa x efeito) é necessário monitorar e identificar os níveis de exposição a esta substância, a fim de que novas medidas em relação à vigilância e a saúde do trabalhador sejam deliberadas com o propósito de melhorar a qualidade de vida.

O biomonitoramento da exposição ao benzeno é realizado através de bioindicadores de exposição, como o ácido trans, trans-mucônico e o ácido s-fenilmercaptúrico, metabólitos deste solvente que são quantificados na urina dos indivíduos (MTE, 2001; SNYDER, HEDLI, 1996). Estes bioindicadores foram objetos deste estudo, onde são abordados a implementação das metodologias e a análise da urina dos trabalhadores para determinação do nível de exposição ao benzeno.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o nível de exposição de trabalhadores de postos de revenda de combustíveis no município do Rio de Janeiro ao benzeno, presente na gasolina, através da utilização de biomarcadores de exposição (ácido s-fenilmercaptúrico e ácido trans, trans-mucônico).

3.2 Objetivos Específicos

- Implementar, padronizar e validar a metodologia para a determinação do ácido s-fenilmercaptúrico;
- Realizar coleta de amostras de urina dos trabalhadores expostos e dos indivíduos não expostos ocupacionalmente ao benzeno (grupo de comparação);
- Determinar a concentração do ácido trans-trans-mucônico e do ácido s-fenilmercaptúrico na urina de trabalhadores de postos de combustíveis expostos ocupacionalmente e de indivíduos não-expostos;
- Comparar os resultados do AttM e do AFM urinário a fim de avaliar qual biomarcador é mais sensível e específico.

4. METODOLOGIA

4.1 Instrumentos e Aparatos utilizados

- Cromatógrafo modelo SPD-20AV Shimadzu® acoplado ao detector de fluorescência RF-20A XS e ao detector ultravioleta visível SPD-20AV;
- Manifold à vácuo SPE para 24 colunas da Chromabond®;
- Sistema de Filtração, Roni Alzi®;
- Bomba de Vácuo 7CFM da Surya®;
- Agitador de tubos tipo Vortex da Gehaka®, modelo AV-2 82328;
- Balança analítica com precisão de 0,1 mg da Shimadzu®, Modelo AUY 220;
- Lavadora ultrasônica da Ultronique®, modelo Q3.0/40;
- Inertsil® 5 µm C18, 4,6 x 250 milímetros (mm);
- Inertsil® 4 µm 4,6 x 150 mm;
- Capilares;
- Cartuchos SPE Applied Separations® Octadecyl C18/ 18%, 500mg/3mL, lote 31306;
- Cartuchos SPE Applied Separations® Quaternary Amino N+, 500mg/3mL, lote 30920;
- Criotubo com capacidade de 2 ml;
- Espátulas metálicas;
- Microseringa Hamilton® 710SNR 100 µL;
- Pipeta automática de 100, 200, 1000 e 5000 µL;
- Pipeta pasteur descartável;
- Ponteiras descartáveis de 100, 200, 1000 e 5000 µL;
- Proveta de 50 mL, 100 mL e 500 mL;

- Tubo de ensaio;
- Tubo de polipropileno, com tampas rosqueadas, capacidade de 15 mL;
- Tubo de polipropileno, com tampas rosqueadas, capacidade de 50 mL.

4.2 Padrões e reagentes

- 2-Propanol adquirido da AppliChem PanReac®, lote 0000679533;
- Acetato de amônio adquirido da Synth®, lote 197509;
- Acetonitrila grau HPLC adquirida da J.T. Baker®, lote X51C53;
- Ácido acético grau HPLC adquirido da Dinâmica®, lote 80189;
- Ácido clorídrico adquirido da Neon®, lote 33021;
- Ácido fosfórico adquirido da Synth®, lote 195102;
- Água destilada ultrapura adquirida da Life Technologies®, lote 1921152;
- Bicarbonato de amônio adquirido da Synth®, lote 188994;
- Hidróxido de sódio adquirido da Synth®, lote 164379;
- Kit para dosagem de Creatinina adquirido da Bioclin®, lote 0163;
- Metanol grau HPLC adquirido da LiChrosolo®, lote I844107;
- Monobromobimane adquirido da Sigma Aldrich, lote SLBN2970V;
- Nitrogênio adquirido da Famabras®;
- Padrão ácido s-fenilmercaptúrico adquirido da Aldrich Chemistry®;
- Padrão ácido trans, trans-mucônico adquirido da Aldrich Chemistry®, lote I844107.

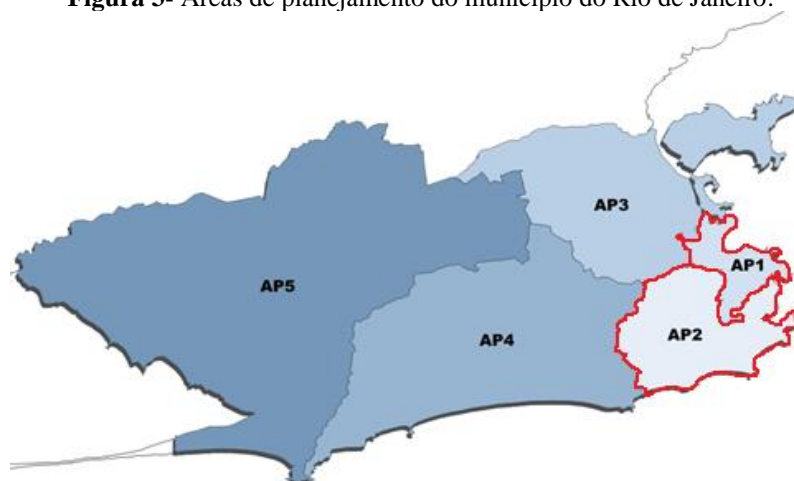
4.3 Local de estudo

O município do Rio de Janeiro é dividido em cinco áreas de planejamento (AP) que englobam diversos bairros próximos (Figura 3). As áreas escolhidas para a realização do estudo foram à região do Centro do Rio de Janeiro (AP1) e a Zona Sul (AP2) devido as diferentes configurações geográficas (CAMÂRA MUNICIPAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, 1985).

A região do Centro do Rio de Janeiro (AP1) é altamente urbanizada, com a presença de muitos edifícios altos, casas, aglomerados populacionais e intenso tráfego de veículos e a ausência de áreas verdes preservadas, sendo uma região mais comercial do que residencial. Em contrapartida, a Zona Sul (AP2) é caracterizada por ser uma região mais residencial, que abrange uma grande variedade de áreas arborizadas, paisagens naturais e inúmeras praias.

Um total de oito postos foi incluído no estudo, sendo três localizados em uma das principais avenidas da Zonal Sul (Avenida Eptácio Pessoa) e cinco localizados nas principais vias da região do Centro (Avenida Presidente Vargas, Rua Haddock Lobo, Rua Estácio de Sá e Praça Mal. Hermes). Neste projeto foram incluídos apenas os postos que são de bandeira não branca (ex: BR, Esso, Ipiranga, Shell) e que os proprietários/gerentes permitiram a liberação dos funcionários para coleta de amostra biológica (urina) durante a jornada de trabalho, através de um termo autorizando a participação do posto na pesquisa (ANEXO 1).

Figura 3- Áreas de planejamento do município do Rio de Janeiro.



Fonte: (adaptado pelo autor) Site Prefeitura do Rio de Janeiro¹.

¹ Disponível em: < <http://www.rio.rj.gov.br/web/smu/exibeconteudo?id=4481419>> Acesso em 09 abr. 2019.

4.4 População de estudo

Para o desenvolvimento da pesquisa, o trabalho foi submetido ao CEP/INCA no ano 2014, intitulado por “Desenvolvimento de metodologia para avaliar os efeitos da exposição à BTXs (benzeno, tolueno e xileno) na saúde dos trabalhadores de postos de combustíveis”, cadastrado no CEP/INCA com o número (nº) 121/09 (ANEXO 2). Este estudo faz parte de um projeto maior que teve início em 2014 com a aceitação dos participantes na pesquisa através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (ANEXO 3), seguido da coleta de amostras de urina (para a determinação do ácido trans, trans-mucônico) e sangue (para a determinação do hemograma completo, bioquímica, análise genética e imunofenotipagem) no primeiro momento, onde resultados dessas análises não foram apresentados neste trabalho. As características sociodemográficas, de exposição ocupacional e clínicas (principais queixas, sinais e sintomas dos trabalhadores) foram coletadas através da aplicação de um questionário individual (ANEXO 4) e clínico (ANEXO 5) nesta mesma época.

Em seguida, o delineamento da população teve como início a definição e classificação dos grupos de estudos como: trabalhadores expostos ocupacionalmente ao benzeno (frentistas e gerentes dos postos de combustíveis) e trabalhadores não expostos ocupacionalmente ao benzeno (trabalhadores de escritórios do INCA e da UNIRIO), os quais formam o grupo controle.

Alguns critérios para a inclusão dos indivíduos no grupo exposto foram adotados como: os trabalhadores dos postos de combustíveis deveriam possuir idade igual ou superior a 18 anos; trabalhar por um período superior a seis meses em postos de combustíveis; e residir na região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro. Em relação aos critérios adotados para a inclusão dos indivíduos no grupo não exposto: os trabalhadores de escritório, isto é, não expostos ocupacionalmente a gasolina, deveriam possuir idade igual ou superior a 18 anos de idade; e residir na região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro. Não foi incluído no estudo nenhum trabalhador que apresentasse problemas comportamentais como alcoolismo, agressividade e problemas mentais que impossibilitem a entrevista. De acordo com a ACGIH (1999), as amostras de urina que apresentarem creatinina entre 0,3 g/L e 3,0 g/L estão dentro da faixa aceitável de concentração. Estes valores foram adotados no trabalho como critérios

de exclusão e inclusão de amostras, ou seja, indivíduos com valores fora dessa faixa foram excluídos do estudo.

4.5 Coleta de dados e das amostras

No ano de 2019, foi realizado uma segunda coleta de urina para a determinação da creatinina urinária, do AttM e do AFM (resultados apresentados neste estudo). As amostras de urina dos indivíduos participantes foram coletadas em tubos tipo Falcon de 50 mililitros (mL) ao fim do expediente de trabalho (Figura 4). Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em caixa de isopor contendo gelo reciclável, aproximadamente 4 graus Celsius (°C), e transportadas para o Laboratório de Mutagênese Ambiental, onde foram alíquotadas em 3 tubos tipo Falcon de 15 mL e armazenadas sob refrigeração a -20°C para a realização das análises.

Figura 4- Coleta de amostras de urina nos postos de revenda de combustíveis.



Fonte: Do autor.

4.6 Análise da creatinina urinária

Todas as amostras de urina tiveram a creatinina urinária determinada através do Kit Bioclin® K016 pelo método de Jaffé Modificado (1886). As análises foram feitas em triplicatas, sendo necessária a determinação concomitante com o branco e a amostra padrão.

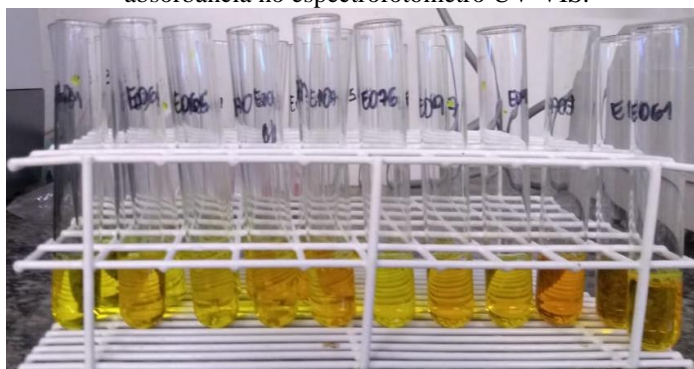
A primeira etapa do preparo da amostra consiste na centrifugação de 1 mL de urina por 10 minutos (min), seguido da diluição de 1:25 (0,1 mL de urina e 2,4 mL de água destilada ou deionizada). O padrão e o branco seguem direto para a etapa 2, que se baseia na adição de água destilada e reagentes de acordo com o kit (Quadro 5). Em seguida homogeneizou-se a amostra e incubou-a em banho-maria 37°C por 10 minutos, seguido da leitura da absorbância (Figura 5) no comprimento de onda (λ) de 510 nanômetro (nm) no espectrofotômetro ultravioleta-visível (UV-VIS), modelo UVmini-1240 Shimadzu®, para a determinação da creatinina urinária.

Quadro 5- Etapa de adição de reagentes para a determinação da creatinina urinária.

	Branco	Padrão	Amostra
Reagente nº 1	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL
Água destilada	250 microlitros (μ L)	-	-
Amostra	-	-	250 μ L
Reagente nº 4	-	250 μ L	-
Reagente nº 2	500 μ L	500 μ L	500 μ L

Fonte: Manual Kit Bioclin® K016².

Figura 5- Amostras de urina preparadas para a determinação da creatinina urinária através da leitura de absorbância no espectrofotômetro UV-VIS.



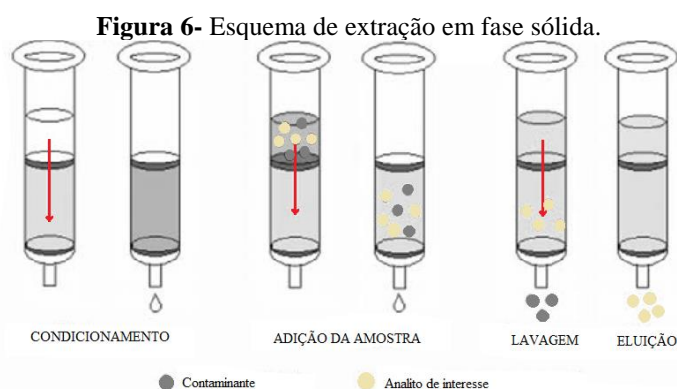
Fonte: Do autor.

4.7 Preparação das amostras

Uma etapa preliminar em ambas as metodologias (AttM e AFM) é necessária para eliminar interferentes que sejam incompatíveis com o sistema cromatográfico, pelo fato da urina ser uma amostra biológica complexa. Desta forma, técnicas de extração devem ser

² Disponível em: <https://www.bioclin.com.br/sitebioclin/wordpress/wp-content/uploads/arquivos/instrucoes/INSTRUCOES_CREATININA.pdf> Acesso em 11 abr. 2019.

aplicadas no preparo da amostra, entre elas as mais comuns estão a de extração líquido-líquido (BURATTI *et al.*, 2001; WANG *et al.*, 2013) e extração em fase sólida (EINIG & DEHNEN, 1995; HYMER, 2011; STERZ *et al.*, 2010; TUAKUILA, 2013). Esta última apresenta a vantagem de promover a concentração do analito e eliminação de interferentes ao mesmo tempo, através da utilização de fases sólidas, também denominadas de sorventes, contidas em cartuchos, onde os analitos de interesse ficam retidos para posterior eluição (JARDIM, 2010), como é ilustrado na Figura 6.



Fonte: (adaptado pelo autor) LANÇAS, 2004.

A determinação de ambos os biomarcadores (AttM e AFM) em urina apresenta como desvantagem a variação de volume e concentração de cada amostra. Devido a este motivo é necessário, para compensar as diferenças nas diluições deste material biológico, levar em conta um fator de normalização, tais como osmolaridade, gravidade específica, densidade relativa ou creatinina (SMOLDERS *et al.*, 2009). A correção dos valores dos metabólitos do benzeno neste estudo foi feita pela concentração de creatinina urinária para a correta interpretação dos resultados obtidos.

4.8 Implementação, validação e análise do AttM

Para a implementação e validação do AttM, preparou-se soluções intermediárias em urina nas concentrações 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 miligramas por litro (mg/L) a partir de uma solução padrão estoque de AttM em metanol – 100 microgramas por mililitro ($\mu\text{g}/\text{mL}$) –, para a definição da curva de calibração. Alíquotas do pool de urina não adicionado de padrão foram utilizadas como “branco”. Essas soluções passaram pelo método descrito por Ducos e colaboradores (1990) e modificado por Paula e colaboradores (2003), assim como as amostras de urina dos participantes, que consiste em preparar a amostra através de extração em fase

sólida (EFS) com posterior análise utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência com detector UV/visível (HPLC-UV) da Shimadzu® LC-20.

A EFS consiste em um sistema composto por um Manifold® e uma bomba à vácuo que permite a eliminação de interferentes da urina através da utilização de cartuchos por onde a amostra transpassa (Figura 7). Os cartuchos utilizados na metodologia (Applied Separations®, N+ Quaternary Amino - SAX, 500 mg/3mL) possuem sítios ativos para que consiga conter a substância de interesse – AttM – e eliminar outras que possam interferir na análise. Primeiramente esses cartuchos passaram pela etapa de condicionamento com 3 mL de metanol, seguido de 3 mL de água ultrapura. Posteriormente adicionou-se 1 mL de urina, seguindo para a etapa de lavagem com 3 mL de ácido acético 1%. Por fim, os tubos de ensaio foram trocados por outros (limpos e identificados) e a eluição ocorreu em ácido acético 10% (pH 2,7) com consecutiva injeção manual de uma alíquota de 20 µL no HPLC – com condições cromatográficas estabelecidas (Tabela 1). A concentração de AttM foi encontrada através do cromatograma obtido no HPLC, junto com a curva de calibração, e corrigida pela concentração de creatinina urinária, expressa em miligrama por grama (mg/g) de creatinina.

Figura 7- Sistema de EFS composto pelo Manifold® (1), cartucho (2) e bomba à vácuo (3)



Fonte: Do autor.

Tabela 1- Resumo das condições cromatográficas para análise do AttM.

METODOLOGIA	ESPECIFICAÇÃO
Coluna cromatográfica	Inertsil® 5 µm C18, 4,6 x 250 mm
Temperatura da coluna	40°C
Fase Móvel	Ácido acético 1%: metanol (9:1 v/v)
Comprimento de onda	264 nm
Bombeamento	Isocrático
Duração da corrida cromatográfica	17 min
Fluxo	1,0 mililitro por minuto (mL/min)
Deteção	Ultravioleta
Volume de injeção	20 µL

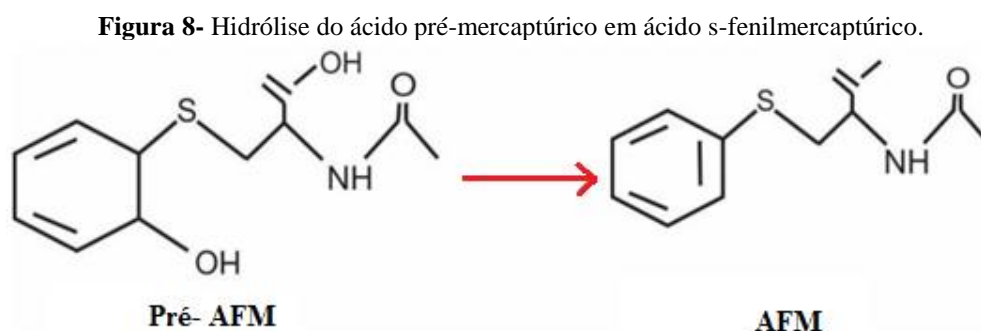
Fonte: Do autor.

4.9 Metodologia do AFM

A metodologia desenvolvida foi baseada na técnica aprimorada pelo Laboratório de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) através do acordo acadêmico (Termo de Cooperação Técnica – ANEXO 6) firmado entre o Laboratório de Análises Toxicológicas da Universidade Federal de Minas Gerais/UFMG e CONPREV/INCA.

O método analítico utilizado para determinação do AFM inclui cinco etapas de preparo pelas quais as soluções intermediárias, para a definição da curva de calibração em urina, e as amostras dos participantes passaram, sendo elas: acidificação, EFS do AFM presente na urina; concentração do analito a 60°C sob fluxo de nitrogênio; hidrólise alcalina e derivatização, para posterior análise no sistema cromatográfico, adaptado de Mendes e colaboradores (2017).

A primeira etapa da metodologia consiste na acidificação da amostra (pH 1,0) utilizando HCl 25%, com posterior homogeneização no agitador de tubos a 1500 rpm por 5 segundos. A correção do pH (hidrólise ácida) é necessária para conversão de ácidos pré-mercaptúricos em ácido s-fenilmercaptúrico (Figura 8).



Fonte: (adaptado pelo autor) PACI *et al.*, 2007.

Em seguida, a amostra passou pelo sistema de extração em fase sólida semelhante a do AttM (Figura 6). O cartucho utilizado foi o Applied Separations®, C18/18%, 500 mg/3mL, condicionado com 3 mL de metanol e 6 mL de ácido acético 1%. Posteriormente, 3 mL de urina foram adicionados aos cartuchos, seguido da etapa de lavagem utilizando 2 mL de ácido acético 1%. Por fim, os tubos de ensaio foram trocados por outros (limpos e identificados) e a coleta do eluato foi feita empregando 2 mL de solução tampão contendo 20% de acetato de amônio 0,1 mol/L e 80% de metanol (v/v).

A fim de aumentar a sensibilidade do método, os 2 mL de eluato foram concentrados à resíduo em banho-maria a 75°C sob fluxo de nitrogênio, até que toda amostra secasse restando apenas um resíduo no fundo do tubo ensaio (Figura 9). Em seguida, realizou-se a hidrólise alcalina, a fim de eliminar interferências de proteínas, precipitando-as em meio básico, com a adição de 400 µL de hidróxido de sódio (NaOH) 2M seguido de agitação vigorosa no agitador de tubos, a 2500 rpm até completa solubilização. O resíduo solubilizado foi transferido para criotubo de 2 mL com tampa de rosca; e este foi colocado em banho-maria a 95°C durante 25 minutos.

Figura 9- Etapa da secagem das amostras sob fluxo de nitrogênio.



Fonte: Do autor.

Para determinação do AFM urinário pelo detector fluorimétrico foi necessário realizar a derivatização, o que consistiu na adição, a cada resíduo solubilizado, de 290 µL de solução tampão preparada a partir de 90 µL de ácido fosfórico 5 M e 200 µL de bicarbonato de amônio 0,5 M para obter o pH entre 7,5 a 8,5. Após homogeneização foram adicionados 50 µL de monobromobimane (MB) 2 mM em acetonitrila que produz o conjugado fluorescente. A reação ocorre à temperatura ambiente durante 25 minutos e ambiente ausente de luz.

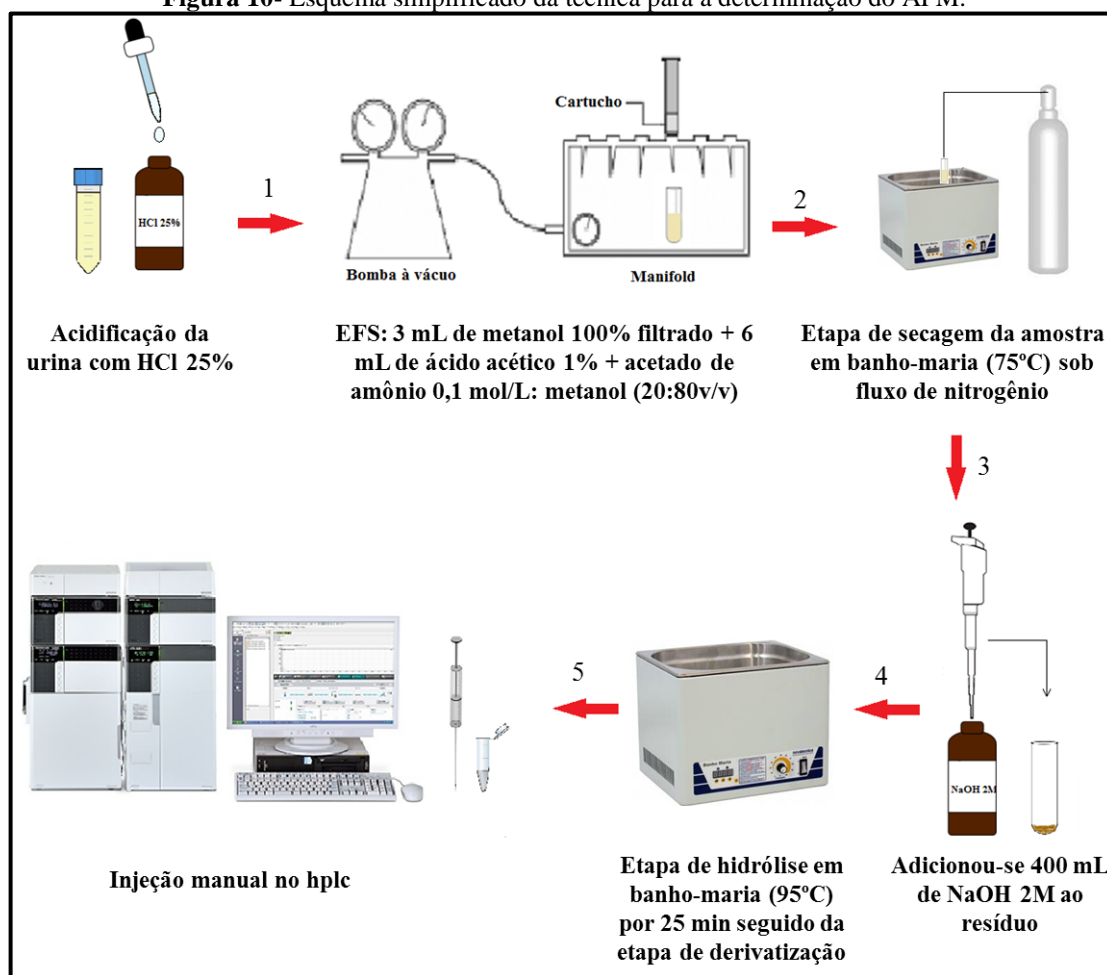
As amostras foram novamente homogeneizadas em agitador de tubos a 2000 rpm durante 15 segundos e injetadas manualmente no sistema de cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência da Shimadzu® LC-20, sob as condições analíticas otimizadas na Tabela 2. A metodologia descrita está ilustrada, de forma simplificada na Figura 10.

Tabela 2- Resumo das condições cromatográficas para análise do AFM.

METODOLOGIA	ESPECIFICAÇÃO
Coluna cromatográfica	Inertsil® 4 µm 4,6 x 150 mm
Temperatura da coluna	35°C
Fase Móvel	Acetonitrila: ácido acético 0,5% (50:50 v/v)
Comprimento de onda de excitação e emissão	395 e 470 nm
Bombeamento	Isocrático
Duração da corrida cromatográfica	10 min
Fluxo	0,80 mL/min
Deteção	Fluorescência
Volume de injeção	20 µL

Fonte: Do autor.

Figura 10- Esquema simplificado da técnica para a determinação do AFM.



Fonte: Do autor.

Onde: 1= Extração em fase sólida; 2= Secagem sob fluxo de nitrogênio; 3= Adição de NaOH 2M; 4= Hidrólise e Derivatização; 5= Injeção no aparelho de cromatografia de alta eficiência acoplado ao detector de fluorescência.

4.10 Validação da metodologia para análise do AFM na urina

Para fins de validação analítica foram determinados os seguintes parâmetros: linearidade, efeito de matriz, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e exatidão, como preconizado na RDC Nº 166 (ANVISA, 2017), através da metodologia descrita no tópico anterior.

A curva de calibração em fase móvel (acetonitrila:ácido acético 0,5% , 50:50 v/v) foi definida com o preparo de uma solução padrão de AFM em fase móvel e a partir da mesma foi feita diluições seriadas nas concentrações de 10; 20; 30; 70; 140; 270; 550; 1100 e 2190 µg/L. Alíquotas de fase móvel não adicionado de padrão foram utilizadas como “branco”, objetivando eliminar a interferência quantitativa. Vale ressaltar que essas amostras não passaram pela técnica completa, apenas pela etapa do tampão e da derivatização.

Em relação à curva de calibração em urina, o pool foi preparado com amostras de urina de ambos os sexos, não fumantes, não expostos ocupacionalmente ao benzeno e que não faziam uso de medicamentos (n=20). As amostras foram colhidas em recipientes plásticos, homogeneizadas e filtradas, e posteriormente enriquecidas com soluções padrão do biomarcador analisado (AFM) em diferentes concentrações (soluções intermediárias): 10; 20; 40; 80; 160 e 200 µg/L. Alíquotas do pool de urina não adicionado de padrão também foram utilizadas como “branco” e todas as amostras passaram pela técnica na íntegra.

Os demais parâmetros – linearidade, efeito matriz, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão – foram calculados através das concentrações utilizadas para o desenvolvimento das curvas de calibração.

4.11 Análise estatística

A determinação da curva de calibração, a equação da reta e o coeficiente de linearidade foram realizados no Software Microsoft Office Excel 2010. A análise dos resultados obtidos com as amostras de urina dos participantes foi realizada por meio do Software IBM SPSS Statistics para Windows versão 23.0, após a organização dos dados em planilhas no Software Microsoft Office Excel 2010.

A análise descritiva da população foi realizada utilizando o percentual de distribuição e teste qui-quadrado com nível de significância de 5%. Já a análise descritiva dos níveis de

AttM e AFM urinário foi realizada utilizando médias, valores máximos e mínimos, desvios padrão e percentual de distribuição.

A normalidade da distribuição das variáveis contínuas foi testada por meio do teste Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk, adotando nível de significância de 5%. A frequência dos níveis dos biomarcadores acima do limite biológico aceitável para cada um deles no grupo exposto e não exposto foi realizada através do Microsoft Office Excel 2010. Para a correlação entre variáveis com distribuição não normal utilizou-se o teste de correção não paramétrico Spearman's rho.

5. RESULTADOS

Ambas as metodologias (AttM e AFM) foram implementadas e validadas, com a definição das suas respectivas curvas de calibração dos compostos. O grupo de estudo foi composto por 43 trabalhadores expostos ao benzeno (grupo exposto), sendo 23 trabalhadores de 3 postos localizados na Zona Sul do Rio de Janeiro e 20 trabalhadores de 5 postos localizados na região do Centro do Rio de Janeiro. Quatro participantes do grupo exposto foram excluídos do estudo por não estarem dentro dos critérios utilizados, totalizando 39 indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno (22 trabalhadores de postos da Zona Sul e 17 do Centro). O grupo de comparação (controle) foi composto por 25 participantes não expostos ocupacionalmente ao benzeno, entretanto quatro indivíduos também foram excluídos do estudo por não estar dentro dos critérios necessários, totalizando 21 controles. Para cada amostra de urina foram executadas as seguintes análises: creatinina urinária, ácido trans, trans-mucônico e ácido s-fenilmercaptúrico.

5.1 Implementação e validação do AttM

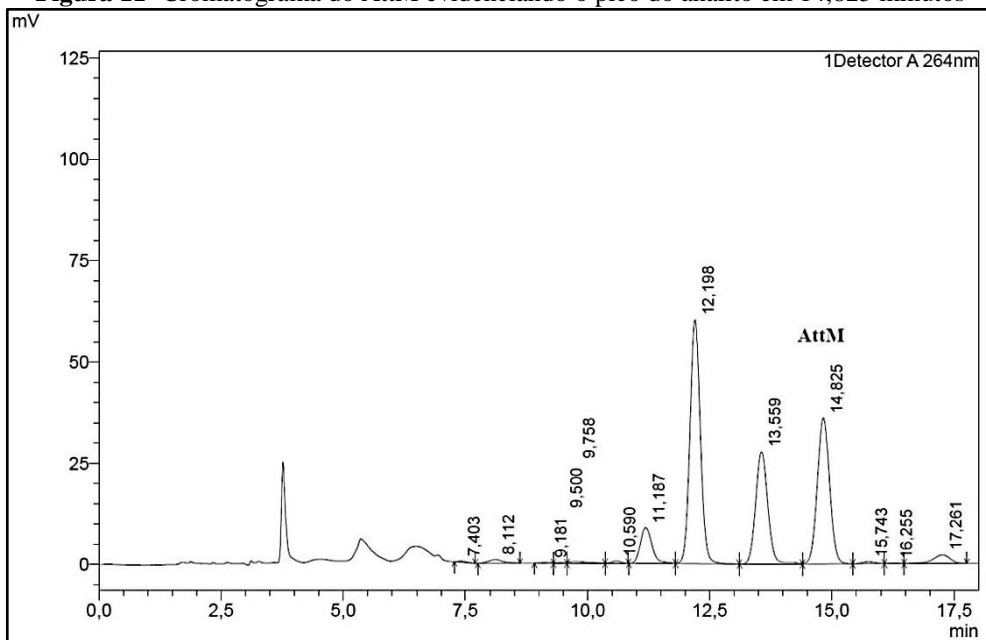
Com base em diversos testes com amostras que continham o analito (AttM) e amostras sem o padrão (Branco), comparou-se os cromatogramas de ambos para a identificação do tempo de retenção (T_R) do composto, ou seja, em qual instante o ácido trans, trans-mucônico é analisado no cromatograma. A partir do cromatograma consegue-se definir a concentração deste metabólito na urina pela equação da reta da curva de calibração, construída com concentrações previamente conhecidas.

O tempo de retenção do AttM é em torno de 14,8 minutos (Figura 11), sofrendo pequenas variações ao longo do tempo. Devido a este motivo, constantemente analisava-se uma amostra controle (urina fortificada com padrão de AttM) concomitante com as amostras dos participantes para confirmar o tempo de retenção do metabólito no dia da análise.

A obtenção da curva analítica (Figura 12) em urina foi realizada de acordo com o método descrito no tópico 4.7 a partir de 5 concentrações intermediárias do padrão: 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 2,0 mg/L. Os dados obtidos foram ajustados ao modelo de regressão linear simples,

obtendo-se a seguinte equação de regressão: $\text{Área} = 93405 \times (\text{concentração})$, sendo o coeficiente de correlação (R^2)= 0,999.

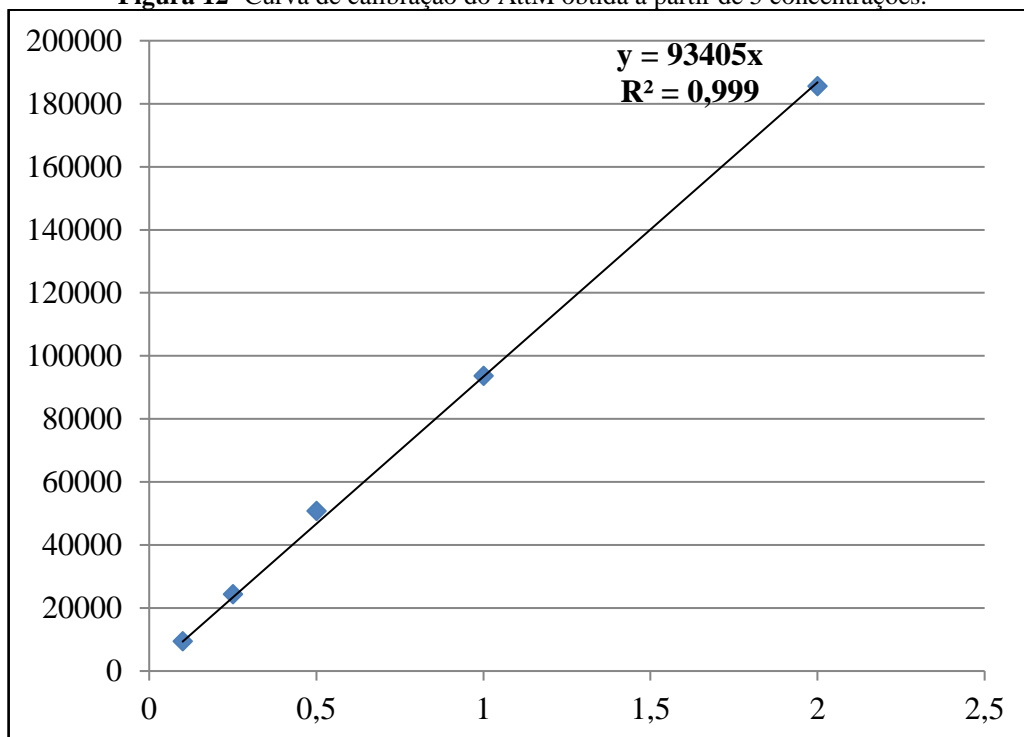
Figura 11- Cromatograma do AttM evidenciando o pico do analito em 14,825 minutos



Nota: Seta vermelha indicando o pico do AttM

Condições cromatográficas: Fluxo= 1,0 mL/min; Temperatura da coluna= 40°C; λ = 264nm; Tempo da corrida cromatográfica= 17 minutos.

Figura 12- Curva de calibração do AttM obtida a partir de 5 concentrações.



5.2 Implementação e validação do AFM urinário

A implementação da metodologia para a avaliação do ácido s-fenilmercaptúrico foi realizada através de diversos testes por um longo período de tempo – cerca de 30 meses –, uma vez que a reprodução na íntegra da técnica descrita por Mendes e colaboradores (2017) não foi bem sucedida. Testes com alterações nas condições cromatográficas e nas etapas da técnica foram necessários a fim de que a mesma fosse implementada e posteriormente validada.

O Quadro 6 sintetiza todos os testes realizados em solução aquosa (primeira etapa), com as informações cromatográficas e das condições alteradas descritas. Ao total cerca de 11 métodos foram testados até que a metodologia baseada em Mendes e colaboradores (2017) fosse determinada. Vale ressaltar que as análises do AFM em solução aquosa não apresentam a necessidade de passarem pela técnica na íntegra.

5.2.1 Otimização das condições do sistema analítico HPLC-Fluorimétrico

O método 1 foi a reprodução na íntegra da técnica descrita por Mendes e colaboradores (2017), com as mesmas condições cromatográficas utilizadas. A diluição do padrão do ácido s-fenilmercaptúrico ocorreu em metanol 100% filtrado, seguido da adição do tampão com posterior derivatização com 50 μ L de monobromobimane por 15 minutos. A solução utilizada de comparação com o padrão foi metanol 100% filtrado (branco) e ao correlacionar ambos os cromatogramas (padrão e branco) não se observou nenhuma diferença dos resultados, ou seja, nenhum pico diferente apareceu entre os cromatogramas (Figura 13a e Figura 13b). Acreditando-se que o tempo de derivatização poderia estar sendo curto para que a amostra fosse derivatizada, aumentou-se a duração da reação para 80 minutos (Método 2), sendo o preparo das amostras realizado conforme o método 1. Novamente ao correlacionar os cromatogramas do branco e do padrão não se observou nenhuma diferença. (Figura 14a e Figura 14b).

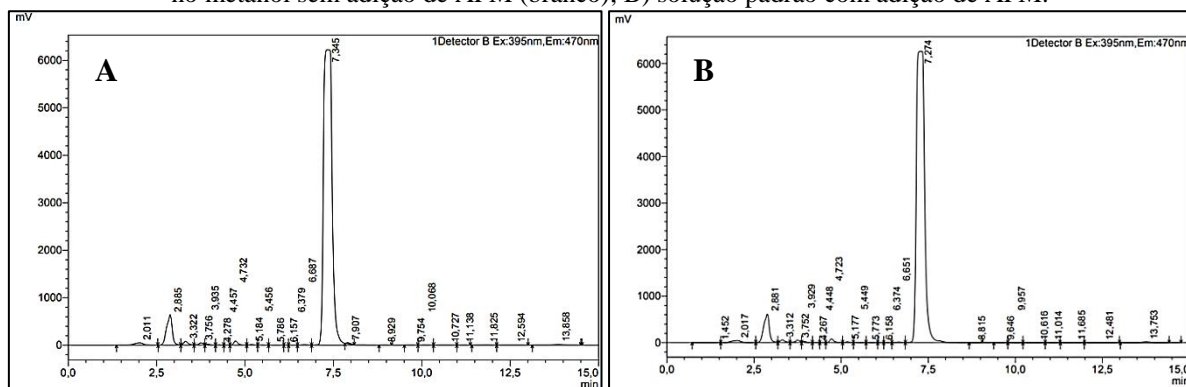
Quadro 6- Métodos testados para a implementação da metodologia do AFM.

Tentativa	Fluxo (mL/min)	Temperatura da coluna	λ de excitação e emissão	Tempo de corrida	Diluição do padrão AFM	NaOH 2M	Ácido fosfórico 5M	Bicarbonato de amônio 0,5M	Ajuste de pH da solução*	Derivatizante (MB)	Tempo de derivatização
Método 1	0,8	35°C	395 e 470 nm	15 min	Metanol	-	90 μ L	200 μ L	-	50 μ L	15 min
Método 2	0,8	35°C	395 e 470 nm	15 min	Metanol	-	90 μ L	200 μ L	-	50 μ L	80 min
Método 3	0,8	35°C	395 e 470 nm	18 min	Fase Móvel (pH 3,0)	-	90 μ L	200 μ L	-	50 μ L	15 min
Método 4	0,8	35°C	395 e 470 nm	35 min	Fase Móvel (pH 3,0)	-	90 μ L	200 μ L	-	50 μ L	18 min
Método 5	0,6	30°C	395 e 470 nm	15 min	Fase Móvel (pH 3,0)	-	90 μ L	200 μ L	-	50 μ L	23 min
Método 6	0,5	30°C	395 e 470 nm	15 min	Fase Móvel	-	90 μ L	200 μ L	pH 6,6	50 μ L	20 min
Método 7	0,8	35°C	395 e 470 nm	20 min	Fase Móvel	-	90 μ L	200 μ L	pH 7,5-8,5	25 μ L	25 min
Método 8	0,8	35°C	395 e 470 nm	20 min	Fase Móvel	-	90 μ L	1,6 mL	-	100 μ L	25 min
Método 9	0,8	35°C	395 e 470 nm	20 min	Fase Móvel	400 μ L	90 μ L	200 μ L	-	50 μ L	25 min
Método 10	0,8	35°C	395 e 470 nm	20 min	Fase Móvel	400 μ L	90 μ L	200 μ L	-	100 μ L	25 min
Método 11	0,8	35°C	395 e 470 nm	20 min	Fase Móvel	400 μ L	90 μ L	200 μ L	-	200 μ L	25 min

Fonte: Do autor.

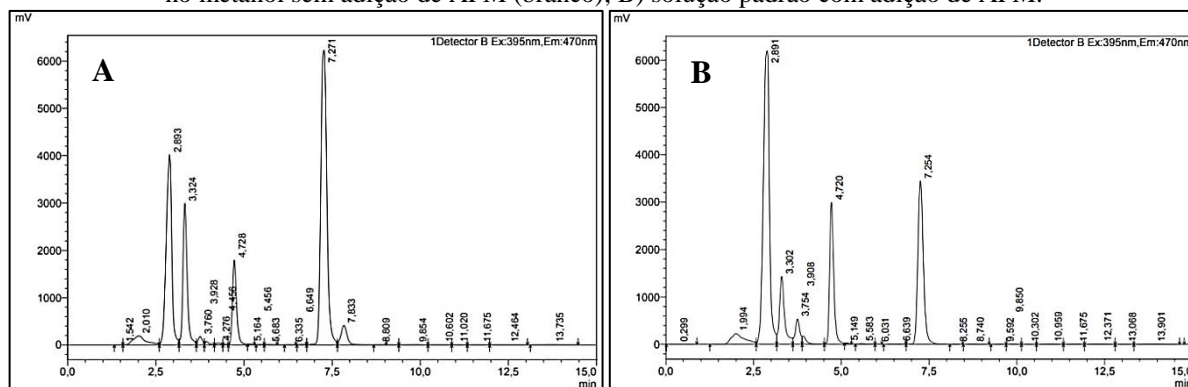
*Neste caso, entende-se como solução a amostra hidrolisada, com a adição do tampão (Ácido fosfórico 5M com o bicarbonato de amônio 0,5M) e do derivatizante.

Figura 13- Cromatogramas obtidos a partir do método 1, onde A) picos característicos dos compostos presentes no metanol sem adição de AFM (branco); B) solução padrão com adição de AFM.



Condições cromatográficas (Método 1): Fluxo= 0,8 mL/min; Temperatura da coluna= 35°C; λ de excitação e emissão= 395 e 470 nm; Tempo da corrida cromatográfica= 15 minutos.

Figura 14- Cromatogramas obtidos a partir do método 2, onde A) picos característicos dos compostos presentes no metanol sem adição de AFM (branco); B) solução padrão com adição de AFM.



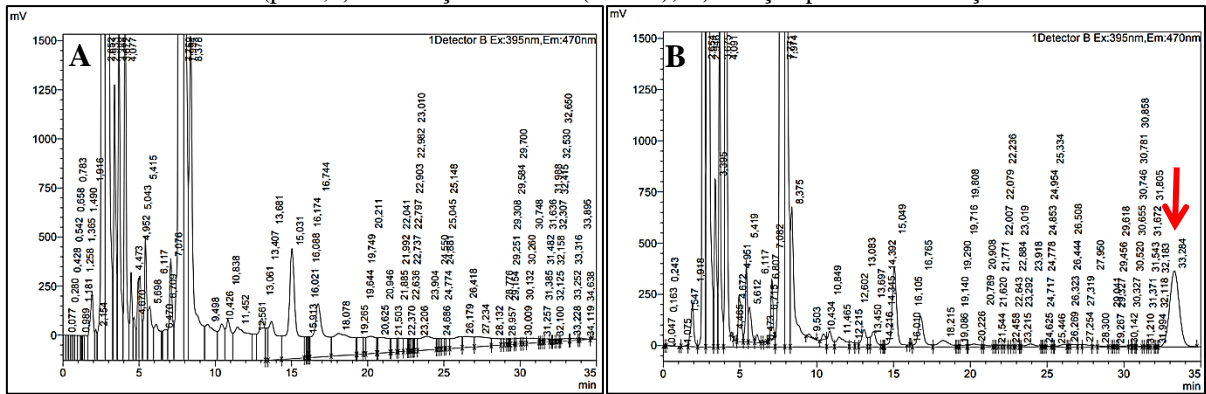
Condições cromatográficas (Método 2): Fluxo= 0,8 mL/min; Temperatura da coluna= 35°C; λ de excitação e emissão= 395 e 470 nm; Tempo da corrida cromatográfica= 15 minutos.

A fim de encontrar o pico cromatográfico do AFM alterações foram feitas no Método 1, substituindo a solução onde o padrão foi diluído (metanol 100% filtrado) pela fase móvel com pH ajustado para 3,0 (Método 3) – também utilizada como solução branca com o objetivo de comparar os cromatogramas. Eliminando esta mudança, todas as outras etapas foram iguais ao do primeiro método e repetidamente nenhum resultado foi encontrado. Acreditando-se que o tempo da corrida cromatográfica e da derivatização da amostra estavam curtos, aumentou-se a duração respectivamente para 35 e 18 minutos (Método 4), mantendo o preparo da amostra e as condições cromatográficas conforme o Método 3. Ao comparar os cromatogramas (branco e padrão) observou-se um possível pico do AFM (indicado pela seta vermelha na figura) em aproximadamente 33,3 minutos (Figura 15a e Figura 15b), contudo não houve reprodutibilidade ao realizar novas análises de diferentes concentrações do analito.

Novas tentativas foram realizadas com outras condições cromatográficas (Método 5) como descrito no Quadro 5. O fluxo foi reduzido para 0,6 mL/min, a temperatura do forno

para 30°C e o tempo de derivatização elevado para 23 minutos. A solução branca e no qual o padrão foi diluído manteve-se sendo a fase móvel com o pH ajustado para 3,0. Mesmo após todas essas alterações na metodologia nenhum resultado foi encontrado ao comparar os cromatogramas (Figura 16a e Figura 16b). Com o propósito de controlar o pH da solução, alterações foram realizadas no método 5 para caracterizar a técnica seguinte (Método 6). O fluxo foi reduzido para 0,5 mL/min, o tempo de derivatização para 20 minutos e a fase móvel utilizada como solução para a diluição do padrão do AFM não teve o pH corrigido. Ao invés disso, a solução, após a adição do tampão, teve o pH corrigido para 6,6 através da adição de NaOH 10N. Mais uma vez não houve o surgimento do pico do analito no cromatograma analisado (Figura 17a e Figura 17b).

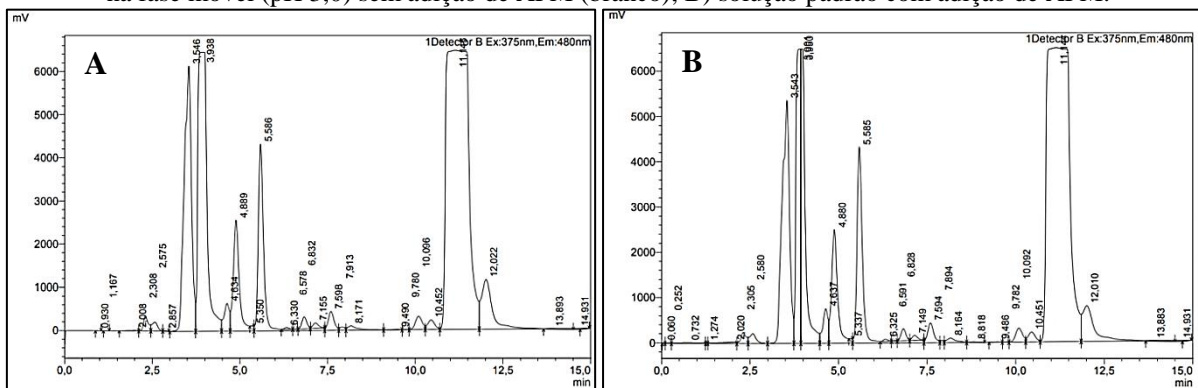
Figura 15- Cromatogramas obtidos a partir do método 4, onde A) picos característicos dos compostos presentes na fase móvel (pH 3,0) sem adição de AFM (branco); B) solução padrão com adição de AFM.



*Seta vermelha indicando o possível pico do AFM.

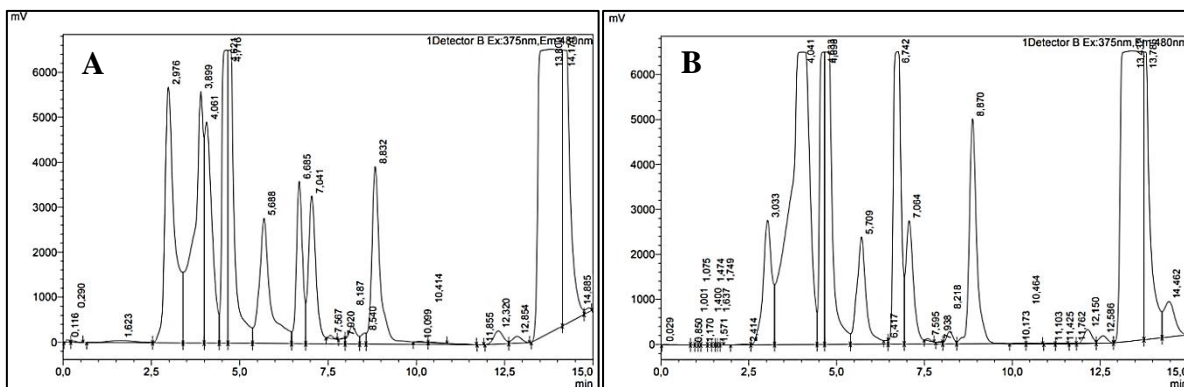
Condições cromatográficas (Método 4): Fluxo= 0,8 mL/min; Temperatura da coluna= 35°C; λ de excitação e emissão= 395 e 470 nm; Tempo da corrida cromatográfica= 35 minutos.

Figura 16- Cromatogramas obtidos a partir do método 5, onde A) picos característicos dos compostos presentes na fase móvel (pH 3,0) sem adição de AFM (branco); B) solução padrão com adição de AFM.



Condições cromatográficas (Método 5): Fluxo= 0,6 mL/min; Temperatura da coluna= 30°C; λ de excitação e emissão= 395 e 470 nm; Tempo da corrida cromatográfica= 15 minutos.

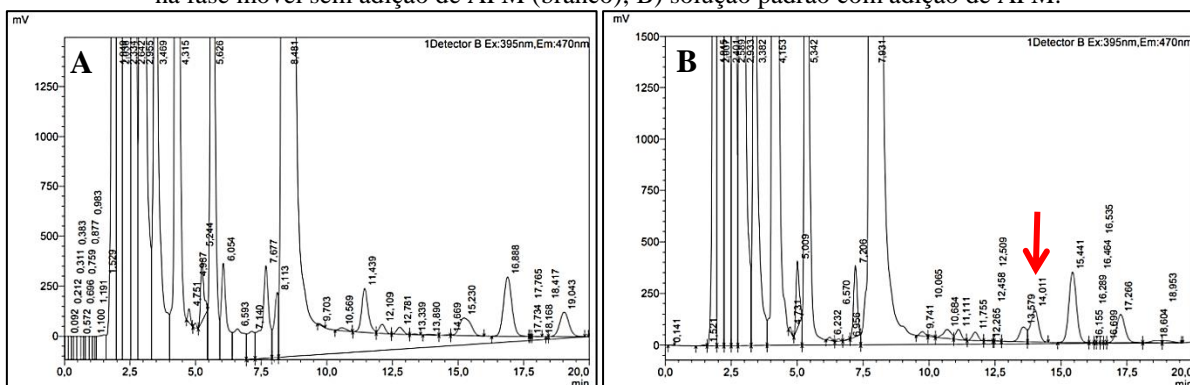
Figura 17- Cromatogramas obtidos a partir do método 6, onde A) picos característicos dos compostos presentes na fase móvel sem adição de AFM (branco); B) solução padrão com adição de AFM.



Condições cromatográficas (Método 6): Fluxo= 0,5 mL/min; Temperatura da coluna= 30°C; λ de excitação e emissão= 395 e 470 nm; Tempo da corrida cromatográfica= 15 minutos.

Supondo-se que a quantidade de derivatizante pudesse estar influenciando no não surgimento do analito no cromatograma e que o pH da solução estaria ácido demais, as etapas foram ajustadas (Método 7), reduzindo a quantidade de derivatizante adicionado para 25 μ L, aumentando o tempo de derivatização para 25 minutos, ajustando o pH da solução entre 7,5 e 8,5 com NaOH 10N e aumentando o fluxo para 0,8mL/min. Ao comparar o cromatograma do branco (fase móvel- Figura 18a) e do padrão (fase móvel + padrão do AFM- Figura 18b) observou-se um possível pico de AFM em aproximadamente 14 minutos. Entretanto ao realizar análises com concentrações de AFM reduzidas não se observou redução da área na mesma proporção.

Figura 18- Cromatogramas obtidos a partir do método 7, onde A) picos característicos dos compostos presentes na fase móvel sem adição de AFM (branco); B) solução padrão com adição de AFM.

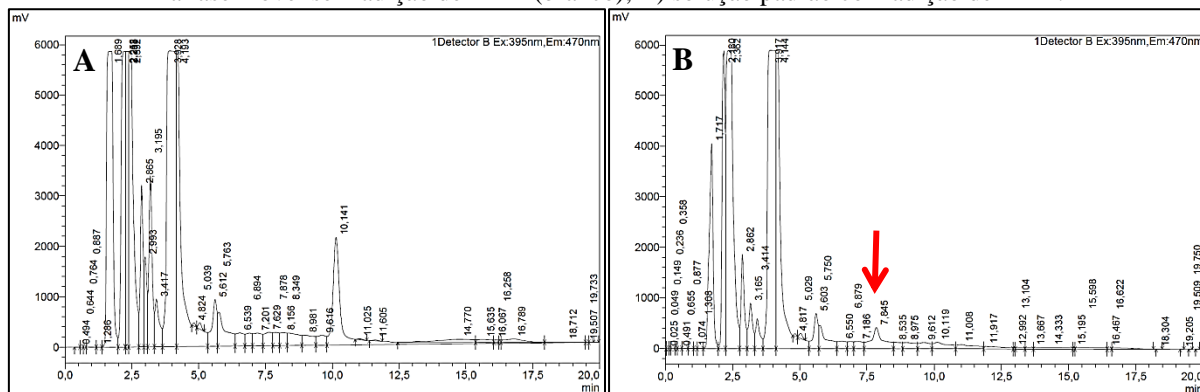


Nota: Seta vermelha indicando o possível pico do AFM.

Condições cromatográficas (Método 7): Fluxo= 0,8 mL/min; Temperatura da coluna= 35°C; λ de excitação e emissão= 395 e 470 nm; Tempo da corrida cromatográfica= 20 minutos.

O método 8 teve como ajustes o aumento da quantidade de derivatizante para 100 μ L e o não ajuste do pH da solução com NaOH 10N, ao contrário do método anterior, em contrapartida, a fim de ajustar o pH da solução, aumentou-se a quantidade de bicarbonato de amônio 0,5M adicionado para 1,6 mL. Observou-se diferença entre os cromatogramas em relação ao pico com o tempo de retenção de 7,845 minutos (Figura 19a e Figura 19b).

Figura 19- Cromatogramas obtidos a partir do método 8, onde A) picos característicos dos compostos presentes na fase móvel sem adição de AFM (branco); B) solução padrão com adição de AFM.

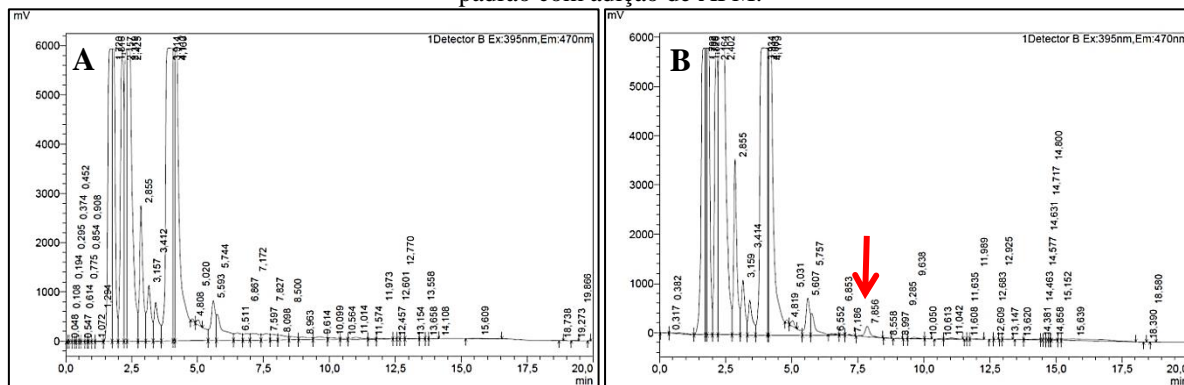


Nota: Seta vermelha indicando o possível pico do AFM.

Condições cromatográficas (Método 8): Fluxo= 0,8 mL/min; Temperatura da coluna= 35°C; λ de excitação e emissão= 395 e 470 nm; Tempo da corrida cromatográfica= 20 minutos.

Percebeu-se que o fator que estava influenciando diretamente na metodologia era o pH da solução. Como as análises em solução aquosa não apresentavam a necessidade de passarem pela técnica na íntegra, as etapas realizadas eram apenas a adição do tampão (ácido fosfórico 5M + bicarbonato de amônio 0,5M) e do derivatizante, entretanto, ao adicionar 400 µL de NaOH 2M (etapa realizada em urina para a hidrólise da amostra) na solução antes dessas etapas observou-se a presença do analito em aproximadamente 7,8 minutos (indicado pela seta vermelha na figura) de forma reprodutível (Figura 20a e Figura 20b). Dessa forma testes foram realizados com diferentes volumes de derivatizante adicionados a fim de encontrar a quantidade mais eficiente. Ao comparar as seguintes quantidades de derivatizante – 50 µL (Método 9); 100 µL (Método 10) e 200 µL (Método 11) – não encontrou nenhuma diferença nos valores das áreas do pico.

Figura 20- Cromatogramas obtidos a partir da adição de 400 uL de NaOH 2M antes da etapa de derivatização, onde A) picos característicos dos compostos presentes na fase móvel sem adição de AFM (branco); B) solução padrão com adição de AFM.



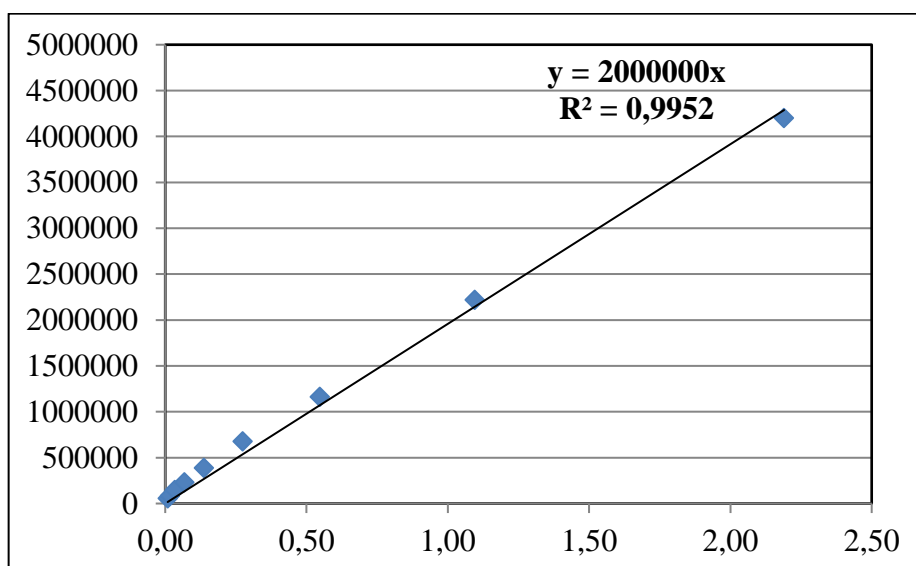
Nota: Seta vermelha indicando o pico do AFM.

Condições cromatográficas (Método 9): Fluxo= 0,8 mL/min; Temperatura da coluna= 35°C; λ de excitação e emissão= 395 e 470 nm; Tempo da corrida cromatográfica= 20 minutos.

5.2.2 Curva de calibração do AFM em fase móvel

Após as diferentes tentativas citadas anteriormente o método 9 foi implementado em fase móvel, obtendo-se a curva de calibração em 9 concentrações: 10; 20; 30; 70; 140; 270; 550; 1100 e 2190 $\mu\text{g/L}$. Os resultados são organizados em uma tabela e plotados num gráfico, permitindo o cálculo estatístico de regressão desta curva. Os dados obtidos da curva analítica (Figura 21) foram ajustados ao modelo de regressão linear simples, obtendo-se a seguinte equação da reta: $\text{Área} = 2000000 \times (\text{concentração})$, sendo o coeficiente de correlação (R^2)= 0,9952.

Figura 21- Curva de calibração do AFM em fase móvel obtida a partir de 9 concentrações.



5.2.3 Curva de calibração do AFM em matriz biológica

A obtenção da curva analítica (Figura 22) em urina foi realizada de acordo com o método 9 (Quadro 5) em 6 concentrações: 10; 20; 40; 80; 160 e 200 $\mu\text{g/L}$, onde todas as amostras passaram por todas as etapas da metodologia descrita no tópico (4.8 Metodologia do AFM). Os dados obtidos da curva analítica foram ajustados ao modelo de regressão linear simples, obtendo-se a seguinte equação de regressão: $\text{Área} = 14026 \times (\text{concentração})$, sendo o coeficiente de correlação (R^2)= 0,9958.

O tempo de retenção do AFM é em torno de 7,1 minutos (Figura 23), sofrendo pequenas variações ao longo do tempo. Devido a este motivo, constantemente analisava-se uma amostra controle (urina batizada com padrão de AFM) concomitante com as amostras dos participantes para confirmar o tempo de retenção do analito no dia da análise.

Figura 22- Curva de calibração do AFM em urina obtida a partir de 6 concentrações.

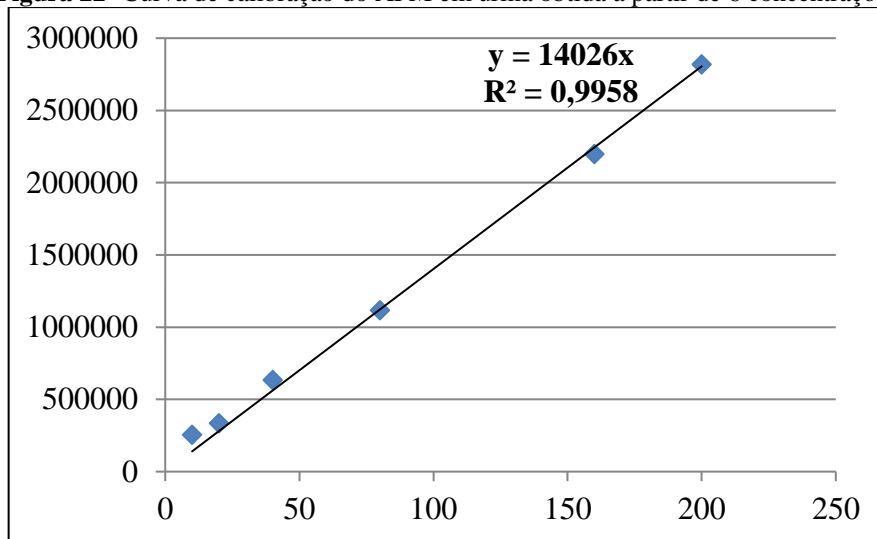
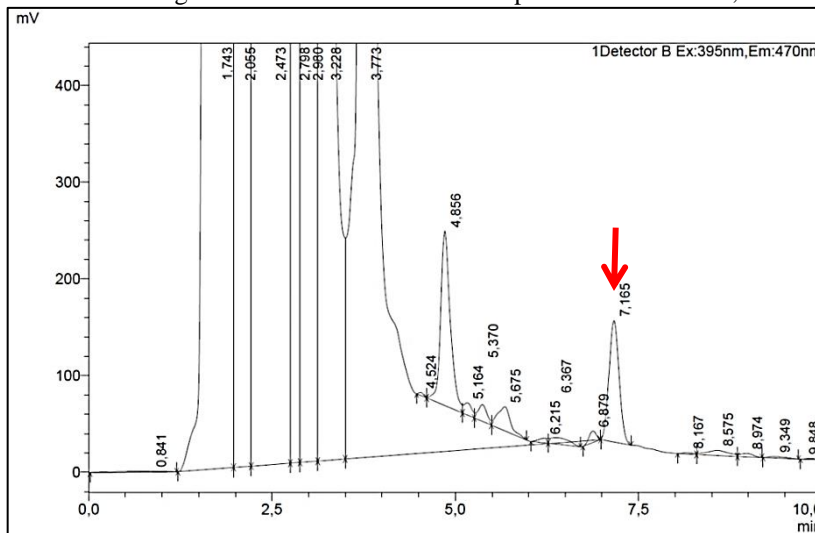


Figura 23- Cromatograma do AFM evidenciando o pico do analito em 7,165 minutos.



Nota: Seta vermelha indicando o pico do AFM.

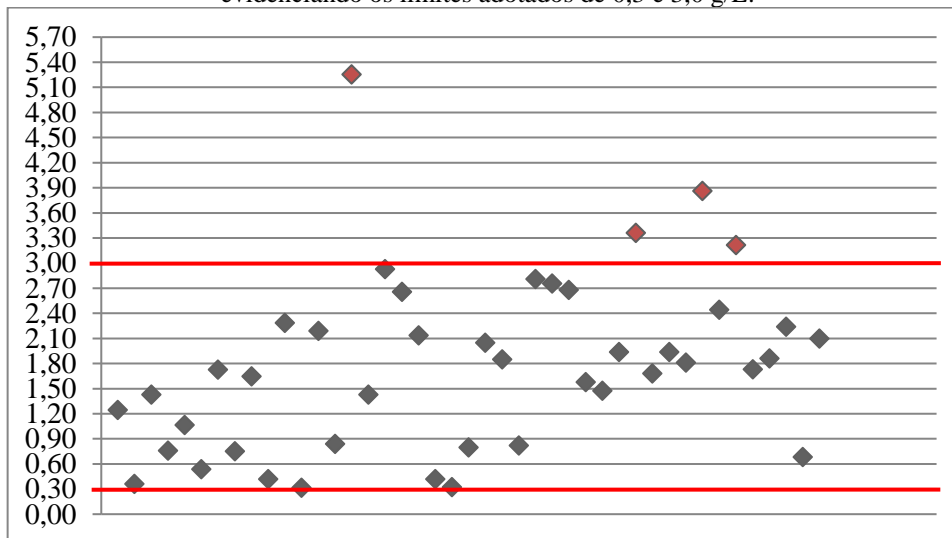
Condições cromatográficas (Método 9): Fluxo= 0,8 mL/min; Temperatura da coluna= 35°C; λ de excitação e emissão= 395 e 470 nm; Tempo da corrida cromatográfica= 10 minutos.

5.3 Análises da creatinina urinária

Dentre as 43 amostras de trabalhadores expostos ocupacionalmente ao benzeno coletadas, 4 homens (9,3%) estavam com os níveis de creatinina acima de 3,0 g/L (Figura 24),

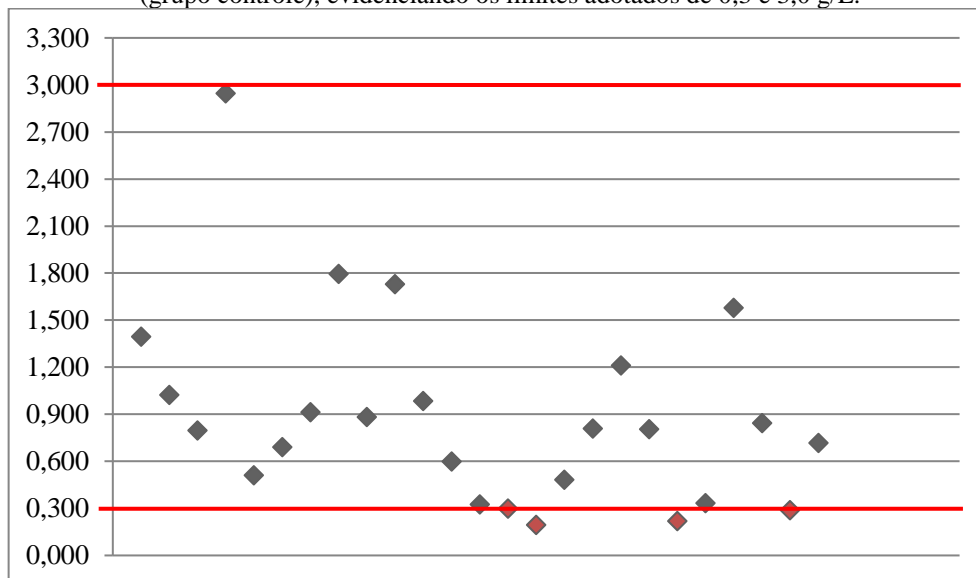
fora da faixa aceitável de concentração estabelecida pela ACGIH (1999), e por este motivo foram excluídas das demais análises (AttM e AFM), ou seja, o número final foi de 39 de participantes.

Figura 24- Nível de creatinina urinária (g/L) dos trabalhadores expostos ocupacionalmente ao benzeno, evidenciando os limites adotados de 0,3 e 3,0 g/L.



Em relação ao grupo controle, dos 25 participantes, 4 mulheres (16%) apresentaram níveis de creatinina menores do que 0,3 g/L e por este motivo também foram excluídos do estudo (Figura 25), sendo o grupo controle composto por 21 participantes.

Figura 25- Nível de creatinina urinária (g/L) dos trabalhadores não expostos ocupacionalmente ao benzeno (grupo controle), evidenciando os limites adotados de 0,3 e 3,0 g/L.



5.4 Características da população de estudo

As principais características da população estudada, como sexo, escolaridade, tabagismo, consumo de alimentos industrializados, cor, tempo de trabalho na ocupação atual e renda categórica estão apresentadas na Tabela 3, referente ao grupo exposto ocupacionalmente ao benzeno (Expostos) e ao grupo não exposto ocupacionalmente ao benzeno (Não expostos).

Tabela 3- Características da população de estudo.

		Não expostos	Expostos	
		n (%)	n (%)	p-valor*
Sexo				
	Masculino	5 (23,8)	36 (92,3)	0,00
	Feminino	16 (76,2)	3 (7,7)	
Escolaridade (anos)				
	Ensino superior	16 (76,2)	5 (12,8)	0,00
	Ensino médio	3 (14,3)	23 (59,0)	
	Ensino fundamental	2 (9,5)	11 (28,2)	
Tabagismo				
	Não fumante	19 (90,5)	32 (82,1)	0,313
	Ex-fumante	2 (9,5)	3 (7,7)	
	Fumante	0 (0,0)	4 (10,3)	
Consumo de alimentos industrializados				
	Não	5 (23,8)	4 (10,8)	0,234
	1-2 vezes por semana	7 (12,5)	20 (54,1)	
	3-6 vezes por semana	9 (42,9)	13 (35,1)	
Cor				
	Preta	3 (14,3)	9 (23,1)	0,004
	Parda	7 (33,3)	25 (64,1)	
	Branca	11 (52,4)	4 (10,3)	
	Indígena	0 (0,0)	1 (2,6)	
Tempo de trabalho				
	Até 9 anos	9 (60,0)	28 (71,8)	0,614
	10-20 anos	5 (33,3)	8 (20,5)	
	Mais de 20 anos	1 (6,7)	3 (7,7)	
Renda categórica				
	Até 3 salários mínimos** (R\$2811,00)	5 (23,8)	24 (61,5)	0,005
	Mais de 3 salários mínimos (>R\$2811,00)	16 (76,2)	15 (38,5)	

*teste Qui-quadrado, pós-teste Bonferroni.

**Salário mínimo utilizado como referência foi do ano de 2017, com valor igual a R\$937,00 (BRASIL, 2016).

Dados coletados entre o ano de 2014-2016, quando o projeto iniciou e os participantes responderam os questionários clínicos e individuais.

Como descrito no tópico 4.4, os indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno são trabalhadores de PRCs, que dentre tantas funções, realizam principalmente abastecimentos de combustíveis diariamente nos veículos e que por este motivo estão expostos a altas concentrações de benzeno no ambiente de trabalho. A maioria destes trabalhadores são homens (92,3%), pardos (64,1%), com grau de escolaridade média (59,0%), não fumantes (82,1%), com renda de até 3 salários mínimos (61,5%), que consomem alimentos industrializados de 1 à 2 vezes por semana (54,1%) e que exercem a profissão por menos de 9 anos (71,8%).

Em relação ao grupo não exposto, o mesmo é composto por trabalhadores (a grande maioria concursados) das instituições do INCA e da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO), que ocupam principalmente cargos administrativos e que não estão expostos ao benzeno no seu ambiente de trabalho. A maioria destes indivíduos são mulheres (76,2%), brancos (52,4%), com ensino superior (76,2%), não fumantes (90,5%), com renda de mais de 3 salários mínimos (76,2%), que consomem alimentos industrializados de 3 à 6 vezes por semana (42,9%) e que exercem a profissão por menos de 9 anos (60,0%).

Ao comparar os dois grupos de estudo (grupo exposto e grupo controle) observou-se diferença estatisticamente significativa (p-valor menor do que 0,05) entre eles em relação ao sexo (p-valor= 0,000), escolaridade (p-valor= 0,000), cor (p-valor= 0,004) e renda categórica (p-valor =0,005).

Em relação ao grupo não exposto observou-se que a maior parcela dos indivíduos afirmou não apresentar, durante o trabalho, os sintomas/sinais listados, com exceção da ansiedade, onde 61,9% dos participantes afirmaram sofrer deste problema. Já em relação ao grupo exposto, a grande maioria dos trabalhadores alegou não apresentar os sintomas/sinais especificados. Ao comparar os dois grupos em relação aos sintomas não houve diferença significativa (p-valor<0,05) entre eles.

Tabela 4- Sinais e sintomas declarados pelos participantes da pesquisa (Grupo não exposto e exposto).

	Não expostos	Expostos	p-valor*
	n (%)	n (%)	
Emagrecimento			
Não	20 (95,2)	36 (92,3)	0,664
Sim	1 (4,8)	3 (7,7)	
Fraqueza			
Não	18 (85,7)	33 (84,4)	0,909
Sim	3 (14,3)	6 (15,4)	
Tontura			
Não	17 (81,0)	32 (82,1)	0,916
Sim	4 (19,0)	7 (17,9)	
Sonolência			
Não	16 (76,2)	27 (69,2)	0,568
Sim	5 (23,8)	12 (30,8)	
Dificuldade de enxergar			
Não	12 (57,1)	30 (76,9)	0,111
Sim	9 (42,9)	9 (23,1)	
Cefaléia/Dor de cabeça			
Não	14 (66,7)	25 (64,1)	0,843
Sim	7 (33,3)	14 (35,9)	
Irritabilidade/Nervosismo			
Não	18 (85,7)	25 (64,1)	0,076
Sim	3 (14,3)	14 (35,9)	
Ansiedade			
Não	8 (38,1)	25 (64,1)	0,053
Sim	13 (61,9)	14 (35,9)	
Insônia			
Não	15 (71,4)	32 (82,1)	0,341
Sim	6 (28,6)	7 (17,9)	
Alteração do humor/Depressão			
Não	19 (90,5)	35 (89,7)	0,928
Sim	2 (9,5)	4 (10,3)	
Alteração da atenção			
Não	13 (61,9)	31 (79,5)	0,142
Sim	8 (38,1)	8 (20,5)	
Alteração da memória			
Não	14 (66,7)	29 (74,4)	0,528
Sim	7 (33,3)	10 (25,6)	
Sudorese noturno			
Não	21 (100,0)	33 (84,6)	0,058
Sim	0 (0,0)	6 (15,4)	
Formigamentos			
Não	17 (81,0)	33 (84,6)	0,717
Sim	4 (19,0)	6 (15,4)	
Tremores			
Não	20 (95,2)	35 (89,7)	0,463
Sim	1 (4,8)	4 (10,3)	
Cãibras			
Não	14 (66,7)	25 (64,1)	0,843
Sim	7 (33,3)	14 (35,9)	

*teste Qui-quadrado, pós-teste Bonferroni.

Tabela 4- Sinais e sintomas declarados pelos participantes da pesquisa (Grupo não exposto e exposto).
(continua)

	Não expostos	Expostos	p-valor*
	n (%)	n (%)	
Convulsões			
Não	21 (100,0)	38 (97,4)	0,459
Sim	0 (0,0)	1 (2,6)	
Diminuição da força			
Não	17 (81,0)	32 (82,1)	0,916
Sim	4 (19,0)	7 (17,9)	
Petéquias			
Não	20 (95,2)	38 (97,4)	0,651
Sim	1 (4,8)	1 (2,6)	
Movimentos involuntários			
Não	20 (95,2)	31 (79,5)	0,103
Sim	1 (4,8)	8 (20,5)	
Hematomas			
Não	20 (95,2)	38 (97,4)	0,651
Sim	1 (4,8)	1 (2,6)	
Epistaxe			
Não	19 (90,5)	36 (92,3)	0,807
Sim	2 (9,5)	3 (7,7)	

*teste Qui-quadrado, pós-teste Bonferroni.

5.5 Análises do ácido trans, trans-mucônico

De acordo com a Tabela 5, após a análise do ácido trans, trans-mucônico, um dos metabólitos do benzeno, observou-se que os valores médios dos níveis urinários do AttM dos indivíduos expostos foi cerca de 7 vezes maior ($1,02 \pm 1,86$ mg/g creatinina) do que o grupo não exposto ($0,14 \pm 0,11$ mg/g creatinina). O grupo exposto também apresentou os maiores percentis, onde 75% (P75) do grupo teve seus valores de AttM até 0,85 mg/g creatinina, ou seja, cerca de 4 vezes maior do que o P75 do grupo controle (0,19 mg/g creatinina).

Ao subdividir o grupo exposto em postos da Zona Sul e do Centro (Tabela 5), observou que o primeiro apresentou média dos níveis de AttM urinário cerca de 3 vezes maior ($1,47 \pm 2,38$ mg/g creatinina) do que dos trabalhadores do Centro ($0,45 \pm 0,44$ mg/g creatinina), além da distribuição heterogênea dos percentis entre as duas localidades, sendo o grupo da Zona Sul responsável pelos maiores valores encontrados. Tais dados são confirmados na Figura 26, que ilustra a presença de 4 *outliers* nos postos da Zona Sul e 3 nos postos do Centro do Rio de Janeiro, onde os níveis de AttM urinário entre as duas localidades

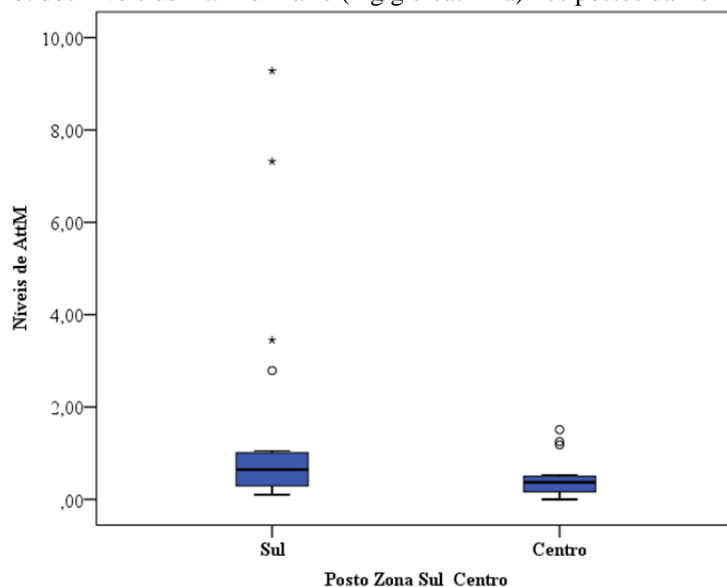
são diferentes estatisticamente. Ao comparar a Zona Sul com o Centro, observa-se que o primeiro possui maior intervalo interquartil e por isso maior variabilidade dos níveis de AttM quando confrontado com o último.

Tabela 5- Distribuição do AttM em trabalhadores expostos e não expostos.

Biomarcador de exposição AttM (mg/g creatinina)									
	n	Média	DP	MIN	MAX	P25	P50	P75	P95
Não expostos	21	0,14	0,11	0,02	0,52	0,06	0,12	0,19	0,50
Expostos	39	1,02	1,86	0,00	9,28	0,24	0,41	0,85	7,32
Zona Sul	22	1,47	2,38	0,10	9,28	0,29	0,65	1,02	9,0
Centro	17	0,45	0,44	0,00	1,51	0,14	0,37	0,52	-

Nota: n = número de indivíduos; DP = desvio padrão; MIN = valor mínimo encontrado; MAX = valor máximo encontrado; P25 = percentil 25; P50 = percentil 50; P75 = percentil 75; P95 = percentil 95.

Figura 26- Boxplot dos níveis de AttM urinário (mg/g creatinina) nos postos da Zona Sul e do Centro.



A distribuição dos níveis de AttM urinário não se apresentou normal em ambos os testes (Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk), já que, como observado na Quadro 7 todos os p-valores foram menores do que 0,05, rejeitando-se a hipótese nula (H_0) de Normalidade e por isso testes estatísticos paramétricos não foram utilizados na comparação dos grupos.

Quadro 7- Teste de normalidade para níveis de AttM urinário nos grupos de estudo.

Níveis de AttM	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro-Wilk		
	DF	p-valor	Conclusão	DF	p-valor	Conclusão
Não expostos	21	0,016	Rejeita-se H_0	21	0,001	Rejeita-se H_0
Expostos	39	0,000	Rejeita-se H_0	39	0,000	Rejeita-se H_0
Zona Sul	22	0,000	Rejeita-se H_0	22	0,000	Rejeita-se H_0
Centro	17	0,006	Rejeita-se H_0	17	0,002	Rejeita-se H_0

Nota: DF = quantidade de amostras; H_0 = hipótese nula.

5.6 Análises do ácido s-fenilmercaptúrico

De acordo com a Tabela 7, após a análise do ácido s-fenilmercaptúrico, outro metabólito do benzeno, observou-se que os valores médios dos níveis urinários do AFM dos indivíduos expostos foram cerca de 14 vezes maior ($17,62 \pm 16,07 \mu\text{g/g}$ creatinina) do que o grupo não exposto ($1,26 \pm 2,50 \mu\text{g/g}$ creatinina). O grupo exposto também apresentou os maiores percentis, onde 75% (P75) do grupo teve seus valores de AFM até $23,18 \mu\text{g/g}$ creatinina, cerca de 11 vezes maior do que o P75 do grupo controle ($2,06 \mu\text{g/g}$ creatinina).

Ao subdividir o grupo exposto em postos da Zona Sul e do Centro (Tabela 6), observou que o primeiro apresentou média dos níveis de AFM urinário cerca de 1,5 vezes maior ($20,72 \pm 15,9 \mu\text{g/g}$ creatinina) do que dos trabalhadores do Centro ($13,60 \pm 15,8 \mu\text{g/g}$ creatinina), além da distribuição heterogênea dos percentis entre as duas localidades, sendo o grupo da Zona Sul responsável pelos maiores valores encontrados. Tais dados são confirmados na Figura 27, que ilustra a presença de nenhum *outliers* nos postos da Zona Sul e 2 nos postos do Centro do Rio de Janeiro, onde os níveis de AFM urinário entre as duas localidades são diferentes estatisticamente. Ao comparar a Zona Sul com o Centro, observa-se que o primeiro possui maior intervalo interquartil e por isso maior variabilidade dos níveis de AFM quando confrontado com o último.

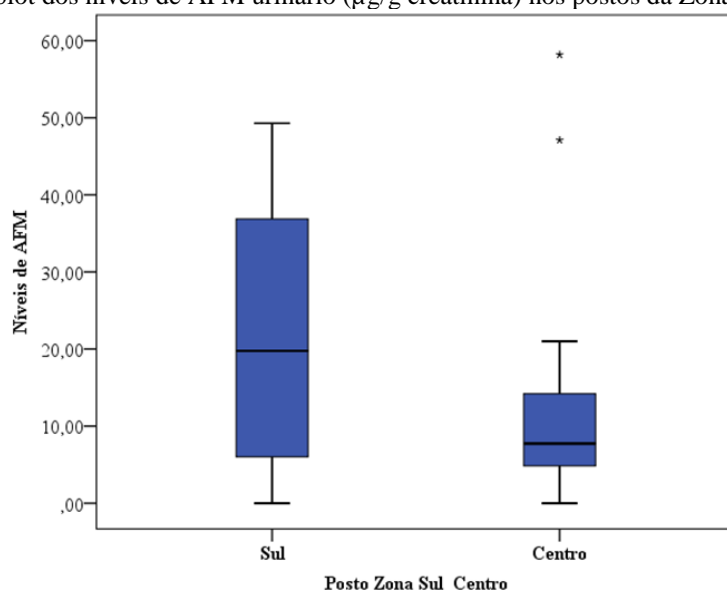
Tabela 6- Distribuição do AFM em trabalhadores expostos e não expostos.

Biomarcador de exposição AFM ($\mu\text{g/g}$ creatinina)									
	n	Média	DP	MIN	MAX	P25	P50	P75	P95
Não expostos	21	1,26	2,50	0,00	8,18	0,00	0,00	2,06	8,16
Expostos (Total)	39	17,62	16,07	0,00	58,18	4,83	12,67	23,18	49,29
Zonal Sul	22	20,72	15,9	0,00	49,29	5,45	19,77	37,20	48,96
Centro	17	13,60	15,8	0,00	58,18	4,83	7,73	15,26	-

Nota: n = número de indivíduos; DP = desvio padrão; MIN = valor mínimo encontrado; MAX = valor máximo encontrado; P25 = percentil 25; P50 = percentil 50; P75 = percentil 75; P95 = percentil 95.

A distribuição dos níveis de AFM urinário não se apresentou normal em ambos os testes (Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk), já que, como observado no Quadro 8 todos os p-valores, com exceção do grupo exposto da zona sul, foram menores do que 0,05, rejeitando-se a hipótese nula (H_0) de Normalidade e por isso testes estatísticos paramétricos não foram utilizados na comparação dos grupos.

Figura 27- Boxplot dos níveis de AFM urinário ($\mu\text{g/g}$ creatinina) nos postos da Zona Sul e do Centro.



Quadro 8- Teste de normalidade para níveis de AFM urinário nos grupos de estudo.

Níveis de AFM	Kolmogorov-Smirnov			Shapiro – Wilk		
	DF	p-valor	Conclusão	DF	p-valor	Conclusão
Não expostos	21	0,000	Rejeita-se H_0	21	0,000	Rejeita-se H_0
Expostos	39	0,030	Rejeita-se H_0	39	0,000	Rejeita-se H_0
Zonal Sul	22	0,200	Não rejeita-se H_0	22	0,068	Não rejeita-se H_0
Centro	17	0,004	Rejeita-se H_0	17	0,000	Rejeita-se H_0

Nota: DF = quantidade de amostras; H_0 = hipótese nula.

5.7 Correlação entre os biomarcadores AttM e AFM

Com o propósito de comparar os dois biomarcadores de exposição categorizou-se os níveis de AttM urinário em relação ao limite biológico (0,5 mg/g creatinina) estabelecido pela Portaria 34 do MTE (MTE, 2001), como valores menores do que 0,5 mg/g creatinina e maiores do que 0,5 mg/g creatinina, e os níveis de AFM urinário em relação ao limite biológico de exposição (25 $\mu\text{g/g}$ creatinina) recomendado pela ACGIH (ACGIH, 2014), como valores menores do que 25 $\mu\text{g/g}$ creatinina e maiores do que 25 $\mu\text{g/g}$ creatinina.

Em relação ao AttM, pode-se observar (Figura 28) que a frequência de trabalhadores que obtiveram os valores de AttM (mg/g creatinina) superiores ao limite considerado aceitável (0,5 mg/g creatinina) foi maior na Zona Sul (59%) do que no Centro (29%) corroborando com os resultados descritos anteriormente. Em relação ao grupo controle apenas um indivíduo apresentou resultados acima do limite permitido e ao comparar esse grupo com

o grupo exposto (Zona Sul e Centro), a distribuição dos valores de AttM foi mais baixa – entre 0,00 e 0,20 mg/g creatinina (Figura 29).

Figura 28- Níveis de AttM urinário e frequência de indivíduos com os valores de AttM superiores ou inferiores a 0,5 mg/g creatinina na Zona Sul (à esquerda) e no Centro (à direita).

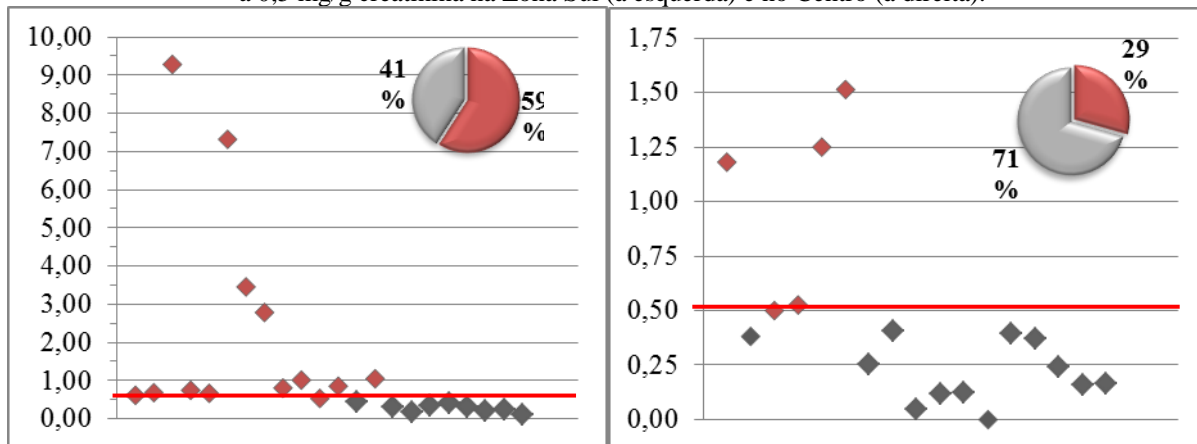
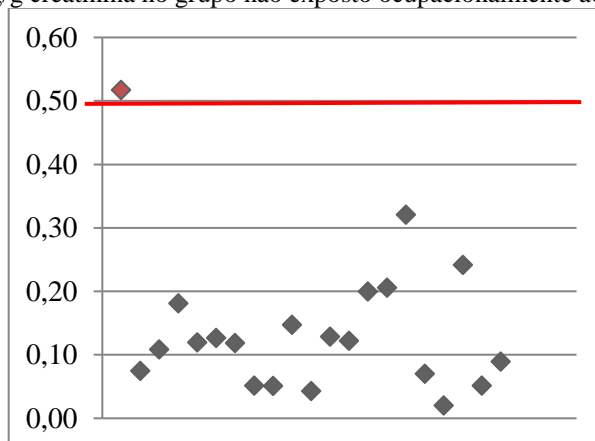


Figura 29- Níveis de AttM urinário e frequência de indivíduos com os valores de AttM superiores ou inferiores a 0,5 mg/g creatinina no grupo não exposto ocupacionalmente ao benzeno.



Já em relação ao AFM, observou-se (Figura 30) que a frequência de trabalhadores que obtiveram os valores de AFM ($\mu\text{g/g}$ creatinina) superiores ao limite considerado aceitável foi maior na Zona Sul (27%) do que no Centro (12%) também corroborando com os resultados descritos anteriormente. Em relação ao grupo controle nenhum indivíduo apresentou resultados acima do limite permitindo e ao comparar esse grupo com o grupo exposto (Zona Sul e Centro) notou-se que a distribuição dos valores de AFM foi próxima à zero (Figura 31).

Figura 30- Níveis de AFM urinário e frequência de indivíduos com os valores de AFM superiores ou inferiores a 25 µg/g creatinina na Zona Sul (à esquerda) e no Centro (à direita).

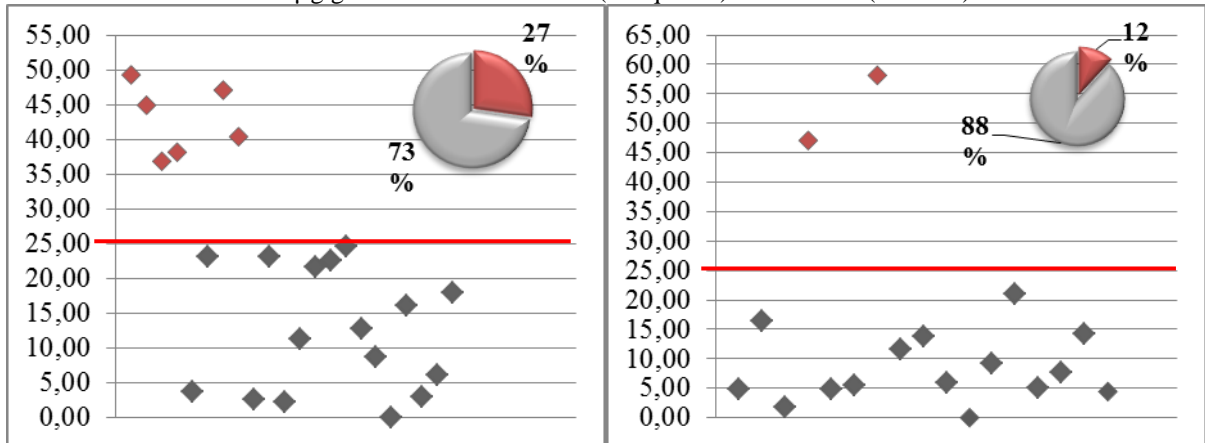
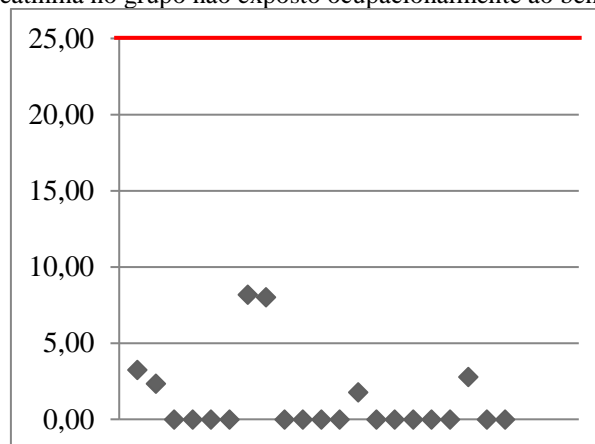


Figura 31- Níveis de AFM urinário e frequência de indivíduos com os valores de AFM superiores ou inferiores a 25 µg/g creatinina no grupo não exposto ocupacionalmente ao benzeno.



Comparando ambos os resultados, o AttM foi o biomarcador que possuiu maior frequência de indivíduos (Zona Sul – 59%; Centro – 29%) acima do limite biológico aceitável em relação ao AFM (Zonal Sul – 27%; Centro – 12%). Não subdividindo o grupo exposto em relação à localidade, observou-se diferença significativa (p-valor= 0,002) em relação aos níveis de AttM e o grupo exposto e não exposto. Já em relação ao AFM não houve diferença significativa (Tabela 7).

Tabela 7- Relação entre os níveis dos biomarcadores (AttM e AFM) e o grupo exposto e não exposto.

	Não expostos		Expostos	p-valor*
	n (%)	n (%)	n (%)	
AttM (mg/g creatinina)				
< 0,5	20 (95,2)	22 (56,4)		0,002
> 0,5	1 (4,8)	17 (43,6)		
AFM (µg/g creatinina)				
< 25,0	21 (100,0)	31 (79,5)		0,26
> 25,0	0 (0,0)	8 (20,5)		

*teste Qui-quadrado, pós-teste Bonferroni.

Ao comparar ambos os indicadores biológicos de exposição do benzeno, houve correlação significativa entre os níveis de AttM e AFM (p-valor= 0,001) e em relação aos níveis de AttM e a localidade dos postos – Zona Sul e Centro (p-valor= 0,034). Os níveis de AFM não obtiveram correlação com a região do PRC (Quadro 9).

Quadro 9- Correlação entre os níveis de AFM e AttM e entre os níveis e o grupo exposto.

		Níveis de AttM	Níveis de AFM	Grupo exposto (Zona Sul-Centro)
Níveis de AttM	Coef. de correlação*	1,00	0,418	-0,340
	Sig		0,001	0,034
Níveis de AFM	Coef. de correlação*	0,418	1,00	-0,241
	Sig	0,001		0,139

Nota: coef.= coeficiente; sig= significância. *Teste de correlação não paramétrico: Spearman's rho.

6. DISCUSSÃO

6.1 Implementação e validação do AttM

A implementação e validação do AttM foi realizada de acordo com todos os parâmetros estabelecidos na RDC N° 166 (ANVISA, 2017). A curva analítica em urina (Figura 13) foi construída a partir de 5 concentrações distintas como o estabelecido no Art. 25 da Seção II da mesma resolução, que define a utilização mínima de cinco concentrações diferentes para o estabelecimento da linearidade. O coeficiente de correlação obtido através da regressão linear simples ($R^2 = 0,999$) atendeu o parâmetro estabelecido no Art. 27 da Seção II, onde o mesmo, obrigatoriamente, deve estar acima de 0,990.

O tempo de retenção do analito após a implementação e validação do método se manteve em aproximadamente 14,8 minutos, dado semelhante ao encontrado no estudo de Ducos e colaboradores (1990) que foi cerca de 15 minutos.

6.2 Implementação e validação do AFM urinário

A implementação e validação do AFM foi realizada de acordo com todos os parâmetros estabelecidos na RDC N° 166 (ANVISA, 2017).

6.2.1 Otimização das condições do sistema analítico HPLC-Fluorimétrico

Após a análise de todos os resultados, observou-se que determinadas etapas e condições cromatográficas foram determinantes na implementação do método como: tempo da corrida cromatográfica, tempo de derivatização, quantidade adicionada de derivatizante, solução diluidora do padrão AFM, temperatura do forno, fluxo da coluna, ajuste do pH da solução, adição de NaOH 5M e quantidade adicionada de bicarbonato de amônio 0,5M.

A cromatografia líquida de alta eficiência é um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição dessas substâncias entre duas fases. Uma das fases permanece estacionária enquanto a outra se move através dela, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária em

tempos de retenção distintos. O tamanho da partícula da coluna cromatográfica também é um controlador do processo de difusão das moléculas da amostra e retenção dos mesmos. Quanto maior o tamanho da partícula, maior é a profundidade dos poros e mais lento será o processo de difusão, uma vez que essas moléculas demoram mais tempo para sair destes poros profundos e serem detectadas (COLLINS, 1997). Devido a este motivo, testou-se diferentes durações da corrida cromatográfica a fim de encontrar o analito de interesse, uma vez que o seu tempo de retenção poderia ser maior do que o tempo da corrida e devido a isto não estaria sendo quantificado. Após todas as tentativas (10, 15, 18, 20 e 35 minutos), a duração da corrida cromatográfica foi estabelecida em 10 minutos, uma vez que o analito apresentou o TR de aproximadamente 7,1 minutos, valor um pouco acima do encontrado no estudo de Mendes e colaboradores (2017) (5,9 minutos).

Outra etapa importante durante a realização do método é a quantidade de derivatizante adicionado a solução e o tempo de derivatização, ou seja, o tempo de espera necessário antes que a amostra derivatizada seja injetada no sistema cromatográfico. A determinação do ácido s-fenilmercaptúrico necessita da adição de um derivatizante para que ocorra a formação de um conjugado fluorescente que consiga ser quantificado pelo detector de fluorescência. Acreditando-se que a quantidade de derivatizante não estivesse sendo suficiente para derivatizar por completo todo o analito da amostra, diferentes volumes foram testados (25, 50, 100 e 200 μL) e assim como em estudos encontrados na literatura (BURATTI *et al.*, 2001; MENDES *et al.*, 2017) 50 μL foi o volume suficiente e necessário para derivatizar a amostra. A mesma concordância não foi encontrada em relação a duração da derivatização, observou-se que o melhor tempo foi de 25 minutos, o que difere do encontrado nesses mesmos estudos (15 minutos).

Para a implementação da metodologia a etapa de maior representatividade no resultado final, foi o ajuste do pH da solução. Como a primeira etapa foi implementação em fase móvel, as amostras não precisavam passar por toda a técnica, uma vez que não se tratava de matriz biológica. Por este motivo, apenas a etapa de adição de tampão e do derivatizante que eram executadas. Entretanto, ao realizar tentativas aumentando a quantidade de bicarbonato de amônio (responsável por neutralizar o meio) de 200 μl para 1,6 mL observou-se resultado positivo, com o aparecimento do pico cromatográfico do analito. Com esta descoberta, notou-se que a etapa de hidrólise alcalina (adição 400 mL de NaOH 2M) é fundamental para tornar o meio mais básico e eliminar as interferências de proteínas,

precipitando-as (MENDES *et al.*, 2017), permitindo, posteriormente, a derivatização do AFM e quantificação do mesmo.

6.2.2 Curva de calibração do AFM em fase móvel

A construção da curva analítica do AFM em fase móvel (Figura 22) foi a partir de 9 concentrações distintas como o estabelecido no Art. 25 da Seção II da RDC Nº 166 (ANVISA, 2017), que define a utilização mínima de cinco concentrações diferentes para o estabelecimento da linearidade. O coeficiente de correlação obtido através da regressão linear simples ($R^2= 0,9952$) atendeu o parâmetro estabelecido no Art. 27 da Seção II, da mesma resolução, onde o mesmo, obrigatoriamente, deve estar acima de 0,990.

6.2.3 Curva de calibração do AFM em matriz biológica

Em relação ao desenvolvimento da curva analítica do AFM em urina (Figura 23), a mesma foi construída a partir de 6 concentrações distintas como o estabelecido no Art. 25 da Seção II da RDC Nº 166 (ANVISA, 2017), que define a utilização mínima de cinco concentrações diferentes para o estabelecimento da linearidade. O coeficiente de correlação obtido através da regressão linear simples ($R^2= 0,9958$) atendeu o parâmetro estabelecido no Art. 27 da Seção II, onde o mesmo, obrigatoriamente, deve estar acima de 0,990.

6.3 Análises da creatinina urinária

Observou-se que indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno apresentaram níveis mais elevados de creatinina urinária do que o grupo controle. Os participantes do grupo exposto excluídos do estudo foram que apresentaram creatinina urinária superior a 3,0 g/L, enquanto que os excluídos do grupo controle foram porque apresentaram níveis inferior a 0,3 g/L. Conforme observado durante a realização das entrevistas e coletas nos PCRs, tal achado pode ser justificado pela rotina de trabalho desses indivíduos que dificulta saídas frequentes para ingestão de água e uso do banheiro, o que não ocorre em geral com trabalhadores de

escritório e da administração (grupo controle) que possuem mais facilidade para em ingerir água durante o dia, uma vez, que a grande maioria, não necessita sair do ambiente de trabalho para conseguir se hidratar.

Notou-se também que entre essas amostras invalidadas do estudo, as que estavam com creatinina acima de 3,0 g/L (grupo exposto) eram amostras provenientes de homens e as que estavam abaixo de 0,3 g/L (grupo controle) eram amostras oriundas de mulheres, o que corresponde com dados da literatura, onde se observa que a produção de creatinina é maior nos homens do que nas mulheres (KIMMEL, LEW, BOSCH, 1996).

6.4 Característica da população de estudo

As características predominantes encontradas no grupo exposto se assemelham com as de outros estudos realizados com frentistas. Rocha (2014) realizou um estudo com 221 trabalhadores de PRCs, onde a maioria era do sexo masculino (90,5%), possuíam ensino médio completo (50,2%) – por ser uma profissão que não exige ensino superior – e exerciam a função por menos de 10 anos (81,4%), o que condiz com os achados neste estudo. Entretanto, em relação ao grupo controle, essas características foram diferentes, uma vez que a grande maioria dos participantes são mulheres e possuem ensino superior completo, tendo em vista que os cargos ocupados por estas pessoas necessitam de uma formação acadêmica. A disparidade entre a renda dos participantes dos dois grupos também foi grande, sendo a remuneração de profissionais das instituições públicas (grupo controle) maior do que os trabalhadores dos PRCs (grupo exposto), muito provavelmente relacionado ao nível de escolaridade exigido e o cargo exercido.

Sempre que o possível, o grupo controle (não exposto ocupacionalmente) deve ser escolhido levando em consideração os critérios que correspondem ao grupo exposto (sexo, cor, renda, escolaridade, entre outros). Todavia, a discrepância encontrada entre as características dos grupos de estudo espelha a dificuldade em estabelecer e encontrar um grupo de comparação (grupo controle) onde a principal variável distinta fosse apenas à exposição ao benzeno. Tal dificuldade é encontrada em vários trabalhos publicados na literatura, como por exemplo, um estudo realizado com frentistas de PRCs do Rio de Janeiro (grupo exposto) e trabalhadores de portarias do Campus da Fiocruz no Rio de Janeiro (grupo

controle), que, na tentativa de equiparar as características da população, a variável exposição ao benzeno foi influenciada, resultando em níveis urinários de AttM (biomarcador de exposição do benzeno) iguais entre os grupos de estudo, não apresentando diferença significativa entre eles (COSTA-AMARAL, 2017). Isso porque, o Campus da Friocruz do Rio de Janeiro é localizado na Área de Planejamento 3.1 (AP3.1), na margem de uma importante avenida do município (Avenida Brasil), por onde milhares de veículos circulam diariamente, promovendo uma exposição dos trabalhadores das portarias desta instituição a concentrações mais elevadas de benzeno.

6.5 Análises do ácido trans, trans-mucônico

A fim de avaliar o nível de exposição ao benzeno de trabalhadores de postos de revenda de combustíveis (grupo exposto), quantificou-se a eliminação urinária do biomarcador de exposição a este solvente, o ácido trans, trans-mucônico. O resultado do valor médio dos níveis de AttM urinário do grupo exposto foi superior (cerca de duas vezes maior) ao valor sugerido como limite biológico de exposição aceitável (0,5 mg/g creatinina) pela Portaria 34 do Ministério do Trabalho e do Emprego (MTE, 2001), indicando uma exposição excessiva destes trabalhadores e consequentemente maior susceptibilidade a danos à saúde provocados por esta substância. Este achado condiz com o estudo realizado por Campos (2017) com 31 frentistas e analistas de combustíveis de Belo Horizonte, onde o valor médio de AttM encontrado foi de $1,13 \pm 0,45$ mg/g creatinina.

Subdividindo o grupo exposto em grupos referentes à localidade dos PRCs, notou-se uma discrepância nos valores médios do Centro e da Zona Sul (com diferença significativa), sendo o último com maior média. A coleta das amostras foi realizada em épocas diferentes, fevereiro (Zona Sul) e abril (Centro), e em turnos variados (tarde ou noite) onde cada localidade apresenta temperaturas médias locais e ventos distintos, podendo influenciar diretamente a volatilidade do solvente. Em média, as temperaturas no Rio de Janeiro no mês de fevereiro variam em torno de 40°C (verão) e a de abril 25°C (primavera), o que converge com dados encontrados na literatura. De acordo com Shui-Ping e colaboradores (2017) as concentrações de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos variaram de acordo com estação do ano, sendo maiores os níveis no verão (altas temperaturas) do que na primavera (temperaturas

mais amenas), justificando os maiores níveis de AttM nos trabalhadores dos PRCs da Zona Sul.

Outros estudos, entretanto, discordam do que foi visto anteriormente. Isso porque, dependendo da estação do ano (primavera, verão, outono inverno) ocorre a adição de diferentes misturas de hidrocarbonetos à gasolina (FUREY, NAGEL, 1986; RUNION, 1975; TIRONI, NEBEL, WILLIAMS, 1986;). Essas mudanças sazonais nas gasolinas são necessárias para manter a volatilidade adequada para as demandas de combustão interna dos motores a diferentes temperaturas ambientais, ou seja, em temperaturas mais baixas a gasolina é enriquecida com hidrocarbonetos de baixo ponto de ebulição, o que permite o aumento da volatilidade do combustível (TIRONI, HODGKINS, 2011).

Por se tratar de um estudo em toxicologia, é comum realizar a comparação do grupo exposto com um grupo não exposto a substância, a fim de avaliar o grau de intoxicação dos indivíduos e estabelecer níveis basais de exposição não ocupacional ao benzeno. Por este motivo, em relação ao nível médio de AttM urinário do grupo controle, o valor encontrado estava abaixo do limite biológico (0,5 mg/g creatinina), indicando uma baixa exposição ao benzeno, o que não exclui tal população aos riscos que esta substância provoca, uma vez que não existe limite seguro de exposição a substâncias carcinogênicas (MTE, 1978; WALLACE, 1996). Tais valores foram inferiores aos dos encontrados no mesmo estudo de Campos (2017), onde o grupo de comparação foi composto por 22 trabalhadores do setor de administração pública e o valor médio de AttM urinário obtido foi de $0,44 \pm 0,33$ mg/g creatinina, justificado pelos fatores de confundimento que este biomarcador está susceptível, como o tabagismo e dieta contendo ácido sórbico.

6.6 Análises do ácido s-fenilmercaptúrico

Com o propósito de avaliar o nível de exposição ao benzeno de trabalhadores de postos de revenda de combustíveis (grupo exposto) e determinar qual o melhor biomarcador de exposição, quantificou-se a eliminação urinária de outro biomarcador de exposição a este solvente, o ácido s-fenilmercaptúrico. Entretanto, quando se trata desse metabólito, os estudos são escassos principalmente em relação a biomonitorização de trabalhadores de PRCs. Neste estudo, o valor médio dos níveis de AFM urinário do grupo exposto foi inferior ao limite biológico de exposição (25 µg/g creatinina) recomendado pela ACGIH (ACGIH, 2014), o que

não isenta os riscos pelos quais estes indivíduos estão expostos diariamente, por se tratar de uma substância carcinogênica para humanos. Contudo, esse limite biológico de exposição estabelecido pela ACGIH reflete a realidade de exposições nos Estados Unidos, onde a ocupação de frentista é inexistente e as bombas de autosserviço são operadas pelo próprio consumidor, cenário distinto do que acontece no Brasil. Por este motivo, é de suma importância o desenvolvimento de estudos sobre o tema para o estabelecimento de um valor basal que reflita a realidade dos trabalhadores brasileiros.

Comparando os níveis de AFM urinário desses frentistas brasileiros do estudo com os de trabalhadores de postos de combustíveis de outros países, nota-se que indivíduos que ocupam a profissão de frentista no Brasil estão expostos a níveis muito mais elevados do que de outras regiões. Isso é confirmado com o estudo realizado com 102 trabalhadores de PRCs da Itália, onde o valor médio de AFM urinário foi igual a $0,98 \pm 2,33 \mu\text{g/g}$ (PALMA *et al.*, 2012), cerca de 18 vezes menor do que os níveis médios encontrados neste estudo

Observa-se que o limite biológico de AFM ($25 \mu\text{g/g}$ creatinina) estabelecido pela ACGIH transmite um valor muito alto através do valor médio do grupo não exposto ocupacionalmente ao benzeno que é cerca de 20 vezes menor do que tal limite, ou seja, os valores de AFM encontrado na população exposta reflete uma alta exposição, quando comparado ao grupo controle.

Subdividindo o grupo exposto em grupos referentes à localidade dos PRCs, notou-se uma discrepância nos valores médios do Centro e da Zona Sul (com diferença significativa), sendo o último com maior média, concordando com os resultados encontrados na avaliação do AttM. A justificativa para essa diferença pode ser embasada na mesma teoria apresentada no tópico 6.5 em relação ao clima, hidrocarbonetos sazonais, temperatura e vento local que difere entre as duas localidades, uma vez que o benzeno é um hidrocarboneto de baixo peso molecular ($78,11 \text{ g/mol}$) e que por este motivo tendem a permanecer na fase de vapor por mais tempo (CINCINELLI *et al.*, 2007; SPEZZANO, PICINI, CATALDI, 2009).

6.7 Correlação entre os biomarcadores AttM e AFM

Ao comparar os resultados de ambos os biomarcadores, notou-se uma maior frequência de trabalhadores com níveis de AttM acima do limite aceitável ($0,5 \text{ mg/g}$

creatinina) do que o AFM, com diferença significativa dos níveis de AttM entre o grupo controle e o grupo exposto, mas não dos níveis de AFM. O grupo controle apresentou um participante com nível de AttM superior ao limite e nenhuma alteração nos valores de AFM. Em teoria as frequências das análises dos dois biomarcadores deveriam ser equivalentes uma vez que ambos são os metabólitos do benzeno. Entretanto alguns fatores devem ser levados em consideração, como a alimentação. Uma grande variedade de alimentos industrializados contém ácido sórbico que ao ser metabolizado é eliminado na urina sob a forma de AttM. Entretanto, apenas cerca de 0,12 a 0,18% deste conservante é absorvido pelo organismo e excretado na urina como AttM, quantidade suficiente para produzir um fator de confusão na determinação de exposição de indivíduos ao benzeno (BARATA-SILVA *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2017).

Já é bem descrito na literatura que o hábito de fumar também aumenta os níveis de excreção de AttM na urina. Wiwanitkit, Suwansaksri e Soogarun (2005) demonstraram que em indivíduos fumantes o AttM urinário é cerca de 9 vezes maior (2,19 mg/g creatinina) do que indivíduos não fumantes (0,24 mg/g creatinina). Estudos mais recentes demonstraram que a excreção de AFM na urina também é maior em indivíduos fumantes quando comparados aos não fumantes e que essa influência exercida pelo cigarro não depende apenas do número de cigarros consumidos por dia, mas também o espaço de tempo compreendido entre o último cigarro usado e a coleta da amostra de urina (LOVREGLIO *et al.*, 2010; LOVREGLIO *et al.* 2013; TUAKUILA, 2013).

Os níveis de AttM e AFM dos participantes podem estar subestimados uma vez que o metabolismo do benzeno é reduzido quando o indivíduo é exposto concomitantemente ao tolueno, tendo em vista que esse solvente é um inibidor competitivo da biotransformação do benzeno e portanto reduz a excreção dos seus metabólitos (ANDREWS *et al.*, 1977). Além disso, a biotransformação do benzeno também é influenciada pelos níveis deste solvente no ar. Kim e colaboradores (2006) demonstraram haver redução de 9 vezes na metabolização do benzeno quando a concentração deste no ar é superior a 1 ppm, devido à saturação de enzimas responsáveis pela biotransformação. Essas mesmas enzimas estão expressas de forma variada em cada indivíduo devido aos polimorfismos genéticos, influenciando também a metabolização do solvente. O mesmo estudo aponta fatores individuais como também influenciadores na biotransformação do benzeno, sendo maior no sexo feminino e em indivíduos mais jovens (KIM *et al.*, 2006).

Embora o n amostral do estudo seja reduzido, os elevados níveis de AttM e AFM encontrados são preocupantes, principalmente em relação as condições pelas quais os trabalhadores expostos ocupacionalmente ao benzeno estão submetidos diariamente. A utilização de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs) minimiza as exposições excessivas dos trabalhadores à substâncias nocivas à saúde humana, mas não promove a segurança completa aos riscos provenientes da exposição aos solventes. De acordo com a Norma Regulamentadora 6 (NR-6), EPIs constituem equipamentos, produtos ou dispositivos de uso individual, que tem por objetivo proteger os trabalhadores dos riscos que possam estar presente no ambiente de trabalho (BRASIL, 1978), como luvas, óculos, avental, máscaras, protetor auricular e etc. No Brasil, esta norma estabelece a exigência da utilização desses equipamentos e que os mesmos devem ser obrigatoriamente fornecidos pelo empregador. Entretanto, a população geral também está sujeita aos riscos oriundos por tal exposição, tendo em vista que a grande maioria das pessoas estão expostas ambientalmente a esse solvente, principalmente quando residem ao entorno de PRC e indústrias, uma vez que a dispersão do benzeno ocorre devido a volatilização desta substância, a direção do vento e o local (CARRIERI *et al.*, 2006).

A correlação significativa entre os níveis de AttM e AFM mostra que a elevação de ambos é concomitante, ou seja, quando um aumenta o outro aumenta também. Os níveis de AttM, de acordo com os resultados, também pode ser influenciado por fatores ambientais, tendo em vista que o houve correlação significativa entre o AttM e a localidade dos postos. O mesmo não ocorreu com os níveis de AFM, possivelmente pelo n amostral reduzido, sendo necessário aumentar o grupo de estudo e pela maior especificidade do biomarcador de exposição.

6.8 Limitações

Este estudo apresenta algumas limitações. Em primeiro lugar, o tamanho da amostra foi reduzido sendo um fator limitante das correlações estatísticas e por este motivo deve-se ampliar o número de indivíduos participantes da pesquisa. Fatores como a ingestão de ácido sórbico e o hábito de fumar não foram avaliados neste estudo, assim como os fatores individuais e os polimorfismos genéticos que alteram a excreção de AttM e AFM na urina.

O monitoramento ambiental não foi avaliado e por este motivo não se pode determinar a concentração de benzeno no ar. Entretanto, já é bem descrito na literatura que trabalhadores de PRCs estão expostos à altíssimas concentrações de benzeno no ambiente de trabalho. Costa (2001) evidenciou que trabalhadores, durante o abastecimento de gasolina, estavam expostos a concentrações de benzeno no ar que variavam de 40 a 700 ppb.

6. CONCLUSÃO

A metodologia analítica desenvolvida neste estudo para a determinação de AttM e AFM na urina utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência foi implementada e validada em fase móvel e matriz biológica (urina), demonstrando que o método pode ser implementado nas ações em relação de vigilância da saúde de trabalhadores expostos ao benzeno com um baixo custo quando comparado as outras metodologias de alto custo.

O grupo exposto ocupacionalmente ao benzeno apresentou maiores níveis urinários do AttM e do AFM do que o grupo controle, indicando que estes indivíduos de trabalhadores de PRC estão expostos a concentrações elevadas deste solvente no ambiente de trabalho. Ao subdividir o grupo exposto em postos localizados na Zona Sul e no Centro, notou-se que o primeiro apresentou níveis urinários mais elevados dos biomarcadores, apontando uma possível correlação entre a concentração de benzeno no ar e fatores ambientais característicos no dia da coleta da amostra, como a temperatura e vento local.

Uma correlação foi encontrada entre ambos os biomarcadores do benzeno, AttM e AFM, sendo o primeiro provavelmente mais susceptível a interferências individuais e ambientais devido a uma maior frequência de indivíduos com níveis de AttM urinário acima do limite biológico aceitável quando comparados ao AFM. Os níveis de AttM também tiveram correlação estatisticamente significativa em relação a localidade dos postos, sendo necessário mais estudos para avaliar possíveis interferentes ambientais na excreção desse metabólito.

Os resultados obtidos dos níveis urinários de AFM corroboram com a aplicabilidade deste indicador biológico para biomonitorização da exposição ao benzeno, sendo necessário conhecer os níveis biológicos na população não exposta e exposta ocupacionalmente ao benzeno, a fim de estabelecer limites biológicos que retratam a realidade brasileira, para que medidas de prevenção de uma exposição excessiva sejam adotados, buscando minimizar riscos e danos à saúde.

7. REFERÊNCIAS

Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP). Anuário estatístico brasileiro do petróleo, gás natural e biocombustíveis. Rio de Janeiro, 2018. Disponível em: <http://www.anp.gov.br/images/publicacoes/anuario-estatistico/2018/anuario_2018.pdf>

Acesso em: 01 fev. 2019.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY (ATSDR). Toxicological profile for benzene. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Centers for Disease Control**, 2007. Disponível em: <<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp3.pdf>> Acesso em: 09 jan. 2019.

American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). TLVs and BEIs: Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices. Cincinnati, Ohio, p. 254, 2014.

American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH). Threshold limit values and biological exposure indices for 1999-2000. Cincinnati, 1999.

ANDREWS, S. L. *et al.* Effects of toluene on the metabolism, disposition and hemopoietic toxicity of [3H] benzene. **Biochemical Pharmacology**, v. 26, n. 4, p. 293-300, 1977.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2721567/RDC_166_2017_COMP.pdf/d5fb92b3-6c6b-4130-8670-4e3263763401> Acesso em: 29 abr. 2019.

ARAUJO, P. Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. **Journal Chromatography B**, v. 877, n. 23, p. 2224-2234, 2009.

BARATA-SILVA, C. *et al.* Benzeno: reflexos sobre a saúde pública, presença ambiental e indicadores biológicos utilizados para a determinação da exposição. **Cad. saúde colet.**, v. 22, n. 4, p. 329-342, 2014.

BOOGAARD, P. J.; VAN SITTERT, N. J. Biological monitoring of exposure to benzene: a comparison between S-phenylmercapturic acid, trans,trans-muconic acid, and phenol. **Occup. Environ. Med.**, n. 52, v. 9, p. 611-620, 1995.

BRASIL. Decreto nº 8.948 de 29 de dezembro de 2016. Regulamenta a Lei nº 13.152, de 29 de julho de 2015, que dispõe sobre o valor do salário mínimo e a sua política de valorização de longo prazo. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2015-2018/2016/decreto/D8948.htm>. Acesso em: 09 jul. 2019.

BRASIL. Lei Federal Nº 9.956, de 12 de janeiro de 2000b. Proíbe o funcionamento de bombas de auto-serviço nos postos de abastecimento de combustíveis e dá outras providências. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L9956.htm> Acesso em: 04 fev. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria SAS nº 776, de 28 de abril de 2004. Dispõe sobre a regulamentação dos procedimentos relativos à vigilância da saúde dos trabalhadores expostos ao benzeno. Diário Oficial da União 28 abr 2004; Seção 1.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Resolução CONAMA nº 273, de 29 de novembro de 2000a. Estabelece diretrizes para o licenciamento ambiental de postos de combustíveis e serviços e dispõe sobre a prevenção e controle da poluição. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=271>> Acesso em: 01 fev. 2019.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. Acordo e legislação sobre o benzeno. São Paulo: Fundacentro; 1995.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. Portaria nº 10, de 8 de Setembro de 1994. Diário Oficial da União 1994; 12 set. 45.

BRASIL. Normal Regulamentadora Nº 6, de 08 de Junho de 1978. Dispõe sobre o Equipamento de Proteção Individual – EPI. Disponível em: <<http://portal.mte.gov.br/data/files/8A7C812D36A2800001388130953C1EFB/NR-06%20%28atualizada%29%202011.pdf>> Acesso em: 13 jun. 2019.

BRASIL. Portaria ANP nº 40, de 25 de outubro de 2013. Agência Nacional do Petróleo. Estabelece as especificações para a comercialização de gasolinas automotivas em todo o território nacional e obrigações dos agentes econômicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF.

BURATTI, M. *et al.* Determination of monobromobimane derivatives of phenylmercapturic and benzylmercapturic acids in urine by high- performance liquid chromatography and fluorimetry. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 751, n. 2, p. 305-313, 2001.

CAMÂMARA MUNICIPAL DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO. Decreto nº 5280, de 23 de agosto de 1985. Disponível em: <<http://www2.rio.rj.gov.br/smu/buscafacil/Arquivos/PDF/D5280M.PDF>> Acesso em 09 abr. 2019.

CARRIERI, M. *et al.* Comparison of Exposure Assessment Methods in Occupational Exposure to Benzene in Gasolina filling-station Attendants. **Toxicol. Letters**, v.162, p.146-152, 2006.

CASSIANO, N. M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas Chromatographic methods validation for analysis of small molecules in biological matrices. **Química Nova**, v.32, n. 4, p. 1021, 2009.

CASSITO, M. G. *et al.* **Studio italiano di un progetto di indagine multicêntrica su popolazioni esposte a miscele di solventi organici delle vernici.** Milano: Institute di Medicine del Lavoro-Università degli Studi di Milano, 1989.

CINCINELLI, A. *et al.* Gas-particle Concentration and Distribution of n-alkanes and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Atmosphere of Prato (Italy). **Chemosphere**, v. 68, p. 472-478, 2007.

COLLINS, C. H. **Princípios básicos de cromatografia. Introdução a métodos cromatográficos.** Campinas: Editora da UNICAMP, 1997.

COMISSÃO EUROPEIA. Council Directive 97/42/EC of 27 June 1997 amending for the first time Directive 90/394/EEC on protecting workers from risks related to exposure to carcinogens at work [Sixth Individual Directive according to Art. 16(1) of Directive

89/391/EEC]. Official Journal of the European Communities No. L179, 08.07.1997. Brussels, Belgium: European Commission; 1997.

CORREA, S. M. *et al.* O impacto das emissões de BTEX dos postos de gasolina na atmosfera. **Pesquisa de poluição atmosférica**, v. 3, p. 163-169, 2012.

COSTA, M. A. F.; COSTA, M. F. B. Benzeno: uma questão de saúde pública. **Interciência**, v. 27, p. 201-204, 2002.

COSTA, M. F. B. Estudo da aplicabilidade do ácido trans, trans-mucônico urinário como indicador biológico de exposição ao benzeno [tese]. Rio de Janeiro: Fiocruz; 2001.

COSTA-AMARAL, I. C. Estudo da exposição ocupacional e ambiental ao benzeno em baixas concentrações sob a perspectiva dos efeitos genotóxicos, 2017. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/27954/2/isabele_campos.pdf> Acesso em: 10 jun. 2019.

Departamento de trânsito do Estado do Rio de Janeiro (DETRAN). Estatísticas: frota por combustível, janeiro de 2019, todos os municípios. Rio de Janeiro, 2019. Disponível em: <http://www.detran.rj.gov.br/_estatisticas.veiculos/07.asp> Acesso em: 04 fev. 2019.

DUCOS, P. *et al.* Improvement in HPLC analysis of urinary trans,trans-muconic acid, a promising substitute for phenol in the assessment of benzene exposure. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, v. 62, n. 7, p. 529-534, 1990.

EINIG, T.; DEHNEN, W. Sensitive determination of the benzene metabolite S-phenylmercapturic acid in urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 697, n. 1, p. 371-375, 1995.

EURACHEM. The Fitness for Purpose of Analytical Methods - A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics. 2 ed. 2014. ISBN 978-91-87461-59-0. Disponível em: <https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_EN.pdf> Acesso em: 30 abr. 2019.

FUNDACENTRO. **Efeitos da Exposição ao Benzeno para a Saúde**. Série Benzeno, n. 1. São Paulo, 2012.

FUREY, R. L.; NAGEL, B. E. Composition of Vapor Emitted from a Vehicle Gasoline Tank during Refueling. **SAE Technical Paper Series, 860086**. Society of Automotive Engineers, Warrendale, PA, 1986.

Global Cancer Observatory (GLOBOCAN). World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Cancer tomorrow, 2018. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/>> Acesso em 25 jan. 2019.

GROTZ, V. L. *et al.* Metabolism of benzene and trans, trans-muconaldehyde in the isolated perfused rat liver. **Toxicology Letters**, v. 70, n.3, p. 281-290, 1994.

HYMER, C. B. Validation of an HPLC-MS-MS method for the determination of urinary S-benzylmercapturic acid and s-phenylmercapturic acid. **Journal of Chromatographic Science**, v. 49, n. 7, p. 547-553, 2011.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA QUALIDADE E TECNOLOGIA – INMETRO DOQ-CGCRE-008.Orientação sobre validação de métodos analíticos. Jul., 2011. Disponível em: <http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/Cgcre/DOQ/DOQ-Cgcre-8_04.pdf> Acesso em: 29 abr. 2019.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Chemical agents and related occupations: A review of human carcinogens, v. 100F, 2012. Disponível em: <<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100F/mono100F.pdf>> Acesso em 23 jan. 2019.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Some industrial chemicals and dyestuffs, v. 29, 1982. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/wp-content/uploads/2018/06/mono29.pdf>> Acesso em: 11 jan. 2019.

International Agency for Research on Cancer (IARC). Identification of Carcinogenic Hazards to Humans: Agents classified by the IARC Monographs, v. 1-123, 2018. Disponível em: <<https://monographs.iarc.fr/agents-classified-by-the-iarc/>> Acesso em 23 jan. 2019.

JAFFÉ, M. über den Niederschlag, welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins. **Z. Phys. Chem.**, v. 10, p. 391–400, 1886.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para a preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13-25, 2010.

KAMPEERAWIPAKORN *et al.* Health Risk Evaluation in a Population Exposed to Chemical Releases From a Petrochemical Complex in Thailand. *Environ Res*152, 207-213., 2016.

KIM S. *et al.* Modeling human metabolism of benzene following occupational and environmental exposures. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**, v. 15, n. 11, p. 2246, 2006.

KIM, S. *et al.* Genetic polymorphisms and benzene metabolism in humans exposed to a wide range of air concentrations. **Pharmacogenet Genomics**, v. 17, n. 10, p. 789-801, 2007.

KIMMEL P. L.; LEW S. Q.; BOSCH P. Nutrition, ageing and GFR: is age-associated decline inevitable? **Nephrol Dial transplant**, v. 11, n. 9, p. 85-88, 1996.

LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. São Carlos: RiMa, 2004.

LOVREGLIO, P. *et al.* Il monitoraggio dell'esposizione occupazionale ed ambientale a basse dosi di benzene. **Giornale Italiano di Medicina del Lavoro ed Ergonomia**, v. 35, n. 4, p. 251-255, 2013.

LOVREGLIO, PIERO *et al.* Il monitoraggio dell'esposizione occupazionale ed ambientale a basse dosi di benzene. **Giornale Italiano di Medicina del Lavoro ed Ergonomia**, v. 35, n. 4, p. 251-255, 2013.

MAESTRI, L. *et al.* Effects of sorbic acid ingestion on urinary excretion of trans, trans-muconic acid in human volunteers and in rats exposed to low concentrations of benzene. **Toxicol. Lett.**, v. 88, n. 1, 1996.

MARRUBINI, G. *et al.* Effect of sorbic acid administration on urinary trans, trans- muconic acid excretion in rats exposed to low levels of benzene. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 12, p. 1799-1806, 2002.

MENDES, M. P. R.; SILVEIRA, J. N.; ANDRE, L. C. An efficient analytical method for determination of S-phenylmercapturic acid in urine by HPLC fluorimetric detector to assessing benzene exposure. **Journal of Chromatography B**, v. 1063, p. 136-140, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). 2º Inventário de Saúde do Trabalhador, 2010-2011: Acompanhamento da Rede Nacional de Atenção Integral em Saúde do Trabalhador, 2010-2011, 2013.

Ministério do Trabalho de do Emprego (MTE). Portaria 3.214 de jul. 2001. Normas regulamentadoras de segurança e saúde no trabalho (NR-15): atividades e operações insalubres. Brasília, 2001. Disponível em: <<http://www.mte.gov.br/temas/segsau/legislacao/normas/conteudo/nr15>>. Acesso em: 05 fev. 2019.

O'NEIL, M. J. *et al.* **The Merck Index: An Enciclopedy of Chemicals, Drugs and Biologicals**. 14ª ed. White house station: Merck & Co, 2006.

OPAS Brasil. Determinantes Sociais e Riscos para a Saúde, Doenças Crônicas não transmissíveis e Saúde Mental: Folha informativa – Câncer, 2018. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5588:folha-informativa-cancer&Itemid=839> Acesso em 25 jan. 2019.

PACI, E. *et al.* Determination of free and total S- phenylmercapturic acid by HPLC/ MS/ MS in the biological monitoring of benzene exposure. **Biomarkers: biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals**, v. 12, n. 2, p. 111, 2007.

PALMA *et al.* Biomarkers of exposure to aromatic hydrocarbons and methyl tert-butyl ether in petrol station workers. **Biomarkers**, v. 17, n. 4, p. 343-351, 2012.

PALMA G., MANNO M. Metabolic polymorphisms and biomarkers of effect in the biomonitoring of occupational exposure to low-levels of benzene: state of the art. **Toxicol Lett.**, v. 231, n. 2, p. 194-204, 2014.

PANEV, T. *et al.* Assessment of the correlation between exposure to benzene and urinary excretion of t, t-muconic acid in workers from a petrochemical plant. **Int Arch Occup Environ Health**, v. 75, p. 97-100, 2002.

PAULA, F. C. S.; SILVEIRA, J. N.; ALVAREZ-LEITE, E. M. Validação do método de Ducos modificado para a determinação do ácido trans,trans-mucônico urinário. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 39, n. 1, p. 63-69, 2003.

PEZZAGNO, G. Monitoraggio biológico dele popolazioni espote a benzene. In: MINOIA, C.; APOSTOLI, B.; BARTOLUCCI, G. B. (Ed.). **II benzene: tossicologia ambienti di vita e di lavoro**. Milano: Morgan, p. 125-145, 1995.

PEZZAGNO, G.; MAESTRI, L.; FIORENTINO, M. L. Trans, trans- muconic acid, a biological indicator to low levels of environmental benzene: Some aspects of its specificity. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 35, n. 5, p. 511-518, 1999.

RINSKY, R. A. *et al.* Benzene and leukemia. An epidemiologic risk assessment. **New England Journal of Medicine**, v. 316, n. 17, p. 1044-1050, 1987.

RINSKY, R. A.; YOUNG, R. J; SMITH, A.B. Leukemia in benzene workers. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 2, n. 3, p. 217-245, 1981.

ROCHA, L. P. *et al.* Utilização de equipamentos de proteção individual por frentistas de postos de combustíveis: contribuição da enfermagem. **Texto contexto - enferm.**, v. 23, n. 1, p. 193-202, 2014.

RUNION, H. E. **Benzene in Gasoline**. Am. Ind. Hyg. Assoc. J., p. 336-338, 1975.

RUPPERT, T. *et al.* Trans,trans-muconic acid as a biomarker of non-occupational environmental exposure to benzene. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, v. 69, n. 4, p. 247-251, 1997.

SANTOS, M. V. C. *et al.* Aspectos toxicológicos do benzeno, biomarcadores de exposição e conflitos de interesses. **Rev. bras. saúde ocup.**, v. 42, n.1, 2017.

SCHERER, G.; RENNER, T.; MEGER, N. Analysis and evaluation of trans-trans-muconic acid as a biomarker for benzene exposure. **J Chromatogr. B**, v. 717, p. 179-199, 1998.

SHUI-PING W. *et al.* Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Atmosphere of Two Subtropical Cities in Southeast China: Seasonal Variation and Gas/Particle Partitioning. **Aerosol and Air Quality Research**, v. 14, p. 1232-1246, 2014.

SMOLDERS R.; SHRAMM K. W.; NICKMILDER M.; SCHOETERS G. Applicability of non-invasive collected matrices for human biomonitoring. **Environ Health**, v. 8, p. 1-8, 2009.

SNYDER, R.; HEDLI, C. C. An overview of benzene metabolism. **Environ. Health Perspect**, v. 104, n. 6, p. 1165-1171, 1996.

SPEZZANO, P.; PICINI, P.; CATALDI, D. Gas- and Particle-phase Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Two-stroke, 50-cm³ Moped Emissions. **Atmos. Environ.**, v. 43, p. 539-545, 2009.

STERZ, KATHARINA *et al.* Enrichment and properties of urinary pre- S-phenylmercapturic acid (pre-SPMA). **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 27, p. 2502-2505, 2010.

TIRONI, G.; NEBEL, G. T.; WILLIAMS, R. L. Measurement of Vapor Exposure during Gasoline Refueling. **SAE Technical Paper Series, Society of Automotive Engineers, Warrendale, PA**, 1986.

TIRONI, G; HODGKINS, D. G. Compliance with the OSHA Benzene Permissible Exposure Limit (PEL) at the Gasoline Vapor PEL. **Applied Occupational and Environmental Hygiene**, p. 881-884, 2011.

TUAKUILA, J. S- phenylmercapturic acid (S- PMA) levels in urine as an indicator of exposure to benzene in the Kinshasa population. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 216, n. 4, p. 494-498, 2013.

VAN SITTEERT, N. J.; GOOGAARD, P. J.; BEULINK, G. D. Application of the urinary S-phenylmercapturic acid test as a biomarker for low levels of exposure to benzene in industry. **Br. J. Ind. Med**, v. 50, n. 5, p. 460-469, 1993.

WALLACE, L. Environmental exposure to benzene: an update. **Environ Health Perspect**, v. 104, n. 6, p. 1129-1136, 1996.

WANG, ZHONGHUA *et al.* A rapid and sensitive liquid chromatography- tandem mass spectrometry method for the quantitation of S- phenylmercapturic acid in human urine. **Analytical Methods**, v. 5, n. 21, p. 6081-6085, 2013.

WIWANITKIT, V.; SUWANSAKSRI, J.; SOOGARUN, S. Monitoring of urine trans, trans-muconic level among smokers and non-smokers. **Respir. Med.**, v. 99, p. 788-791, 2005.

World Health Organization (WHO). Air Quality Guidelines for Europe. **WHO Regional Publications**, v. 2, n. 91, p. 62-66, 2000.

World Health Organization (WHO). Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace. v. 1-2, Geneva; 1996.

ANEXO 1

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA
SILVA (INCA)
COORDENAÇÃO GERAL DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA
UNIDADE TÉCNICA DE EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL, AMBIENTAL
E CÂNCER



CARTA DE APRESENTAÇÃO AO RESPONSÁVEL DO POSTO DE COMBUSTÍVEL

TÍTULO: "MONITORAMENTO BIOLÓGICO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS
MUTAGÊNICOS E IMUNOTÓXICOS DO BENZENO NA SAÚDE DOS
TRABALHADORES DOS POSTOS DE COMBUSTÍVEIS DO RIO DE JANEIRO"

Prezado Sr,

O Posto de Combustível que o senhor é responsável (gerente ou proprietário) foi selecionado para fazer parte de um projeto que busca identificar os efeitos à saúde de trabalhadores expostos a combustíveis. Este projeto não fiscalizará seu estabelecimento e as informações coletadas serão mantidas em sigilo.

O objetivo desse projeto é caracterizar os riscos relacionados à exposição ocupacional ao benzeno entre trabalhadores de postos de combustíveis do município do Rio de Janeiro.

No entanto, para que você possa decidir se o Posto que é responsável (gerente ou proprietário) participará ou não deste estudo, precisa conhecer um pouco mais sobre este projeto.

OBJETIVOS DO ESTUDO

O objetivo do presente projeto é caracterizar os riscos relacionados à exposição ocupacional ao benzeno entre trabalhadores de postos de gasolina do município do Rio de Janeiro.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Em relação aos trabalhadores e rotina do Posto de Combustível

Uma vez que o senhor concorde que o Posto de Combustível pelo qual é responsável participe desse estudo é importante saber que:

- Haverá necessidade que os funcionários realizem entrevista, exame clínico, coleta de sangue e urina.
- Será organizada, juntamente com o responsável pelo Posto de Combustível, uma agenda para que haja revezamento dos trabalhadores de forma que não atrapalhe as atividades do posto

Com relação aos exames laboratoriais:

Serão feitas coletas de sangue e urina destinadas a realização de:

- Hemograma completo e bioquímica
- Análise genética e Imunofenotipagem
- Avaliação dos indicadores de exposição na urina através da análise dos níveis de ácido trans-trans-mucônico.

Com relação aos exames clínicos:

Esses exames só serão realizados com o aceite do funcionário constante no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido devidamente assinado.

O exame clínico será realizado por um profissional de saúde capacitado que aplicará um questionário com perguntas sobre histórico de saúde, estilo de vida e histórico de saúde familiar.

CUSTOS

A participação nesse estudo será voluntária e não haverá qualquer forma de pagamento ao voluntário pela sua participação.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que saiba que você pode se recusar a participar desse estudo sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos você a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para a Dra Ubirani Barros Otero ou para a Dra Marcia Sarpa de Campos Mello da Unidade Técnica de Exposição Ocupacional, Ambiental e Câncer, Coordenação Geral de Prevenção e Vigilância do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/MS, nos telefones (21) 3207-5967 ou 3207-5969 e/ou para a Dra Katia Poça do Departamento de Farmacologia e Toxicologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, nos telefones (21) 3865-5157 ou 3865-5235. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo, também pode contar com o Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa Dr. Carlos Henrique Debenedito Silva - Rua do Resende, nº128 no telefone (021) 3207-4450 ou 3207-4556.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como a necessidade de liberação de funcionários para as entrevistas e exames clínicos/laboratoriais. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, como representante do Posto de Combustível _____, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Entendo que não receberei compensação monetária por minha participação neste estudo.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

_____/_____/_____
(Assinatura do Participante) dia mês ano

(Nome do Participante – letra de forma)

_____/_____/_____
(Assinatura de Testemunha, se necessário) dia mês ano

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao responsável pelo Posto de Combustível indicado acima.

_____/_____/_____
(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento) dia mês ano

ANEXO 2



A(o): Ubirani Barros Otero
Pesquisador(a) Principal



Rio de Janeiro, 23 de julho de 2014.

Registro CEP nº 121/09 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)
Título do Estudo: Projeto Piloto para o desenvolvimento de metodologia para avaliar os efeitos da exposição a BTX na saúde de trabalhadores de postos de combustíveis

Prezado(a) Pesquisador(a),

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer **analisou e aprovou o Adendo datado de 14/5/14**, relacionado ao estudo acima, em sua reunião de 14 de julho de 2014.

Atenciosamente,



Dr. Carlos Henrique D. Silva
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

ANEXO 3

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA
(INCA)
COORDENAÇÃO GERAL DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA
UNIDADE TÉCNICA DE EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL, AMBIENTAL
E CÂNCER



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DOS TRABALHADORES DE POSTOS DE COMBUSTÍVEIS

PROJETO DE PESQUISA: "MONITORAMENTO BIOLÓGICO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MUTAGÊNICOS E IMUNOTÓXICOS DO BENZENO NA SAÚDE DOS TRABALHADORES DOS POSTOS DE COMBUSTÍVEIS DO RIO DE JANEIRO"

Nome do Voluntário:

Você está sendo convidado a participar de um projeto que busca identificar os efeitos da exposição ao benzeno em trabalhadores de postos de combustíveis. O Projeto visa implementar medidas de prevenção de doenças relacionadas a exposição ocupacional a substâncias químicas. No entanto, para que você possa decidir se quer participar ou não deste estudo, precisa conhecer seus benefícios, riscos e implicações.

OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo do presente projeto é caracterizar os riscos relacionados à exposição ocupacional ao benzeno entre trabalhadores de postos de combustíveis do município do Rio de Janeiro.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

O sr(a) foi escolhido(a) para participar deste projeto por trabalhar em uma atividade que o exponha a produtos derivados da gasolina. Se o(a) sr(a) concordar em participar deste estudo serão aplicados 2 questionários por entrevistadores treinados. As perguntas abrangem suas condições sócio-demográficas e seu histórico de saúde.

Se o senhor concordar em participar do estudo, responderá a algumas perguntas; fará exame clínico e doará em torno de 10ml de sangue e 5ml urina para realização das seguintes análises:

- Hemograma completo e bioquímica
- Análise genética e Imunofenotipagem
- Avaliação dos indicadores de exposição na urina através da análise dos níveis de ácido trans-trans-mucônico.

Essas análises são importantes, pois permitirão avaliar os níveis de exposição ao benzeno e os efeitos das substâncias presentes nos combustíveis sobre as suas células e a sua saúde.

TODOS OS RESULTADOS SERÃO MANTIDOS EM SIGILO E DEVOLVIDOS APENAS A VOCÊ.

O exame clínico será realizado por um profissional de saúde capacitado que aplicará um questionário com perguntas sobre seu histórico de saúde, estilo de vida e seu histórico de saúde familiar.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Não haverá outro método alternativo de coleta de informações.

RISCOS

Você não estará correndo nenhum risco por participar deste estudo. O responsável pelo posto de combustível também assinou um termo de consentimento que autoriza esse Projeto e vai facilitar sua participação no horário de trabalho. Cabe destacar que **apenas você** vai receber os resultados dos exames clínicos e laboratoriais.

BENEFÍCIOS

Estudo semelhante a esse está ocorrendo em todo o país e sua proposta é avaliar as condições de saúde dos funcionários dos postos de combustíveis. O acompanhamento será individual e caso necessário você será encaminhado para o serviço de saúde de referência .

Os resultados desse estudo serão úteis para que sejam adotadas medidas de redução e controle da exposição a agentes tóxicos presentes nos combustíveis em todo país.

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

Estão previstos 3 encontros.

No primeiro, os questionários sócio demográfico e clínico serão aplicados por entrevistadores, no segundo encontro serão coletadas as amostras de sangue e urina e no terceiro o resultado do seu exame será entregue.

Caso seja identificado algum problema, você será encaminhado(a) para atendimento em um serviço de saúde do SUS para melhor avaliação.

Os profissionais que atuam nesse projeto pertencem a Unidade Técnica de Exposição Ocupacional, Ambiental e Câncer, Coordenação Geral de Prevenção e Vigilância do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva - INCA / MS e ao Departamento de Farmacologia e Toxicologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Além da equipe da pesquisa, seus dados poderão ser consultados pelo Comitê de Ética do Hospital do Câncer I –INCA. No entanto, os seus dados individuais serão mantidos em sigilo e os resultados serão divulgados em forma de relatórios estatísticos.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

A sua participação neste estudo não implica em danos à sua saúde. No caso de detecção de problema de saúde, você será encaminhado (a) para atendimento no Sistema Único de Saúde no município do Rio de Janeiro.

CUSTOS

A participação neste estudo será voluntária e não haverá qualquer forma de pagamento ao voluntário pela sua participação.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

É importante que você saiba que pode se recusar a participar deste estudo sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Nós estimulamos você a fazer perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para a Dra Ubirani Barros Otero ou para a Dra Marcia Sarpa de Campos Mello da Unidade Técnica de Exposição Ocupacional, Ambiental e Câncer, Coordenação Geral de Prevenção e Vigilância do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva/MS, nos telefones (21) 3207-5967 ou 3207-5969 ou para a Dra Karen Friedrich do Departamento de Farmacologia e Toxicologia do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, nos telefones (21) 3865-5157 ou 3865-5235. Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo, também pode contar com o Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa Dr Carlos Henrique Debenedito Silva - Rua do Resende, nº128 no telefone (021) 3207-4450 ou 3207-4556.

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA

Li as informações acima e entendi o propósito deste estudo assim como os benefícios e riscos potenciais da participação no mesmo. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar neste estudo.

Entendo que não receberei compensação monetária por minha participação neste estudo.

Eu recebi uma cópia assinada deste formulário de consentimento.

_____/_____/_____
(Assinatura do Participante) dia mês ano

(Nome do Participante – letra de forma)

_____/_____/_____
(Assinatura de Testemunha, se necessário) dia mês ano

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes deste estudo ao voluntário indicado acima.

_____/_____/_____
(Assinatura da pessoa que obteve o consentimento) dia mês ano

ANEXO 4



INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA)
COORDENAÇÃO GERAL DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA
UNIDADE TÉCNICA DE EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL, AMBIENTAL E CÂNCER

PROJETO DE PESQUISA: "MONITORAMENTO BIOLÓGICO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MUTAGÊNICOS E IMUNOTÓXICOS DO BENZENO NA SAÚDE DOS TRABALHADORES DOS POSTOS DE COMBUSTÍVEIS DO RIO DE JANEIRO"

QUESTIONARIO INDIVIDUAL

Nome do Posto: _____	88- NA
<input type="checkbox"/>	
N° do posto __ __ 88- NA <input type="checkbox"/> N° Questionário __ __	
Entrevistador: _____	
Data da Entrevista: ____/____/____	

MODULO 1: CARACTERÍSTICAS SÓCIO DEMOGRÁFICAS

DADOS PESSOAIS	(1) Nome: __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __	
	__ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __	
	__ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __	
	__ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __ __	
	(2) Sexo: 0- <input type="checkbox"/> Masculino 1- <input type="checkbox"/> Feminino	(3) Data de Nascimento: __ __ __ __ __ __
	(4) Naturalidade (UF): __ __	
	9- <input type="checkbox"/> Ignorado 8- NA <input type="checkbox"/>	
	(5) Situação Familiar / Conjugal: 1- <input type="checkbox"/> Casado(a) ou vive em união; 2- <input type="checkbox"/> Separado(a), ou divorciado(a);	
	3- <input type="checkbox"/> Viúvo(a); 4- <input type="checkbox"/> Solteiro(a) (nunca casou ou viveu em união)	

MÓDULO 2: INFORMAÇÕES SOBRE EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL

(16) Qual sua situação atual no mercado de trabalho? (ENTREVISTADOR LEIA TODAS AS ALTERNATIVAS)

- 1- Empregado registrado CLT/ carteira assinada 5- Cooperativado 9- NS/NR
 2- Empregado não registrado / sem carteira assinada 6- Aposentado
 3- Autônomo / conta própria 7- Empregador
 4- Trabalho temporário 8- Outros:
 _____ 88- NA

(17) Você é sindicalizado? 1- Sim 0- Não 9- NS/NR

(17.1) Se sim, qual o sindicato?

_____ 88- NA

(18) Com que idade começou a trabalhar em postos de combustíveis? _____ anos

9- NS/NR 88- NA

(19) Antes de trabalhar neste posto de abastecimento, quais trabalhos que o sr (a) permaneceu por mais tempo? (Colocar os 3 últimos trabalhos)

ONDE (local / estabelecimento)? (CNAE)	O QUE FAZIA (nessa ocupação)? (CBO)	POR QUANTO TEMPO?	
		Nº.	Meses/

(20) Qual sua ocupação atual?

1- Frentista

2- Gerente / Encarregado de pista

3- Lubrificador

4- Lavador de carro

5- Loja de conveniência

6- Segurança

7- Escritório

8-

Outros: _____

88- NA

9- NS/NR

(21) Há quanto tempo o sr (a) trabalha nesta ocupação?

_____ 9-NS/NR

obs: trabalhar por tempo maior que 6 meses (critério de inclusão)

(22) Qual seu horário de trabalho predominante?

1- |__|__| às |__|__| 9-NS/NR

(23) O sr(a) tem folga? (SE TEM FOLGA APENAS SABADO E DOMINGO, PREENCHER 2X/SEMANA)

0- 1x /semana

1- 2x / semana

2- 3x ou mais por semana

3- Não

9- NS/NR

(23.1) Normalmente, qual é o dia da sua folga? _____

(24) Qual ou quais atividade(s) que o sr (a) desempenha nessa ocupação?

(CASO TRABALHADORES DE LOJAS DE CONVENIÊNCIA, SEGURANÇA, LIMPEZA E/OU ESCRITÓRIO, PULE PARA A QUESTÃO 38)

- A- Abastece 1- Sim 0- Não 9- NS/NR 88- NA
- B- Caixa 1- Sim 0- Não 9- NS/NR 88- NA
- C- Calibra pneus 1- Sim 0- Não 9- NS/NR 88- NA
- D- Lava carros /vidros 1- Sim 0- Não 9-
NS/NR 88- NA
- E- Verifica água 1- Sim 0- Não 9-
NS/NR 88- NA
- F- Verifica / troca óleo 1- Sim 0- Não 9-
NS/NR 88- NA
- G- Realiza leitura dos tanques dos subsolo do posto 1- Sim 0- Não 9-
NS/NR 88- NA
- H- Recebe combustível 1- Sim 0- Não 9-
NS/NR 88- NA
- I- Faz a Coleta e análise de amostras do caminhão tanque 1- Sim 0- Não 9-
NS/NR 88- NA
- J- Outros : _____ 88- NA

(25) Quais desses procedimentos o sr (a) realiza durante o seu trabalho?

ENTREVISTADOR LEIA TODAS AS OPÇÕES

A- Uso do paninho / flanela 1- Sim 0- Não 9-
 NS/NR 88- NA

B- Aproxima o rosto quando abastece até a boca 1- Sim 0- Não 9-
 NS/NR 88- NA

C- Cheira a tampa do carro antes de abastecer 1- Sim 0- Não 9-
 NS/NR 88- NA

D- Confia no bico automático (pára de abastecer ao sinal do bico automático) 1- Sim 0- Não 9-
 NS/NR 88- NA

E- Aspira combustíveis com a mangueira 1- Sim 0- Não 9-
 NS/NR 88- NA

F- Permanece com Roupa molhada de combustível 1- Sim 0- Não 9-
 NS/NR 88- NA

G- Lava carros 1- Sim 0- Não 9-
 NS/NR 88- NA

H- Uso do querosene ou outra substância para dar brilho no carro 1- Sim 0- Não 9-
 NS/NR 88- NA

I- Outro? 1-Sim

Qual: _____ 88- NA

0- Não 9- NS/NR

(26) Com quais combustíveis o sr(a) abastece? ENTREVISTADOR LEIA TODAS AS OPÇÕES

A - Gasolina Comum 1- Sim 0- Não 9- NS/NR 88- NA

B - Gasolina Aditivada 1- Sim 0- Não 9- NS/NR 88- NA

C - Diesel 1- Sim 0- Não 9- NS/NR 88- NA

D - Etanol 1- Sim 0- Não 9- NS/NR 88- NA

E- GNV 1- Sim 0- Não 9- NS/NR 88- NA

F- Outros: _____ 88- NA

(27) O sr(a) realiza(ou) coleta de amostras do caminhão tanque durante o descarregamento?

1- Sim, realiza atualmente 2- Não realiza atualmente, mas já realizou

0- Nunca fez 9- NS/NR 88- NA

(28) Por quanto tempo o sr(a) realiza(ou) coleta das amostras do caminhão tanque durante o descarregamento?

Tempo: |__||__| meses / anos 88- NA 9- NS/NR

(29) O sr(a) usa(va) equipamentos diferentes do uniforme durante as coletas do caminhão tanque?

1- Sim Quais: _____

0- Não 88- NA 9- NS/NR

(30) Onde são armazenadas as amostras de combustíveis?

1- Escritório

2- Sala de refeição / refeitório

3- Loja de conveniência

4- Banheiro

5- Sala exclusiva para armazenar combustível

6- Outro local fora do posto

7-

Outros:Quais: _____

_____ 88- NA

9- NS/NR

(31) O sr(a) realiza ou já realizou medição dos níveis dos tanques do subsolo?

1- **Sim**, Eletrônica

2- **Sim**, Manual com régua

0- **Não** realiza

9- NS/NR 88- NA

(32) Por quanto tempo o sr(a) realiza(ou) este tipo de medição dos níveis dos tanques do subsolo?

Tempo: |__||__| MESES / ANOS 88- NA 9- NS/NR

(33) O sr(a) usa (ou) algum equipamento de proteção, além do uniforme, durante a medição dos níveis dos tanques do subsolo?

1- Sim Quais: _____ 88- NA

0- Não 9- NS/NR

(34) O sr(a) realiza(ou) limpeza da caixa separadora de água e óleo?

1- Sim - Por quanto tempo? | __ || __ | meses / anos 88- NA

0- Não 9- NS/NR

(35) O sr(a) realiza (ou) troca de óleo de carro?

1- Sim – Por quanto tempo? | __ || __ | meses / anos 88- NA

0- Não 9- NS/NR

(36) O sr(a) realiza (ou) aferição da bomba de combustível?

1- Sim – Por quanto tempo? | __ || __ | meses / anos 88- NA

0- Não 9- NS/NR

(37) Alguns dos eventos a seguir foram sofridos pelo sr(a) nesta função?

A- Assaltos 1- Sim 0- Não 9- NS/NR
88- NA

B- Atropelamentos 1- Sim 0- Não 9- NS/NR
88- NA

C- Incêndio / explosão 1- Sim 0- Não 9- NS/NR
88- NA

D- Vazamento de combustível no posto 1- Sim 0- Não 9- NS/NR
88- NA

E- Exposição ao combustível (banho/intoxicação) 1- Sim 0- Não 9- NS/NR
88- NA

F- Vazamento de gás (GNV) 1- Sim 0- Não 9- NS/NR
88- NA

G- Queimadura 1- Sim 0- Não 9- NS/NR 88-
 NA

H- Vazamento de combustível no carro do cliente 1- Sim 0- Não 9- NS/NR
88- NA

I- Discussão com cliente 1- Sim 0- Não 9- NS/NR 88-
 NA

J- Assédio (moral / sexual) 1- Sim 0- Não 9- NS/NR
88- NA

H- Outro: 1- Sim Quais: _____
88- NA

0- Não 9- NS/NR

(38) O Sr (a) usa protetor solar durante o trabalho no posto de combustível ?

0- Não

1- Sim

(38.1) Com qual frequência o Sr (a) usa protetor solar durante o trabalho no posto de combustível:

0- 1x /semana

1- 2x / semana

2- 3x ou mais por semana

3- Não

4- Diariamente

5- Outro: 1- Sim Qual: _____

9- NS/NR 88- NA

EXPOSIÇÃO ATUAL:

POR FAVOR, INFORME TODAS AS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS AS QUAIS O(A) SR.(A) É EXPOSTO NO SEU AMBIENTE DE TRABALHO ATUAL.

SUBSTÂNCIAS E PRODUTOS QUÍMICOS EXPOSTOS DURANTE A JORNADA DE TRABALHO

39- O (a) sr(a) algum tipo de contato (dérmico, olfativo, etc)?	39- Com que frequência o (a) sr(a) tem contato ? <i>Entrevistador: Leia as alternativas</i>
A. Gasolina 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	1- <input type="checkbox"/> Diariamente 2- <input type="checkbox"/> Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana 3- <input type="checkbox"/> Raramente 4- <input type="checkbox"/> Não tem contato 9- <input type="checkbox"/> NS/NR
B. Etanol (Álcool) 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	1- <input type="checkbox"/> Diariamente 2- <input type="checkbox"/> Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana 3- <input type="checkbox"/> Raramente 4- <input type="checkbox"/> Não tem contato 9- <input type="checkbox"/> NS/NR
C. Diesel 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	1- <input type="checkbox"/> Diariamente 2- <input type="checkbox"/> Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana 3- <input type="checkbox"/> Raramente 4- <input type="checkbox"/> Não tem contato 9- <input type="checkbox"/> NS/NR
D. GNV 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	1- <input type="checkbox"/> Diariamente 2- <input type="checkbox"/> Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana 3- <input type="checkbox"/> Raramente 4- <input type="checkbox"/> Não tem contato 9- <input type="checkbox"/> NS/NR
E. Fumaças de carro, caminhão e motos 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	1- <input type="checkbox"/> Diariamente 2- <input type="checkbox"/> Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana 3- <input type="checkbox"/> Raramente 4- <input type="checkbox"/> Não tem contato 9- <input type="checkbox"/> NS/NR
F. Querosene 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	1- <input type="checkbox"/> Diariamente 2- <input type="checkbox"/> Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana 3- <input type="checkbox"/> Raramente 4- <input type="checkbox"/> Não tem contato 9- <input type="checkbox"/> NS/NR

39- O (a) sr(a) algum tipo de contato (dérmico, olfativo, etc)?	39- Com que frequência o (a) sr(a) tem contato ? <u>Entrevistador: Leia as alternativas</u>
G. Óleo lubrificante 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	1- <input type="checkbox"/> Diariamente 2- <input type="checkbox"/> Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana 3- <input type="checkbox"/> Raramente 4- <input type="checkbox"/> Não tem contato 9- <input type="checkbox"/> NS/NR
H. Produtos de Limpeza (Saneantes) Especificar: _____ 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	1- <input type="checkbox"/> Diariamente 2- <input type="checkbox"/> Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana 3- <input type="checkbox"/> Raramente 4- <input type="checkbox"/> Não tem contato 9- <input type="checkbox"/> NS/NR
I. Graxa e cera 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	1- <input type="checkbox"/> Diariamente 2- <input type="checkbox"/> Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana 3- <input type="checkbox"/> Raramente 4- <input type="checkbox"/> Não tem contato 9- <input type="checkbox"/> NS/NR
J. Solventes, removedores, aguarrás, thinner 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	1- <input type="checkbox"/> Diariamente 2- <input type="checkbox"/> Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana 3- <input type="checkbox"/> Raramente 4- <input type="checkbox"/> Não tem contato 9- <input type="checkbox"/> NS/NR
L. Outros, Especificar: _____ _____ _____	1- <input type="checkbox"/> Diariamente 2- <input type="checkbox"/> Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana 3- <input type="checkbox"/> Raramente 4- <input type="checkbox"/> Não tem contato 9- <input type="checkbox"/> NS/NR
M. Outros, Especificar: _____ _____ _____	1- <input type="checkbox"/> Diariamente 2- <input type="checkbox"/> Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana 3- <input type="checkbox"/> Raramente 4- <input type="checkbox"/> Não tem contato 9- <input type="checkbox"/> NS/NR
N. Outros, Especificar: _____ _____ _____	1- <input type="checkbox"/> Diariamente 2- <input type="checkbox"/> Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana 3- <input type="checkbox"/> Raramente 4- <input type="checkbox"/> Não tem contato 9- <input type="checkbox"/> NS/NR

(40) O Sr (a) realizou exames médicos admissionais?

0- Não

1- Sim Quais: _____

9- NS/NR

(41) O Sr (a) realiza exames médicos periódicos?

0- Não

1- Sim Quais: _____

9- NS/NR

(42) O Sr (a) conhece/recebe os resultados desses exames médicos periódicos?

0- Não

1- Sim

9- NS/NR

88- NA

(43) O Sr (a) sabe o porquê deve fazer esses exames médicos periódicos?

0- Não

1- Sim

9- NS/NR

88- NA

PERCEPÇÃO DO ENTREVISTADOR:

A - Confiança nas respostas:

Confio totalmente

Confio Parcialmente

Não Confio

OBSERVAÇÕES: _____

ANEXO 5



INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA)
COORDENAÇÃO GERAL DE PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA
UNIDADE TÉCNICA DE EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL, AMBIENTAL E CÂNCER

PROJETO DE PESQUISA: "MONITORAMENTO BIOLÓGICO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS
MUTAGÊNICOS E IMUNOTÓXICOS DO BENZENO NA SAÚDE DOS TRABALHADORES DOS
POSTOS DE COMBUSTÍVEIS DO RIO DE JANEIRO"

QUESTIONÁRIO CLÍNICO

Nome do Posto : _____	88- NA <input type="checkbox"/>
Nome	
Completo: _____	
_____ N° do Posto:	88- NA <input type="checkbox"/> N° Questionário
Data da Entrevista: ____/____/____	
Entrevistador: _____	

MÓDULO 1: ANAMNESE CLÍNICA	
HISTÓRIA PATOLÓGICA PREGRESSA	
(1) Doenças Cardiovasculares: 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(1.1) Qual(is): _____ __88- <input type="checkbox"/> NA	
(2) Doenças Infecciosas: 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(2.1)	Qual(is): _____ 88- <input type="checkbox"/>
NA	

(3) Doenças Neurológicas: 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(3.1)	Qual(is): _____88- <input type="checkbox"/>
NA	
(4) Doenças Respiratórias: 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(4.1)	Qual(is): _____88- <input type="checkbox"/>
NA	
(5) Doenças Gastrointestinais: 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(5.1)	Qual(is): _____88-
<input type="checkbox"/> NA	
(6) Doenças Hepáticas: 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(6.1)	Qual(is): _____88- <input type="checkbox"/>
NA	
(7) Doenças Renais: 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(7.1)	Qual(is): _____88-
<input type="checkbox"/> NA	
(8) Doenças Hematológicas: 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(8.1)	Qual(is): _____88-
<input type="checkbox"/> NA	
(9) Doenças Endócrinas: 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(9.1)	Qual(is): _____88- <input type="checkbox"/>
NA	

(10) Doenças Psíquicas:		1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR
(10.1)	Qual(is):	_____88-
<input type="checkbox"/> NA		
(11) Doenças Osteoarticulares:		1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR
(11.1)	Qual(is):	_____88-
<input type="checkbox"/> NA		
(12) Doenças Uro/ginecológicas:		1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR
(12.1)	Qual(is):	_____88- <input type="checkbox"/>
NA		
(13) Doenças Otorrinolaringológicas:		1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR
(13.1)	Qual(is):	_____88-
<input type="checkbox"/> NA		
(14) Doenças da Visão:		1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR
(14.1)	Qual(is):	_____88-
<input type="checkbox"/> NA		
(15) Doenças da Pele:		1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR
(15.1)	Qual(is):	_____88- <input type="checkbox"/>
NA		
(16) Neoplasias:		1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR
(16.1)	Qual(is):	_____88-
<input type="checkbox"/> NA		

(17) Internações:	1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR
(17.1)	Motivo(s): _____ 88- <input type="checkbox"/>
NA	
(18) Cirurgias:	1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR
(18.1)	Motivo(s): _____ 88- <input type="checkbox"/>
NA	
(19) Transfusão de sangue ou derivados:	1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR
(19.1)	Motivo(s): _____ 88- <input type="checkbox"/>
NA	

HISTÓRIA PATOLÓGICA ATUAL	
(20) Diagnóstico de Hipertensão Arterial:	1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR
(20.1) Faz uso de remédios para controle da pressão arterial?	
1- <input type="checkbox"/> Sim, de forma regular 2- <input type="checkbox"/> Sim, de forma irregular 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(21) Diagnóstico de Diabetes Mellitus:	1- Sim, tipo1 <input type="checkbox"/> 2- Sim, tipo 2 - <input type="checkbox"/> 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR
(21.1) Faz uso de remédios para controle DB?	1- <input type="checkbox"/> Sim, de forma regular 2- <input type="checkbox"/> Sim, de forma irregular 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR
(22) TEM OUTRO(S) PROBLEMA(S) DE SAÚDE DIAGNOSTICADO(S) POR MÉDICO?	1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR
(22.1) Qual: _____	88- <input type="checkbox"/> NA

HISTÓRIA REPRODUTIVA	
MULHERES	
(23) Possui filhos:	
1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	

(24) Número de filhos: __ __	88- <input type="checkbox"/> NA
(24.1) Número de Partos: __ __	88- <input type="checkbox"/> NA
(25) Número de Natimortos: __ __	88- <input type="checkbox"/> NA
(26) Nascidos Vivos Sadios: __ __	88- <input type="checkbox"/> NA
(27) Nascidos Vivos Não Sadios: __ __	88- <input type="checkbox"/> NA
(27.1) Qual doença (inclusive câncer ou doenças hematológicas ou má formação)? _____	88- <input type="checkbox"/> NA
(28) Sra já sofreu algum aborto ESPONTÂNEO <u>durante o período de tempo que trabalha em Postos?</u>	
0- <input type="checkbox"/> não 1- <input type="checkbox"/> sim 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(28.2) Em <u>Qual período gestacional</u> sofreu aborto?	
1- <input type="checkbox"/> 1.º Trimestre	Quantos: _____ 88- <input type="checkbox"/> NA
2- <input type="checkbox"/> 2.º Trimestre	Quantos: _____ 88- <input type="checkbox"/> NA
3- <input type="checkbox"/> 3.º Trimestre	Quantos: _____ 88- <input type="checkbox"/> NA
(29) A sra já provocou/ induziu algum aborto?	
0- <input type="checkbox"/> Não 1- <input type="checkbox"/> Sim Quantos? _____ 88- <input type="checkbox"/> NA 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(30) Idade em que ocorreu a primeira menstruação: __ __ Anos	
(31) Idade em que parou de menstruar: __ __ Anos 88-<input type="checkbox"/> NA	
(31.1) Há quanto tempo parou de menstruar? _____ 88-<input type="checkbox"/> NA	
(31.2) Por que sra não menstrua mais? 1-<input type="checkbox"/> Menopausa natural 2-<input type="checkbox"/> Cirurgia para retirada de útero ou ovários 3-<input type="checkbox"/> Outros tratamentos (hormônios, quimioterapia ou radiação); 88-<input type="checkbox"/> NA	
4- <input type="checkbox"/> Outra razão – especificar: _____	
88- <input type="checkbox"/> NA	

HOMENS	
(32) Possui filhos: 1- <input type="checkbox"/> Sim 88- <input type="checkbox"/> NA 9- <input type="checkbox"/> NS/NR 0- <input type="checkbox"/> Não	
(32.1) Caso afirmativo, quantos? _____ 88- <input type="checkbox"/> NA	
(32.2) Todos são saudáveis? 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR 88- <input type="checkbox"/> NA	
(32.3) Caso negativo, qual ou quais doenças? _____ 88- <input type="checkbox"/> NA	

MÓDULO 2: ESTILOS DE VIDA	
TABAGISMO	
(33) Sr(a) é: 2- <input type="checkbox"/> Fumante 1- <input type="checkbox"/> Ex- fumante 0- <input type="checkbox"/> Nunca fumou	
(33.1) Com que idade o(a) sr(a) <u>começou</u> a fumar cigarros (mesmo que já tenha parado)? <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Anos 88- <input type="checkbox"/> NA 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(33.2) Há quanto tempo o sr(a) parou de fumar? 1- <input type="checkbox"/> mais de 1 ano 2- <input type="checkbox"/> entre 3 e 12 meses 3- <input type="checkbox"/> entre 1 e 3 mês 4- <input type="checkbox"/> entre 1 semana e 1 mês 88- <input type="checkbox"/> NA 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(33.3) Há quanto tempo o sr(a) fuma? _____ 88- <input type="checkbox"/> NA 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(34) Quantos cigarros sr(a) fuma por dia? 0- <input type="checkbox"/> menos de 10 1- <input type="checkbox"/> de 11 a 20 2- <input type="checkbox"/> 21 a 30 3- <input type="checkbox"/> de 31 a 40 4- <input type="checkbox"/> 41 ou mais 88- <input type="checkbox"/> NA 9- <input type="checkbox"/> NS/NR obs: 1 maço de cigarros = 20 cigarros	
(35) O(a) sr(a) convive diariamente com alguém que fuma (<u>em casa</u>)? 0- <input type="checkbox"/> . Não 1- <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> 9. NS/NR <input type="checkbox"/> 8. NA	
(35.1) O(a) sr(a) convive diariamente com alguém que fuma (<u>no trabalho</u>)? 0- <input type="checkbox"/> . Não 1- <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> 9. NS/NR <input type="checkbox"/> 8. NA	
CONSUMO DE ALCOOL	
(36) Sr(a) costuma ingerir bebidas alcoólicas? 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não 9- <input type="checkbox"/> NS/NR	

(37) Que tipo de bebida o sr (a) ingere com maior frequência?

A- Cerveja 1- Sim 0- Não 9- NS/NR 88- NA

B- Cachaça 1- Sim 0- Não 9- NS/NR 88- NA

C- Vodka 1- Sim 0- Não 9- NS/NR 88- NA

D- Vinho 1- Sim 0- Não 9- NS/NR 88- NA

E- Energético 1- Sim 0- Não 9- NS/NR 88- NA

F- Outras: Quais: _____ 88- NA

(38) Qual frequência do seu consumo de bebidas alcoólicas?

0- 1 a 2 x semana 1- 3 a 4x semana 2- 5 a 6 x por semana

3- Diariamente 4- Outra: _____ 88- NA 9-

NS/NR

(39) Em média, quantas doses o sr (a) consome?

0- 1 dose por dia

1- 2 - 3 doses por dia

2- 4 - 5 doses por dia

3- Mais de 6 doses por dia

4- Outra: especifique: _____ 9- NS/NR

88- NA

**(39.1) O Sr(a) consome alimentos prontos, industrializados ou processados (ex:lasanha, refrigerantes, cervejas, refrescos, suco pronto, queijo, molho pronto, margarina.)
quantas vezes por semana, em média?**

0- 1 a 2 x semana 1- 3 a 4x semana 2- 5 a 6 x por semana

3- Diariamente 4- Outra: _____ 88- NA 9-

NS/NR

CONSUMO DE OUTRAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS

(40) O sr(a) usa algum tipo de medicamento?

- A- Analgésicos 1- Sim 0- Não 9- NS/NR 88- NA
B- Anti-inflamatórios 1- Sim 0- Não 9- NS/NR 88- NA
C- Antibióticos 1- Sim 0- Não 9- NS/NR 88- NA
D- Controlados (Psicotrópicos) 1- Sim 0- Não 9- NS/NR 88- NA
E- Outros? Quais? _____ 88- NA

(40.1) Se sim: 1- Sem prescrição médica 0- Com prescrição médica 88- NA

(41) O sr(a) usa algum tipo de droga de abuso:

1- Sim 0- Não 9- NS/NR

(42) Quais drogas de abuso o sr(a) usa?

- A- Maconha 1- Sim 0- Não 9- NS/NR 88- NA
B- Cocaína 1- Sim 0- Não 9- NS/NR 88- NA
C- Colas / solventes 1- Sim 0- Não 9- NS/NR 88- NA
D- Crack 1- Sim 0- Não 9- NS/NR 88- NA
E- Ecstasy 1- Sim 0- Não 9- NS/NR 88- NA
F- Outras? Quais? _____ 88- NA

(43) Frequência do uso de drogas de abuso:

1- 1 a 2 vezes por semana 2- 3 a 4 vezes por semana 88- NA
3- 5 a 6 vezes por semana 4- Diariamente 5- Outra:
_____ 88- NA

MÓDULO 3: HISTÓRIA FAMILIAR

(44) Alguém da sua família já teve câncer: 1- Sim 0- Não 9-
NS/NR

(44.1) Quem da sua família ou do seu convívio teve / tem câncer:

A- Pai 0- Não 1- Sim Qual(is) tipo(s)? _____
 _____ 88- NA 9- NS/NR

B- Mãe 0- Não 1- Sim Qual(is) tipo(s)? _____ 88-
 NA 9- NS/NR

C- Avô 0- Não 1- Sim Qual(is) tipo(s)? _____
 _____ 88- NA 9- NS/NR

D- Avó 0- Não 1- Sim Qual(is) tipo(s)? _____
 _____ 88- NA 9- NS/NR

E- Irmão(ã) 0- Não 1- Sim Qual(is) tipo(s)? _____
 _____ 88- NA 9- NS/NR

F- Filho(a) 0- Não 1- Sim Qual(is) tipo(s)? _____
 _____ 88- NA 9- NS/NR

G- Esposo(a) 0- Não 1- Sim Qual(is) tipo(s)? _____
 _____ 88- NA 9- NS/NR

H- Outro 0- Não 1- Sim Qual(is) tipo(s)? _____
 _____ 88- NA 9- NS/NR

(44.2) Outras doenças familiares :
 _____ 88- NA

MODULO 4: SINAIS E SINTOMAS

(45) Nos últimos 3 meses o sr(a) realizou algum exame de imagem? (raio X, tomografia, ressonância)

0- Não 1- Sim Especifique o local e tipo _____ mês -
 _____ 88- NA

9- NS/NR Especifique o local e tipo _____ mês -
 _____ 88- NA

Especifique o local e tipo _____ mês -
 _____ 88- NA

(46) o Sr(a) realizou algum tipo de tratamento com radioterapia ou quimioterapia?

0- Não

1- Sim Qual: _____ 88- NA

Local do corpo: _____ 88- NA 9- NS/NR

(47) Emagrecimento	1- <input type="checkbox"/> Sim	Quantos kg: _____	88- <input type="checkbox"/> NA	0- <input type="checkbox"/> Não
	9- <input type="checkbox"/> NS/NR			
(48) Fraqueza	1- <input type="checkbox"/> Sim	0- <input type="checkbox"/> Não	9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(49) Tontura	1- <input type="checkbox"/> Sim	0- <input type="checkbox"/> Não	9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(50) Sonolência	1- <input type="checkbox"/> Sim	0- <input type="checkbox"/> Não	9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
SISTEMA NERVOSO CENTRAL E PERIFÉRICO				
(51) Dificuldade para enxergar	1- <input type="checkbox"/> Sim	Qual motivo: _____		88- <input type="checkbox"/> NA
	0- <input type="checkbox"/> Não	9- <input type="checkbox"/> NS/NR		
(52) Cefaléia / dor de cabeça	1- <input type="checkbox"/> Sim	0- <input type="checkbox"/> Não	9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(53) Irritabilidade / Nervosismo	1- <input type="checkbox"/> Sim	0- <input type="checkbox"/> Não	9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(54) Ansiedade	1- <input type="checkbox"/> Sim	0- <input type="checkbox"/> Não	9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(55) Insônia	1- <input type="checkbox"/> Sim	0- <input type="checkbox"/> Não	9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(56) Alteração da Humor / Depressão	1- <input type="checkbox"/> Sim	0- <input type="checkbox"/> Não	9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(57) Alteração da atenção	1- <input type="checkbox"/> Sim	0- <input type="checkbox"/> Não	9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(58) Alteração da memória	1- <input type="checkbox"/> Sim	0- <input type="checkbox"/> Não	9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(59) Sudorese Noturno	1- <input type="checkbox"/> Sim	0- <input type="checkbox"/> Não	9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(60) Formigamentos	1- <input type="checkbox"/> Sim	0- <input type="checkbox"/> Não	9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(61) Movimentos Involuntários	1- <input type="checkbox"/> Sim	0- <input type="checkbox"/> Não	9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(62) Tremores	1- <input type="checkbox"/> Sim	0- <input type="checkbox"/> Não	9- <input type="checkbox"/> NS/NR	
(63) Câibras	1- <input type="checkbox"/> Sim	0- <input type="checkbox"/> Não	9- <input type="checkbox"/> NS/NR	

(64) Diminuição da força muscular	1- <input type="checkbox"/> Sim	0- <input type="checkbox"/> Não	9- <input type="checkbox"/>
NS/NR			
(65) Convulsões	1- <input type="checkbox"/> Sim	0- <input type="checkbox"/> Não	9- <input type="checkbox"/>
NS/NR			
SISTEMA HEMATOLÓGICO E SISTEMA IMUNOLÓGICO			
(66) Petéquias:	1- <input type="checkbox"/> Sim	0- <input type="checkbox"/> Não	9- <input type="checkbox"/> NS/NR
(67) Hematomas	1- <input type="checkbox"/> Sim	0- <input type="checkbox"/> Não	9- <input type="checkbox"/> NS/NR
(68) Epistaxe	1- <input type="checkbox"/> Sim	0- <input type="checkbox"/> Não	9- <input type="checkbox"/> NS/NR

ECTOSCOPIA	
(69) Marcha: 0- <input type="checkbox"/> Normal 1- <input type="checkbox"/> Alterada	
(70) Equilíbrio:	A- Dinâmico: 0- <input type="checkbox"/> Normal 1- <input type="checkbox"/> Alterado
	B- Estático: 0- <input type="checkbox"/> Normal 1- <input type="checkbox"/> Alterado
(71) Tremores: 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não → Onde: 0- <input type="checkbox"/> Facial 1- <input type="checkbox"/> Membro superior 2- <input type="checkbox"/> Membro inferior 3- <input type="checkbox"/> Outro(s): _____	
(72) Deformidades: 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não → Qual: _____	
(73) Fácies: 1- <input type="checkbox"/> Atípico 2- <input type="checkbox"/> Inexpressivo 3- <input type="checkbox"/> Indiferente 4- <input type="checkbox"/> Tristeza 5- <input type="checkbox"/> Euforia 6- <input type="checkbox"/> Ansiedade 7- <input type="checkbox"/> Outra: _____	
(74) Orientado: 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não	(75) Lúcido: 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não
(76) Disfonia: 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não	(77) Icterícia: 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não
(78) Mucosas: 0- <input type="checkbox"/> coradas 1- <input type="checkbox"/> descoradas	(79) Irritação Ocular 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não
(80) Pupilas isocóricas: 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não	
(81) Nistagmus: 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não	
(82) Diplopia: 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não	(83) Acomodação: 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não

<p>(84) Gânglios palpáveis: 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não → Quais: 1- <input type="checkbox"/> Submandibular 2- <input type="checkbox"/> Pescoço</p> <p>3- <input type="checkbox"/> outro(s): _____</p>	
<p>(85) Tireóide: 0- <input type="checkbox"/> Normal 1- <input type="checkbox"/> Alterado</p>	
<p>(86) Fâneros: 0- <input type="checkbox"/> Normal 1- <input type="checkbox"/> Alterado</p> <p>Qual: _____</p>	
<p>(87) Lesões de pele: 0- <input type="checkbox"/> Não 1- <input type="checkbox"/> Sim → Quais: 1- <input type="checkbox"/> Manchas 2- <input type="checkbox"/> Furúnculos 3- <input type="checkbox"/> Pruridos</p> <p>4- <input type="checkbox"/> Dermatite irritativa 5- <input type="checkbox"/> Eritema 6- <input type="checkbox"/> Outra(s): _____</p> <p>(87.1) Localização: _____</p> <p>(87.2) Descrição: _____</p>	
<p>(88) Acne: 1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não</p>	
<p>(89) Edemas 1- <input type="checkbox"/> Sim</p> <p>→Onde: _____</p> <p>0- <input type="checkbox"/> Não</p>	
<p>APARELHO CARDIOVASCULAR (ACV)</p>	
<p>(90) Pressão Arterial: _ _ _ x _ _ _ mmHg</p>	
<p>(91) Frequência Cardíaca: _ _ _ bpm</p>	
<p>(92) Pulso Radial Esquerdo: 0- <input type="checkbox"/> Normal 1- <input type="checkbox"/> Alterado</p>	
<p>(92) Ritmo cardíaco 0- <input type="checkbox"/> Normal 1- <input type="checkbox"/> Alterado: _____</p>	
<p>(93) Bulhas normofonéticas</p> <p>1- <input type="checkbox"/> Sim 0- <input type="checkbox"/> Não</p>	
<p>APARELHO RESPIRATÓRIO (AR)</p>	
<p>(95) Deformidade torácica: 1- <input type="checkbox"/> Sim → Qual: _____ 0- <input type="checkbox"/> Não</p>	
<p>(96) Frequência Respiratória: 0- <input type="checkbox"/> Eupnéico 1- <input type="checkbox"/> Taquipnéico 2- <input type="checkbox"/> Bradipneico</p> <p>Nº de IRPM _____</p>	

(97) Murmúrio Vesicular bem distribuído: 1- Sim

0- Não → Por que? _____

OBSERVAÇÕES: _____

_____.

ANEXO 6



Ofício nº 228 /2016 CONPREV/INCA

Rio de Janeiro, 12 de julho de 2016.

À Profa Dra Leiliane Coelho André
Laboratório de Toxicologia Ocupacional
Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

Assunto: Cooperação técnica para Implementação e Validação do Método de Análise do ácido Fenilmercaptúrico por meio de transferência de tecnologia entre a Unidade Técnica da Exposição Ocupacional, Ambiental e Câncer e o Laboratório de Toxicologia Ocupacional.

Prezada Profa. Dra. Leiliane

Estamos desenvolvendo um projeto intitulado “MONITORAMENTO BIOLÓGICO E AVALIAÇÃO DOS EFEITOS MUTAGÊNICOS E IMUNOTÓXICOS DO BENZENO NA SAÚDE DOS TRABALHADORES DOS POSTOS DE COMBUSTÍVEIS DO RIO DE JANEIRO”, que conta com recurso financeiro da OPAS e do PPSUS da Faperj (2014-2016), cujo objetivo é avaliar a exposição de trabalhadores de postos de combustíveis à gasolina, mais especificamente, ao benzeno. A parte experimental do projeto está sendo desenvolvida em parceria com o Laboratório de Análises Clínicas, Ambientais e Toxicológicas (LACAT) do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (DBQ/IB/UNIRIO) e com o Departamento de Farmacologia e Toxicologia do INCQS.

Atualmente, estamos fazendo as análises do ácido trans-trans-mucônico para monitorar a exposição desses trabalhadores ao benzeno, porém, será muito interessante e uma ferramenta útil se avaliarmos também, o ácido fenil mercaptúrico, produto de biotransformação mais sensível e atualmente indicado pela Fundacentro como bioindicador de exposição ao benzeno.

Para analisar o ácido trans-trans-mucônico estamos utilizando o HPLC com detector UV, no entanto, esse método não é sensível e nem indicado para avaliar o ácido fenil mercaptúrico, nas faixas de concentração que trabalhamos. O mesmo, segunda a literatura, é detectado em LC-MS ou HPLC/Fluorimétrico.

Gostaríamos de estabelecer uma cooperação técnica entre a Unidade Técnica de Exposição Ocupacional, Ambiental e Câncer – Coordenação de Prevenção e Vigilância do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) e o Laboratório de Toxicologia Ocupacional (LATO) da Faculdade de Farmácia da UFMG com objetivo de validar o método.

Leiliane
20/07/2016



para análise do ácido fenil mercaptúrico em urina e realizar um estudo interlaboratorial entre o laboratório do Departamento de Bioquímica da UNIRIO e o LATO/UFMG para as análises do ácido fenil mercaptúrico em amostras de urina dos trabalhadores de postos de revenda de combustíveis do município do Rio de Janeiro, grupo de estudo do projeto. Informamos que não transmitiremos essa tecnologia para outros laboratórios sem a anuência do LATO.

A Unidade assumirá o suprimento de material necessário ao desenvolvimento da metodologia proposta e oferecerá parceria/coautoria na publicação dos artigos resultantes da implementação, validação e análises do ácido fenil mercaptúrico da população de estudo, do referido projeto. Estamos a disposição para maiores esclarecimentos.

Atenciosamente,

Ubirani Barros Otero

Unidade Técnica da Exposição Ocupacional, Ambiental e Câncer
Coordenação Geral de Prevenção e Vigilância - CGPV
Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

De acordo

Leiliane Barros Franco
Coord. de Prevenção e Vigilância
INCA - CONPREV
Mat. 6242239/MS

Leiliane Coelho André

Laboratório de Toxicologia Ocupacional
Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)



Ministério da
Saúde

GOVERNO FEDERAL
BRASIL
PÁTRIA 2003