

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
SERGIO AROUCA  
ENSP

*“Avaliação de exposição ao diflubenzuron em guardas de endemias da  
Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro”*

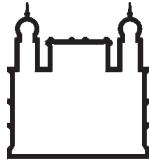
*por*

*Cristiane Barata Silva*

*Dissertação apresentada com vistas à obtenção do título de Mestre em  
Ciências na área de Saúde Pública e Meio Ambiente.*

*Orientadora principal: Prof.ª Dr.ª Paula de Novaes Sarcinelli  
Segundo orientador: Prof. Dr. Josino Costa Moreira*

*Rio de Janeiro, março de 2013.*



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA  
SERGIO AROUCA  
ENSP

*Esta dissertação, intitulada*

*“Avaliação de exposição ao diflubenzuron em guardas de endemias da Região Metropolitana do Estado do Rio de Janeiro”.*

*apresentada por*

***Cristiane Barata Silva***

*foi avaliada pela Banca Examinadora composta pelos seguintes membros:*

Prof. Dr. Alan Ferreira Inácio

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ariane Leites Larentis

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Paula de Novaes Sarcinelli – Orientadora principal

Catálogo na fonte  
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica  
Biblioteca de Saúde Pública

S586 Silva, Cristiane Barata  
Avaliação da exposição ao diflubenzuron em guardas de  
endemias da região metropolitana do estado do Rio de Janeiro. /  
Cristiane Barata Silva. -- 2013.  
113 f. tab. ; graf.

Orientador: Sarcinelli, Paula de Novaes  
Moreira, Josino Costa  
Dissertação (Mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública  
Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2013.

1. Diflubenzuron. 2. Metemoglobina. 3. Dengue - prevenção e  
controle. 4. Saúde do Trabalhador. 5. Controle Biológico de  
Vetores. 6. Exposição a Praguicidas. I. Título.

CDD – 22.ed. – 363.11098153

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente aos meus pais, às minhas irmãs e  
principalmente ao meu marido, Luciano.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, que permitiu através da vida sempre aprender e por permitir partilhar momentos inenarráveis com pessoas tão especiais.

Aos meus pais por me oferecer a melhor educação que um filho pode receber para se tornar um ser humano digno.

Às minhas irmãs pelo incentivo em alcançar meus sonhos.

Especialmente, ao meu marido que com seu amor infinito me fortaleceu para crescer profissionalmente. E pela companhia e cuidado a todo momento, inclusive durante as jornadas noturnas no CESTEJ.

A minha orientadora que soube me orientar e consolar como uma verdadeira mãe e me auxiliou nesse meu crescimento profissional e como ser humano. E ao meu co-orientador que acreditou no meu potencial desde a época da iniciação científica até no momento que me encontro.

Aos professores, que me formaram a profissional que sou e me conduziram a optar pelo caminho ético para alcançar esse título.

A companheira de coleta Tatyane que me ajudou e sob toda adversidade superou o significado da palavra AMIZADE.

Ao Mário pelos diversos momentos de ajuda e doação, dando seu sangue para colaborar com o trabalho.

A todos os meus amigos, especialmente Ariane, Anna, Tamine, Carla, Lucineide e Adherlene que sempre me auxiliaram e dividiram as alegrias e os sofrimentos.

Aos colegas do mestrado e do trabalho pelo o apoio e compreensão.

Você não sabe o quanto caminhei pra chegar até aqui. Percorri milhas e milhas  
antes de dormir, eu não cochilei. Os mais belos montes escalei, nas noites  
escuras de frio chorei. Com a fé no dia-a-dia, encontro a solução.

A Estrada  
Cidade Negra

## RESUMO

Ao longo dos anos, vem sendo registrado mundialmente o aumento do uso de agrotóxicos nas atividades antrópicas. Dentre estes, o agrotóxico utilizado em campanhas de saúde pública no combate aos vetores da dengue (*Aedes Aegypti*) é o diflubenzuron, classificado como inseticida e acaricida pertencente ao grupo químico das benzoiluréias, tendo como ação principal a inibição da síntese de quitina. O principal efeito da exposição nos seres vivos é a formação de um pigmento sanguíneo, a metemoglobina. Esta tem a característica de não se ligar à molécula do oxigênio, levando à hipóxia nos órgãos em casos de exposição. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a exposição ao diflubenzuron e seus efeitos sobre os guardas de endemias atuantes no Estado do Rio de Janeiro através da análise dos níveis de metemoglobina no sangue venoso por espectrofotometria no visível no comprimento de onda de 630 nm. Além disso, foi possível delinear o perfil quanto aos hábitos de vida e condições de trabalho destes trabalhadores através da aplicação de um questionário semi-estruturado. Como resultados foi obtido que esta população de estudo eram preferencialmente do gênero masculino, com faixa etária entre 41 a 50 anos, na grande maioria tinha a função de tratamento e não fazia uso de EPI. Quanto a variação dos níveis do percentual de metemoglobina, foi possível observar uma discreta relação entre a exposição ao agrotóxico e a formação de metemoglobina e a existência de uma forte correlação inversa entre o hábito de fumar e a variação dos níveis de metemoglobina.

**Palavras-chave:** Diflubenzuron. Metemoglobina. Guardas de Endemia. Dengue.

## **ABSTRACT**

Over the years, it has been reported globally increased use of pesticides on human activities. Among these, the pesticides used in public health campaigns to combat the dengue vector (*Aedes aegypti*) is diflubenzuron, insecticide and acaricide classified as belonging to the chemical group benzoylureas, with the main action the inhibition of chitin synthesis. The main effect of exposure in human beings is the formation of a blood pigment, methemoglobin. This has the characteristic of not bind to the oxygen molecule, leading to organ hypoxia in display cases. In this context, the aim of this study was to assess exposure to diflubenzuron and its effects on endemic guards working in the State of Rio de Janeiro through the analysis of methemoglobin levels in venous blood by visible spectrophotometry at a wavelength of 630 nm. Furthermore, it was possible to define the profile as to lifestyle and working conditions of these workers through the application of a semi-structured questionnaire. As results obtained the study population were mainly of males, aged between 41 to 50 years, the vast majority had the function of treatment and did not use EPI. As the variation in the percentage of methemoglobin levels, we observed a slight relationship between exposure to pesticides and the formation of methemoglobin and the existence of a strong inverse correlation between smoking and varying levels of methemoglobin.

**Keyword:** Diflubenzuron. Methemoglobin. Guards Endemic. Dengue.



## **LISTA DE ABREVIATURAS:**

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

CESTEH – Centro de Estudo da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana

CL<sub>50</sub>- Concentração de uma substância, em mg/m<sup>3</sup> de ar ou ppm (parte por milhão parte de ar), capaz de provocar a morte de 50% dos expostos

CPU - p-clorofeniluréia

DL<sub>50</sub>- Dose de uma substância, em mg/kg, necessária para provocar a morte de 50% dos animais expostos

DRf- Dose de referência

ENSP – Escola Nacional de Saúde Pública.

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

IARC- Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer.

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

LOAEL- Mínima dose/nível no qual se observa efeito adverso

LOEL- mínima dose/nível onde se observa efeito

MHb – Metemoglobina

NOAEL- Nível no qual não se observa efeito adverso

NR- Norma Regulamentadora

PCA - p-cloroanilina

rpm – Rotações por minuto.

WHO – Organização Mundial da Saúde.

## **LISTA DE TABELAS:**

**TABELA 1.** Relação da concentração da Metemoglobina com os sintomas em seres humanos.

**TABELA 2.** Estudos do perfil toxicológico do diflubenzuron com base na exposição aguda, irritação e sensibilização.

**TABELA 3.** Estudos do perfil toxicológico do diflubenzuron com base na exposição subaguda à crônica.

**TABELA 4.** Resultados da centrifugação de alíquotas de uma mesma amostra submetidas a 3000 e 10000 rpm durante 15 minutos.

**TABELA 5.** Resultados da centrifugação de alíquotas de uma mesma amostra submetidas a 6000 e 10000 rpm durante 15 minutos.

**TABELA 6.** Resultados da análise de alíquotas de uma mesma amostra submetidas a condições de armazenamento distintos e analisadas em diferentes momentos.

**TABELA 7.** Planejamento de experimentos de análise da metemoglobina variando os volumes das soluções de cianeto de potássio e de ferricianeto de potássio (usando valores reais e valores normalizados segundo representação estatística).

**TABELA 8.** Resultados das diferentes análises de metemoglobina realizada em momentos distintos em um dia de trabalho utilizando uma amostra única.

**TABELA 9.** Resultados das diferentes análises de metemoglobina realizada em dias diferentes de trabalho utilizando amostras coletadas do mesmo indivíduo.

**TABELA 10.** Resultados das análises realizadas em dois diferentes laboratórios utilizando alíquotas de uma mesma amostra.

**TABELA 11.** Distribuição dos trabalhadores segundo a região de atuação.

**TABELA 12.** Distribuição dos trabalhadores segundo a atividade na ocorrência da intoxicação atual.

**TABELA 13.** Resultado da variação do percentual de metemoglobina após a exposição ao diflubenzuron com as características de cada trabalhador

**TABELA 14.** Resultado da variação do percentual de metemoglobina distribuído em faixas.

**TABELA 15.** Resultado da distribuição dos trabalhadores quanto ao tempo de aplicação do agrotóxico no dia da análise.

## **LISTA DE FIGURAS:**

**FIGURA 1.** Estrutura e fórmula química do diflubenzuron.

**FIGURA 2.** Estrutura química dos metabólitos CPU e PCA.

**FIGURA 3.** Reação de formação natural de metemoglobina no organismo.

**FIGURA 4.** Representação da absorção dos pigmentos sanguíneos

nos diferentes comprimentos de onda.

**FIGURA 5.** Cálculo da porcentagem de metemoglobina presente na amostra.

**FIGURA 6.** Distribuição geográfica da população de estudo segundo o local de sua residência.

**FIGURA 7.** Representação gráfica da distribuição do grupo populacional segundo o gênero.

**FIGURA 8.** Representação gráfica da distribuição da população alvo em faixas etárias.

**FIGURA 9.** Representação gráfica da distribuição da população quanto ao consumo de tabaco.

**FIGURA 10.** Representação gráfica da distribuição populacional quanto ao consumo de bebida alcoólica.

**FIGURA 11.** Representação gráfica da distribuição populacional quanto ao tempo de serviço na função.

**FIGURA 12.** Representação da distribuição populacional quanto ao local de lavagem dos equipamentos.

**FIGURA 13.** Representação da distribuição populacional quanto ao uso de EPI.

**FIGURA 14.** Representação da distribuição populacional quanto ao local de lavagem da roupa de trabalho.

**FIGURA 15.** Representação da distribuição populacional quanto ao relato dos hábitos dos trabalhadores.

**FIGURA 16.** Representação gráfica da distribuição de frequência alimentar relatada pelos trabalhadores.

**FIGURA 17.** Representação gráfica da distribuição de frequência de ingestão de linguiça relatada pelos trabalhadores.

**FIGURA 18.** Representação gráfica da distribuição percentual da origem da linguiça ingerida pelos trabalhadores.

**FIGURA 19.** Representação gráfica da distribuição das respostas quanto ao tempo de aplicação realizado por cada trabalhador.

**FIGURA 20.** Representação gráfica da distribuição dos níveis de MHb por categoria de consumo de tabaco.

## SUMÁRIO

<b>I- Introdução.....</b>	<b>1</b>
I.1- Introdução .....	2
I.1.1- Saúde do Trabalhador .....	2
I.1.2- Histórico da utilização de agrotóxico .....	3
I.1.3- Diflubenzuron .....	6
I.1.3.1- Utilização .....	7
I.1.3.2- Rotas de exposição .....	8
I.1.3.3- Toxicocinética .....	9
I.1.3.4- Toxicidade .....	10
I.1.4- Metemoglobina .....	11
I.2- Referencial Teórico .....	14
<b>II- Objetivos .....</b>	<b>21</b>
II.1- Objetivo Geral .....	22

II.2- Objetivos Específicos .....	22
<b>III- Metodologia .....</b>	<b>23</b>
III.1- Metodologia do estudo .....	24
III.1.1- Desenho do estudo .....	24
III.1.2- População alvo .....	25
III.2- Coleta de informações .....	26
III.3- Amostra biológica e sua coleta .....	26
III.4- Metodologia da análise .....	27
III.4.1- Otimização da metodologia de análise .....	30
III.4.2- Validação da metodologia de análise .....	34
III.4.3- Análises Estatísticas .....	34
<b>IV- Resultados e Discussões .....</b>	<b>37</b>
IV.1- Otimização da metodologia de análise .....	38
IV.1.1- Avaliação da velocidade de centrifugação.....	38
IV.1.2- Tempo e condições de armazenagem da amostra.....	41
IV.1.3- Avaliação de outros parâmetros da metodologia de análise.....	43
IV.2- Validação da metodologia de análise .....	46
IV.3- Estudo na população alvo.....	53
IV.3.1- Perfil social da população .....	55



IV.3.2- Perfil ocupacional.....	62
IV.3.3- Perfil alimentar e de uso de medicamento.....	70
IV.3.4- Resultados das coletas e análise de Metemoglobina .....	74
<b>V- Conclusão .....</b>	<b>84</b>
<b>VI- Referências Bibliográficas .....</b>	<b>87</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>95</b>
ANEXO A: Protocolo Operacional Padrão.....	96
ANEXO B: Consentimento do Conselho de Ética em Pesquisa.....	103
ANEXO C: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	104
ANEXO D: Questionário Específico Com Consulta e Sem Consulta .....	106

# **CAPÍTULO I: INTRODUÇÃO**

## **I.1- Introdução:**

### **I.1.1- Saúde do Trabalhador:**

A Saúde do Trabalhador enquanto campo de estudo teve seu surgimento com o advento da Revolução Industrial, período no qual os trabalhadores eram submetidos a condições precárias de trabalho e longas jornadas, gerando assim maior lucro para os empresários que, com menor investimento, obtinham altas produtividades. O ambiente hostil propiciou, com o tempo, o surgimento e proliferação de doenças ocupacionais que requeriam o afastamento do trabalhador, o que causava prejuízos para o sistema industrial e econômico. Assim, viu-se a necessidade, por parte do empresário, da implementação do médico no ambiente de trabalho, não para garantir a saúde do trabalhador, mas sim para evitar prejuízos com o afastamento da mão de obra. E desta forma, o médico do trabalho se tornou figura essencial para o funcionamento da cadeia produtiva<sup>1</sup>.

Com o passar do tempo, esta visão e prática foi sendo modificada e, no Brasil, a partir da Carta Constitucional de 1988 e a regulamentação da Lei 8080, a preservação da saúde do trabalhador se torna obrigatória e assegurada pela atuação de fiscais do Ministério do Trabalho. Este ministério tem como órgãos locais de atuação as Delegacias do Trabalho, que utilizam fiscais para a averiguação das condições em que se encontra o trabalhador no exercício de sua função. Porém, essa atividade é recente e necessita de intensos investimentos em recursos humanos e financeiros<sup>2</sup>.

Desta forma, o trabalhador se tornou, ao longo do tempo, objeto de estudo dentro das academias e ganhou grande espaço no atendimento dos Centros de Saúde. Esta evolução ocorreu devido ao grande número de acidentes e doenças decorrentes das más condições de trabalho e da exposição às substâncias químicas<sup>1</sup>.

Assim, a atual visão dado campo da Saúde do Trabalhador sofreu uma transformação, objetivando a preservação principalmente do indivíduo, com a manutenção do seu estado físico e mental íntegro, para que sua vida não seja afetada negativamente devido à função exercida durante sua jornada de trabalho. Desta forma, mesmo que o ambiente ocupacional contenha substâncias químicas comprovadamente tóxicas para a saúde humana, como por exemplo, o agrotóxico, a saúde do trabalhador deveria estar sendo preservada com o uso de equipamentos de proteção e o correto treinamento de manuseio e aplicação destas substâncias.

### **I.1.2- Histórico da utilização de agrotóxicos:**

Na Antiguidade, substâncias de origem natural eram utilizadas com a finalidade de afastar pragas de plantações e de domicílios. Estas eram usadas sem ter o conhecimento técnico-científico do princípio ativo, mas era uma forma histórico-cultural passada entre gerações. Folha de fumo ou piretro foram largamente utilizadas de forma eficiente por longo período<sup>3</sup>.

A atividade agrícola ao longo da história sempre exerceu papel essencial para o desenvolvimento tecnológico, pois a necessidade de aumentar a produção fez com que investimentos fossem direcionados para tal atividade. Juntamente com o desenvolvimento da tecnologia instrumental, novas substâncias químicas foram sintetizadas, denominadas de agrotóxicos, para serem utilizadas no combate de pragas que comprometiam a produção agrícola. Assim, milhares de agrotóxicos foram e ainda são utilizados em larga escala para tal finalidade em nosso país e no mundo.

Agrotóxicos são definidos classicamente como: "... substâncias ou mistura de substâncias utilizadas na produção, colheita ou no armazenamento de alimentos. Eles são bioativos e capazes de prevenir, destruir ou combater espécies indesejáveis que, de alguma maneira, possam interferir na produção, no processamento, armazenamento, transporte e estocagem de alimentos, produtos agrícolas em geral, madeira e produtos derivados de madeira. Esta definição também compreende substâncias utilizadas no combate a insetos domésticos ou quaisquer agentes preventivos à ação de vetores de doenças que possam ser transmitidas ao homem ou animais domésticos como, por exemplo, febre amarela, dengue, doença de Chagas, malária, entre outras. Substâncias usadas como reguladoras no crescimento de plantas, agentes desfolhantes e dessecantes também são denominadas agrotóxicos"<sup>4</sup>.

Somente no século passado, com o crescimento da agricultura e o desenvolvimento tecnológico das indústrias, houve o interesse em investir e utilizar substâncias que tivessem ação mais rápida e ampla no combate a

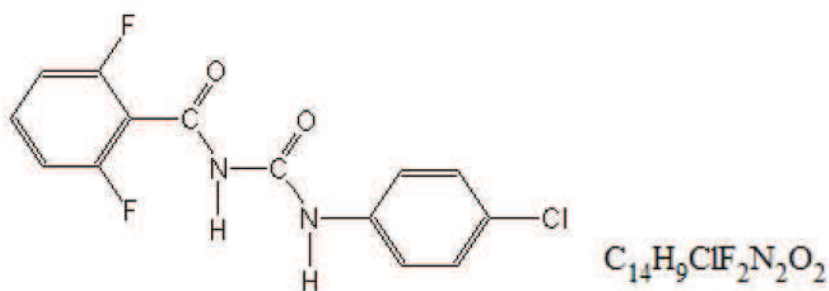
pragas e preservação das culturas plantadas. Desta forma, a indústria química sintetizou substâncias inorgânicas, tais como arsênio branco, fluoreto de cálcio, aceto arsenito de sódio (“*verde Paris*”), entre outras, que foram largamente utilizadas<sup>3</sup>.

Ao longo do tempo diversas outras substâncias foram formuladas, porém o grande marco na história do agrotóxico foi o desenvolvimento, durante a Segunda Guerra Mundial (1939), de uma substância com alto poder inseticida e que foi aplicada sobre plantações a fim de preservar o alimento cultivado e evitar o surgimento de pragas entre os soldados durante este período. Sua denominação é DDT [1,1,1-tricloro-2-bis-(p'-clorofenila)- etano], um organoclorado que possui um longo tempo de meia vida devido sua alta lipofilicidade e que atualmente está banido devido aos resultados de diversos estudos que comprovaram a alta toxicidade atrelada ao seu uso<sup>3</sup>.

Atualmente estima-se que, para uso exclusivo da agricultura, cerca de 600 princípios ativos estão sendo utilizados nas formulações vendidas mundialmente. Destes princípios registrados, aproximadamente 350 contribuem com 98% das composições mais utilizadas, sendo que o Brasil é o país que ocupa o primeiro lugar no *ranking* de consumo mundial de tais produtos, consumindo cerca de 5,4 bilhões de dólares nessas substâncias<sup>5</sup>, que possuem estruturas, modo de ação, biotransformação e eliminação distintas<sup>3</sup>.

### I.1.3- Diflubenzuron:

O diflubenzuron é caracterizado como um agrotóxico pertencente ao grupo químico das benzoiluréias e sua nomenclatura química é N-[[4-clorofenil)amino]carbonil]-2,6-difluorobenzamida ou 1-(4-clorofenil)-3-(2,6-difluorobenzoil) uréia<sup>6</sup>. Sua fórmula e estrutura química estão representadas na Figura 1.



**FIGURA 1.** Estrutura e fórmula química do diflubenzuron

Sua ação efetiva principal é a regulação do crescimento dos insetos que normalmente acometem a produtividade da agricultura, horticultura e silvicultura. Atualmente, sua efetividade é conhecida sobre as larvas dos insetos: *Lepidoptera*, *Coleoptera*, *Diptera*, *Hymenoptera*, dentre outros<sup>7</sup>.

Diflubenzuron ou Dimilin®, como é comercialmente conhecido, obteve o registro reconhecido em 1985, com a finalidade de agir como inseticida e acaricida em plantações de algodão, cogumelos, florestas e em plantas ornamentais<sup>8</sup>. A partir desta data, este agrotóxico vem sendo utilizado

amplamente e novos estudos toxicológicos têm sido realizados para definir o perigo e o risco que tal substância pode causar para as populações expostas.

O efeito inseticida se deve à inibição da síntese de quitina que é essencial para a formação do citoesqueleto do inseto. Assim, inibindo esse processo de síntese, o desenvolvimento da larva para mosquito fica comprometido e ocorre a paralisação do crescimento do inseto, levando desta forma, à morte do mesmo<sup>9</sup>.

#### **I.1.3.1- Utilização:**

Atualmente, no Brasil, o diflubenzuron é amplamente utilizado em campanhas de saúde pública para o controle de vetores de doença, principalmente do mosquito transmissor do vírus da dengue, o *Aedes aegypti*. Esta substância química veio a ser utilizada em substituição do larvicida Temephos e do adulticida Cipermetrina, que possuem uma toxicidade maior em exposições crônicas para os trabalhadores que os manipulavam, quando comparado ao diflubenzuron<sup>10</sup>. A formulação utilizada do diflubenzuron é sob a forma de pó na concentração de 25% e aplicado em containers ou pequenos recipientes residenciais que armazenam água<sup>11,12</sup>. Porém, na agricultura, a aplicação do diflubenzuron é realizada sob a forma de pequenas gotículas geradas através de sprays ou diretamente na água sob a forma de pó<sup>11</sup>.

Existem registros também da utilização do diflubenzuron em pisciculturas continentais amplamente desenvolvidas no sul e sudeste brasileiro. A finalidade



de tal substância aplicada tanto na ração alimentar como no meio aquático é evitar o desenvolvimento de parasitos de peixe, que comprometem a criação e a qualidade dos pescados<sup>13</sup>.

### **I.1.3.2- Rotas de exposição:**

Para a população em geral, os resíduos de diflubenzuron presentes na água, alimentos e na residência após a aplicação estão em quantidade não significativa, logo apresentam baixo risco<sup>14</sup>. Porém, para os trabalhadores que manipulam rotineiramente o diflubenzuron, os cenários são diferentes devido ao fracionamento do produto concentrado, à aplicação do produto diluído, sendo que a forma de spray é a mais perigosa, e a convivência com os depósitos com pouca circulação de ar que armazenam tal substância. Desta forma, o risco é elevado e diferenciado, devendo assim ser avaliado de forma específica e rigorosa<sup>15</sup>.

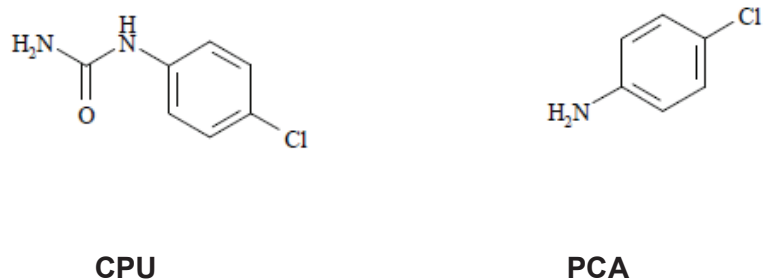
A importância de analisar a exposição ocupacional se faz presente para toda e qualquer substância química utilizada no desenvolvimento do trabalho ou gerada por tal, sendo esta uma das principais causas de ocorrência de diversas patologias em trabalhadores<sup>16</sup>.

### I.1.3.3- Toxicocinética:

A toxicocinética do diflubenzuron como absorção, distribuição, biotransformação e excreção foi estudado em ratos através da análise do percurso desta substância marcada com carbono 14 (C<sub>14</sub>), que foi administrada em doses únicas (exposição aguda) ou em doses múltiplas (exposição crônica). A avaliação permitiu a observação que a absorção parcial ocorre a partir do trato gastrointestinal e a excreção ocorre preferencialmente pela bile, quando a exposição for considerada aguda. Quando a exposição é crônica, encontra-se uma pequena parte desta substância e metabólitos na urina e cerca de 80 % nas fezes<sup>8</sup>.

Quanto ao processo de bioacumulação, tal substância não fica retida nos tecidos devido sua baixa lipofilicidade, sendo que sua maior persistência, cerca de 48 horas, foi encontrada nos eritrócitos e fígado<sup>8</sup>.

No processo de biotransformação, dez metabólitos foram identificados, sendo a *p*-cloroanilina (PCA) e *p*-clorofeniluréia (CPU) (Figura 2) os de maior importância quanto à toxicidade e juntos representam 2% da dose administrada<sup>8</sup>.



**FIGURA 2.** Estrutura química dos metabólitos CPU e PCA

A excreção da substância inalterada ocorre através das fezes enquanto que os seus metabólitos são eliminados pela via urinária. Assim, a análise para a detecção de tais substâncias tende a ser diferenciada conforme o objetivo do que se deseja detectar<sup>8</sup>.

#### **I.1.3.4- Toxicidade:**

Segundo estudos, a toxicidade aguda pela via oral, dérmica ou inalatória do diflubenzuron é baixa, logo, sua classificação toxicológica é classe IV, isto é, referente a substâncias pouco ou muito pouco tóxicas<sup>11</sup>. Porém, não existe relato de classificação pela Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC).

Porém, com o atual uso intenso dos agrotóxicos, somente é possível observar seus possíveis efeitos carcinogênicos e mutagênicos após uma exposição ocorrida por um longo período a baixas doses, denominada de exposição crônica<sup>17</sup>. Com relação à exposição crônica, não há estudos

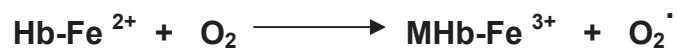
publicados na literatura com o diflubenzuron que gera o enfraquecimento na confiabilidade da classificação deste frente aos seus possíveis efeitos a longos períodos de exposição. Sendo assim, tal categorização pode ser considerada falha uma vez que se desconhece o real efeito do agrotóxico sobre o ser humano.

O principal efeito tóxico do diflubenzuron relatado na literatura em animais de experimentação é a formação de sulfemoglobina e metemoglobina, que são utilizados como indicativos de alteração da homeostasia do organismo em estudo. Estudos sugerem que a formação de metemoglobina ocorre devido à presença do metabólito *p*-cloroanilina (PCA), principalmente quando a exposição ocorre pela via inalatória e oral<sup>14</sup>. Desta forma, este pigmento sanguíneo (MHb) pode ser utilizado como um biomarcador de efeito, isto é, ele age como um indicador biológico que permite inferir uma correlação entre a intensidade da exposição e/ou o efeito biológico do diflubenzuron sobre o ser humano<sup>18</sup>.

#### **I.1.4- Metemoglobina:**

A metemoglobina (MHb) é um pigmento da hemoglobina resultante da ação de substâncias que induzem a oxidação de um dos átomos de ferro que está na composição da hemoglobina, do estado ferroso ( $\text{Fe}^{+2}$ ) para o férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ), conforme a reação mostrada na Figura 3. Sob esta forma, o transporte gasoso no sangue fica comprometido, pois a MHb não consegue se ligar ao

oxigênio, ao gás carbônico ou ao monóxido de carbono devido ao estado de oxidação +3. Além disso, há a formação de um subproduto, o superóxido ( $O_2^-$ ) que é uma espécie reativa de oxigênio, tendo grande importância em diversos processos fisiopatológicos<sup>19</sup>.



**FIGURA 3.** Reação de formação natural de metemoglobina (MHb) no organismo

Este pigmento é produzido naturalmente no organismo durante o processo de auto-oxidação, de forma lenta e consistente, presente em quantidades iguais ou inferiores a 2% de hemoglobina total<sup>17</sup>. Em alguns indivíduos, esses valores basais de metemoglobina podem se apresentar de forma elevada, devido a<sup>20</sup>:

- Problema hereditário que leva à formação de hemoglobinas anormais com formação de eritrócitos retores que promovem mais oxidação do que redução e que se rompe mais facilmente devido ao acúmulo de metemoglobina em seu interior;
- Deficiência na enzima metemoglobina redutase;
- Exposição a algumas substâncias exógenas que promovem o aumento da porcentagem de metemoglobina no organismo humano, como por exemplo, analgésicos, quimioterápicos,

nitratos e nitritos, anilinas, naftaleno, nitrobenzenos, nitroglicerinas, entre outros<sup>21</sup>.

Assim, com os níveis basais elevados, o sistema de redução presente no organismo (o do ácido ascórbico, o da glutathione reduzida e da metemoglobina reductase)<sup>20</sup> não é capaz de reduzir a metemoglobina em hemoglobina, levando a desfechos relacionados com a porcentagem de metemoglobina formada, conforme demonstrado na Tabela 1<sup>22</sup>.

**TABELA 1.** Relação da concentração da Metemoglobina com os sintomas em seres humanos (Adaptado<sup>23</sup>)

<b>Concentração de MHb</b>	<b>Sintomas</b>
10-20 %	Geralmente bem toleradas, mas já com coloração cianótica visível.
20-25 %	Podem causar com cefaléia, dispnéia, fotofobia, cansaço, confusão mental, taquicardia, palpitações e dor torácica.
> 55 %	Provocam deterioração acentuada do estado de consciência, arritmias cardíacas, acidose, isquemia neurológica e choque cardiogênico.
> 70 %	Geralmente fatais.

## I.2- Referencial Teórico:

Na literatura, estudos científicos buscando a relação da exposição ocupacional com os desfechos em saúde não foram encontrados e, devido a isso, somente estudos realizados em animais quanto à exposição foram utilizados para fundamentar o presente estudo.

Segundo o *Memorandum* USA-EPA (2007), os estudos realizados demonstram que este agrotóxico e seus metabólitos não aumentam a suscetibilidade de ratos e coelhos quando a exposição ocorre no período gestacional ou pós natal, informando assim, um baixo risco para lactentes e crianças. Já em estudos subcrônico e crônico em animais, a toxicidade se deve à formação de metemoglobina promovida provavelmente pelo metabólito PCA, principalmente pela via inalatória e oral<sup>14</sup>.

Quanto à alteração do desenvolvimento e reprodução em ratos e coelhos, indicam que o diflubenzuron possui um risco de efeito adverso muito baixo ou inexistente. Em um dos estudos, uma dose limite de  $1000 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  foi administrada e não foram observadas alterações nas duas espécies, mas foi possível concluir que os efeitos reprodutivos na prole ocorreram em doses mais elevadas do que as doses necessárias para produzir efeitos sobre a reprodução e desenvolvimento dos pais<sup>14</sup>.

Realizando um estudo de exposição aguda via dérmica em ratos em um período de 21 dias foi calculado o NOAEL para tal substância, que é de  $500 \text{ mg.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  e o LOAEL de  $1000 \text{ mg.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ . Para um período de médio

prazo de 91 dias outro estudo foi realizado com cães avaliando outra via de exposição, a oral, e os resultados permitiram um cálculo de NOAEL de  $2 \text{ mg.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  e LOAEL  $6,24 \text{ mg.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  e para uma exposição crônica por via oral esses valores passam a para  $2 \text{ mg.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$  e  $10 \text{ mg.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ , respectivamente. Assim, definiu-se a dose de referência (DRf) como sendo  $0,02 \text{ mg.Kg}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ . Já para a análise da via inalatória, um estudo utilizou ratos por um período de curto e médio prazo de 28 dias e obteve NOAEL de  $0,109 \text{ mg.L}^{-1}$  e LOAEL de  $0,12 \text{ mg.L}^{-1}$ .

A margem de segurança é um índice que relaciona NOAEL com a exposição real (NOAEL/Exposição real) e para exposição ocupacional analisada nesse estudo no qual os fatores de incerteza utilizados para a ponderação foi 100 (resultado da multiplicação de um fator 10 oriundo da extrapolação interespécie e outro fator 10 oriundo da variabilidade existente entre os animais). A margem de segurança possui valores menores de 100, isto é, são valores preocupantes, pois a exposição está a acima da dose de referência. Todos esses resultados tomaram como parâmetro de efeito adverso a alteração significativa de metemoglobina<sup>14</sup>.

As tabelas 2 e 3 abaixo apresentam alguns estudos realizados e publicados pela USA-EPA, que foram utilizados para a estruturação do *Memorandum USA-EPA 2007*<sup>14</sup>. Estas tabelas apresentam os estudos voltados para a toxicidade aguda à crônica realizada em mamíferos.



**TABELA 2.** Estudos do perfil toxicológico do diflubenzuron com base na exposição aguda, irritação e sensibilização

<b>Espécie</b>	<b>Teste</b>	<b>Resultado</b>	<b>Referência</b> (apud <sup>14</sup> )
Rato (macho e fêmea)	Oral	DL <sub>50</sub> > 5000 mg.Kg <sup>-1</sup>	KOOPMAN 1984a
Rato e camundongo (macho e fêmea)	Oral	DL <sub>50</sub> > 4640 mg.Kg <sup>-1</sup>	ELDIK, VAN 1973
Camundongo (macho e fêmea)	Oral	DL <sub>50</sub> > 4640 mg.Kg <sup>-1</sup>	KOOPMAN 1977
Rato (macho e fêmea)	Dérmico	DL <sub>50</sub> > 2000 mg.Kg <sup>-1</sup>	KOOPMAN 1984b
Rato	Dérmico	DL <sub>50</sub> > 10000 mg.Kg <sup>-1</sup>	KEET 1976
Rato (macho e fêmea)	Inalação	CL <sub>50</sub> > 2490 mg.m <sup>-3</sup>	GREENOUGH, MCDONALD 1986
Rato	Inalação	CL <sub>50</sub> > 2900 mg.m <sup>-3</sup>	BERCZY <i>et al.</i> 1973
Coelho (macho e fêmea)	Irritação cutânea	Sem irritação	KOOPMAN, 1984c
Coelho (macho e fêmea)	Irritação ocular	Leve irritação	KOOPMAN, 1984d
Porco	Sensibilização cutânea	Sem sensibilização	PRINSEN, 1992

Fonte: MEMORANDUM USA-EPA, 2007

**TABELA 3.** Estudos do perfil toxicológico do diflubenzuron com base na exposição subaguda à crônica

<b>Espécie</b>	<b>Teste</b>	<b>Resultado</b>	<b>Referência</b> (apud <sup>14</sup> )
Camundongo	Oral 6 semanas	NOAEL= 2,0 mg.kg <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup>	HUNTER <i>et al.</i> , 1974
Camundongo	Oral 90 dias	NOAEL= 7,1 mg.kg <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup>	BURDOCK <i>et al.</i> , 1980 <sup>a</sup>
Camundongo	Oral 14 semanas	NOAEL= 10,4 mg.kg <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup>	COLLEY <i>et al.</i> , 1981
Rato	Oral 28 dias	LOEL= 84 mg.kg <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup>	PALMER <i>et al.</i> , 1977
Rato	Oral 90 dias	NOAEL= 21,6 mg.kg <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup>	KKEMP <i>et al.</i> , 1973 a,b
Rato	Oral 90 dias	NOAEL= 12,6 mg.kg <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup>	BURDOCK <i>et al.</i> , 1980b
Rato	Oral 9 semanas	LOEL= 1000 mg.kg <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup>	HUNTER <i>et al.</i> , 1979
Cachorro	Oral 90 dias	NOAEL= 0,84 mg.kg <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup>	CHESTERMAN <i>et al.</i> , 1974
Cachorro	Oral 90 dias	NOAEL= 4 mg.kg <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup>	VERSENDAAL <i>et al.</i> , 1983
Cachorro	Oral 1 ano	NOAEL= 2 mg.kg <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup>	GREENOUGH <i>et al.</i> , 1985
Rato	Inalação 28 dias (1 hr.dia <sup>-1</sup> )	NOAEL= 0,12 mg.L <sup>-1</sup> (real)	BERCZY <i>et al.</i> , 1975a

<b>Espécie</b>	<b>Teste</b>	<b>Resultado</b>	<b>Referência</b> (apud <sup>14</sup> )
Coelho	Inalação 21 dias (1 hr.dia <sup>-1</sup> )	NOAEL= 0,15 mg.L <sup>-1</sup> (real)	BERCZY <i>et al.</i> , 1975b
Rato	Inalação 28 dias (6 hr.dia <sup>-1</sup> )	NOAEL= 34 mg.m <sup>-3</sup> (real)	NEWTON, 1999
Coelho	Percutânea 21 dias	NOAEL= 150 mg.kg <sup>-1</sup> .dia <sup>-1</sup>	DAVIES <i>et al.</i> , 1975 <sup>a</sup>
Coelho	Percutânea 21 dias	Não estabelecido	DAVIES <i>et al.</i> , 1975b
Rato	Percutânea 21 dias	NOAEL= 20 mg.Kg <sup>-1</sup>	GOLDENTHAL, 1996
Rato	Alimentar 104 semanas, carcinogenicidade	NOAEL = 1,43 mg.Kg <sup>-1</sup> (machos) e 1,73 mg.Kg <sup>-1</sup> (fêmeas)	HUNTER <i>et al.</i> , 1976
Rato	Alimentar 104 semanas, carcinogenicidade	LOAEL= 7,8 mg.Kg <sup>-1</sup>	BURDOCK <i>et al.</i> , 1984
Camundongo	Alimentar 80 semanas, carcinogenicidade	> 7,4 mg.Kg <sup>-1</sup>	HUNTER <i>et al.</i> , 1975
Camundongo	Alimentar 91 semanas, carcinogenicidade	NOAEL = 2,4 mg.Kg <sup>-1</sup>	COLLEY <i>et al.</i> , 1984
Rato	3 gerações parental e toxicidade reprodutiva	NOAEL = 8 mg.Kg <sup>-1</sup>	PALMER & HILL, 1975a
Rato	1 geração toxicidade reprodutiva	NOAEL = 50 mg.Kg <sup>-1</sup>	PALMER <i>et al.</i> , 1978

<b>Espécie</b>	<b>Teste</b>	<b>Resultado</b>	<b>Referência</b> (apud <sup>14</sup> )
Rato	2 gerações toxicidade reprodutiva	NOAEL para função reprodutiva = 2500 mg.Kg <sup>-1</sup>	BROOKER, 1995 a,b
Rato	Teratogenicidade	Taxa de gravidez sem alteração	PALMER & HILL, 1975b
Rato	Teratogenicidade	Sem alteração para a mãe e o feto para 1000 mg.Kg <sup>-1</sup>	KAVANAGH, 1987
Coelho	Teratogenicidade	Taxa de gravidez sem alteração	PALMER & HILL, 1975c
Coelho	Teratogenicidade	NOAEL para mãe e feto = 1000 mg.Kg <sup>-1</sup>	KAVANAGH, 1987b

Fonte: MEMORANDUM USA-EPA, 2007

A classificação toxicológica do diflubenzuron (Classe IV) se deve a estudos realizados em animais resultantes de uma exposição aguda. Logo, tal classificação não representa os efeitos reais quando a exposição passa a ser crônica, como é o caso da exposição ocupacional. Sendo assim, o desenvolvimento de novos estudos em humanos, que relacionem os possíveis desfechos oriundos da exposição crônica ao diflubenzuron, se faz necessário devido ao aumento da utilização deste agrotóxico em campanhas de saúde pública.

Além disso, esses estudos poderão contribuir como uma ferramenta analítica, visto que servirão como suporte para a implementação desta

metodologia nos laboratórios públicos que atualmente são carentes de procedimentos que realizam a avaliação de formação de metemoglobina por exposição a diversas substâncias.

## **CAPÍTULO II: OBJETIVOS**

## **II.1- Objetivo Geral**

Avaliar a exposição ao diflubenzuron através da análise do biomarcador (metemoglobina no sangue) nos trabalhadores de campanhas públicas ao combate da dengue (FUNASA).

## **II.2 – Objetivos Específicos**

- Otimizar a técnica de dosagem de metemoglobina;
- Caracterizar a exposição ao Diflubenzuron, assim como as principais vias de introdução do xenobiótico;
- Avaliar a aplicabilidade da análise da metemoglobina como biomarcador de efeito na exposição ocupacional ao diflubenzuron em trabalhadores de campanhas públicas ao combate da dengue (FUNASA).

## **CAPÍTULO III: METODOLOGIA**



### **III.1- Metodologia do estudo:**

Este estudo faz parte do projeto “Doenças neurológicas nos trabalhadores expostos cronicamente a agrotóxicos no estado do Rio de Janeiro: o estudo dos guardas de endemias”, que está sendo realizado no CESTEH e obteve aprovação pelo Comitê de Ética da ENSP (Parecer nº 333/11, CAAE: 0351.0.031.000-1). A identificação e quantificação da exposição ao diflubenzuron através da análise de metemoglobina no sangue, proposta nesta dissertação, é um dos objetivos específicos do projeto citado acima, e a metodologia a ser utilizada ocorreu em dois momentos distintos:

1. A captação de informações importantes sobre a população de estudo através da utilização de um questionário aplicado no momento da consulta realizada pelo médico neurologista do setor de neurotoxicologia do CESTEH;

2. A realização de uma segunda entrevista mais específica juntamente com a coleta de sangue para análise laboratorial, com o objetivo de dosagem do nível de metemoglobina de cada indivíduo antes e depois da exposição.

#### **III.1.1 - Desenho do estudo:**

O desenho utilizado para o estudo é seccional do tipo “*case crossover*”, no qual os trabalhadores que obtiverem níveis de metemoglobina elevado (casos) terão como controle eles mesmos, antes do período crítico da exposição, no caso a jornada de trabalho diária. As informações analisadas são correspondentes ao específico momento da intervenção, sem ter a possibilidade de afirmar ocorrências anteriores e nem de promover previsões

de desfechos futuros. O estudo tentará promover a associação da exposição ocupacional atual com os desfechos que serão quantificados e os que são relatados.

### **III.1.2- População alvo:**

Para o desenvolvimento da pesquisa, a população de estudo selecionada foi composta por guardas de endemias da Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) que exercem suas funções na região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro.

Os indivíduos pertencentes a esse grupo aptos a participar do estudo foram aqueles que atenderam ao critério de elegibilidade de estar em contato com o Diflubenzuron durante a execução das suas atividades ocupacionais, independentemente da via de introdução do mesmo.

Foram considerados inaptos para a participação no estudo os indivíduos que não tiveram contato com o Diflubenzuron e os trabalhadores que no momento da entrevista não tiveram condições de responder ao questionário aplicado. Além desses, também foram excluídos os indivíduos com doenças hematológicas que possam comprometer a quantificação e a interpretação do indicador de efeito e os indivíduos que estavam fazendo uso de medicamentos sabidamente metemoglobinizantes.

### **III.2- Coleta de informações:**

No momento da consulta, o trabalhador respondeu um questionário semi estruturado, elaborado pelo médico-neurologista e aplicado pelo tal, com o objetivo de obtenção de informações essenciais para caracterizar a exposição e obter associações com o mínimo de influência das variáveis de confundimento; promover a definição do perfil de utilização de equipamentos de proteção individual (EPI) durante a jornada de trabalho; obter com precisão e qualidade sintomas relevantes para ser possível uma futura associação exposição-desfecho; e por fim, caracterizar o risco em que estes trabalhadores estão submetidos no ambiente de trabalho.

No segundo contato, o trabalhador respondeu outro questionário semi estruturado mais específico, com informações essenciais para a completa e correta análise da metemoglobina, como por exemplo, alimentação e uso de medicamentos. Juntamente com a obtenção dessas informações, uma alíquota de aproximadamente 4 mL de sangue foi coletada para análise laboratorial.

### **III.3- Amostra biológica e sua coleta:**

As amostras de sangue para a dosagem de metemoglobina foram coletadas por punção venosa com seringa ou *vacuntainer* em tubos heparinizados. É recomendado realizar a análise no período de até duas horas, pois passado esse período os resultados podem não corresponder ao valor real, visto que a metemoglobina presente nos eritrócitos sofre ação da metemoglobina redutase e retorna para a forma de hemoglobina<sup>24</sup>. Porém, um

estudo que buscou investigar a estabilidade da MHb observou que se o sangue hemolisado e tamponado fosse armazenado sob uma temperatura de 2°C por no máximo 24 horas, o processo de auto-oxidação da hemoglobina seria praticamente zero, logo o valor medido da MHb era o mesmo do que o sangue analisado após a coleta, sem comprometer a fidedignidade do resultado<sup>25</sup>.

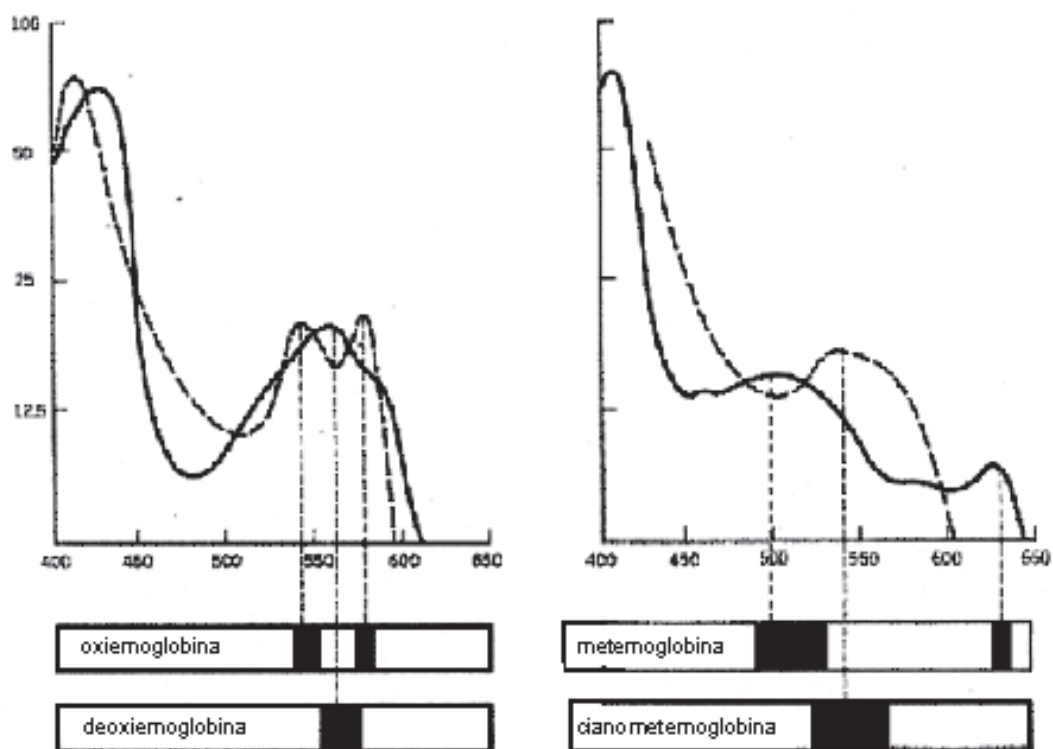
A coleta ocorreu em dois momentos: antes da exposição, isto é, pela manhã antes do início das atividades diárias, a fim de estabelecer o nível basal de metemoglobina de cada indivíduo, e a segunda realizada no mesmo dia, após a jornada de trabalho (pós-exposição) para a verificação se houve ou não alteração desses níveis. Assim, é possível testar a hipótese de associação entre exposição e desfecho e afastar possíveis efeitos das variáveis de confundimento nessa associação, como a alteração do nível basal devido ao contato com substâncias metemoglobinizantes.

#### **III.4- Metodologia de análise:**

A metodologia empregada para análise de metemoglobina foi descrita primeiramente por Evelyn-Malloy (1938)<sup>26</sup>, posteriormente foi modificada por J. Meunier (1972) e atualizada por Carrazza (1998)<sup>20</sup>, na qual a dosagem de metemoglobina no sangue venoso é realizada através do espectrofotômetro no visível.

Essa técnica se fundamenta no princípio que os pigmentos sanguíneos oxiemoglobina, deoxiemoglobina, metemoglobina e cianometemoglobina, possuem absorção máxima em comprimentos de ondas semelhantes, mas

cada pigmento têm picos de absorção menores, porém significativos em diferentes comprimentos de onda, conforme representado na Figura 4.



**FIGURA 4.** Representação da absorção dos pigmentos sanguíneos nos diferentes comprimentos de onda<sup>27</sup>

A metemoglobina possui uma absorção pequena, porém exclusiva no comprimento de onda de 630 nm, obtendo-se neste  $\lambda$  uma absorvância proporcional à concentração de metemoglobina na amostra.

Na tentativa de anular a ação de outros pigmentos interferentes presentes no sangue, como por exemplo, carboxiemoglobina e sulfemoglobina, quatro leituras são realizadas.

A primeira leitura ( $A_1$ ) a ser efetuada na amostra que foi tratada (Solução de Triton-X 1% v/v e Solução de Tampão Fosfato Dibásico de Sódio  $0,01\text{mol.L}^{-1}$  pH 6,80 e posterior centrifugação) é sem alteração da composição dos pigmentos sanguíneos presentes na amostra. A segunda leitura ( $A_2$ ) é realizada na amostra anteriormente descrita com adição de cianeto de potássio, que levará a transformação da metemoglobina à cianometemoglobina, que nesse comprimento de onda possui uma absorvância mínima. Desta forma, o valor observado é resultante dos pigmentos residuais da hemoglobina, e a diferença da primeira leitura com a segunda fornecerá a real proporção da concentração de metemoglobina presente na amostra.

A terceira leitura ( $A_3$ ) a ser realizada será de uma alíquota da amostra tratada com uma solução de ferricianeto de potássio, que ao contato com a hemoglobina promove a oxidação do ferro levando a formação de metemoglobina que fornecerá um valor de absorvância. A esta é acrescida uma solução de cianeto de potássio para novamente promover a leitura residual de outros pigmentos da hemoglobina, que será denominada como quarta leitura ( $A_4$ ). A diferença entre a terceira e quarta leitura é proporcional a concentração da metemoglobina gerada "*in vitro*".

Assim, com a obtenção desses valores, é possível aplicar a fórmula representada pela Figura 5 para estimar a porcentagem de metemoglobina presente na amostra de cada trabalhador e concluir se tais níveis estão conformes ou não com o preconizado pela NR-07 ( $< 2\%$ )<sup>28</sup>.

$$\text{Porcentagem de Metemoglobina} = \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4} \times 100$$

**FIGURA 5.** Cálculo da porcentagem de metemoglobina presente na amostra

Para obter a real alteração do indicador de efeito frente à exposição, foi realizado um cálculo no qual o valor percentual da metemoglobina encontrado na amostra coletada antes a exposição foi subtraído do valor encontrado da amostra adquirida após a exposição (% Mhb<sub>Depois</sub> - %Mhb<sub>Antes</sub>). Este cálculo se faz necessário, uma vez que o controle adotado para o estabelecimento da exposição foi a taxa basal do trabalhador no período anterior à realização de suas atividades ocupacionais.

#### **III.4.1- Otimização da metodologia de análise:**

Na etapa de otimização da metodologia, diversas condições de armazenamento e análise foram testadas a fim de facilitar a execução do processo.

A primeira condição testada foi na etapa de hemólise dos eritrócitos e sedimentação de fragmentos que interferem na leitura, realizada através da

centrifugação durante o preparo da amostra. A rotação por minuto (rpm) preconizada na metodologia<sup>26,27</sup> é de 10000 rpm, mas nesta etapa foram testadas rotações de 3000 rpm (“centrífuga clínica”) e de 6000 rpm. Foi mantido o tempo de rotação de 15 minutos para as três condições analisadas.

A proposta de mudança acima se justifica pelo fato de que a probabilidade de que um laboratório de análises clínicas tenha acesso a uma centrífuga com capacidade de rotação por minuto de 10000 é pequena devido ao seu alto custo e o espaço elevado ocupado por ela.. Assim, possibilitando a utilização de outras centrífugas sem comprometer o resultado, a metodologia se torna mais facilmente aplicável na rotina laboral para análise de exposição a substâncias químicas.

A outra condição a ser otimizada é o tempo entre a coleta de sangue e a leitura da amostra para a determinação de metemoglobina, que segundo a metodologia utilizada como referência<sup>26,27</sup> não poderia exceder duas horas. Porém, outro estudo<sup>25</sup> descrito na literatura possibilitou a análise em até 24 horas após a coleta, quando a amostra é mantida à 2°C até o momento da análise.

Assim, um estudo foi elaborado para testar as condições de armazenamento e o tempo entre a coleta e a análise. Foram testados a armazenagem do sangue sob forma coletada, ou seja, com apenas heparina e do sangue processado na centrífuga com a solução hemolisante (Solução de Triton-X 1% v/v e Solução de Tampão Fosfato Dibásico de Sódio 0,01mol.L<sup>-1</sup> pH 6,80) em temperatura ambiente (média de 20°C) e sob refrigeração (média



de 4 °C). Para as amostras descritas acima foram testados os tempos de 0, 2, 4, 6, 24, 48 horas entre a coleta e a leitura no espectrofotômetro.

A justificativa para alterar esse parâmetro na metodologia se deve à limitação operacional com relação ao tempo, visto que entre a coleta, processamento e a leitura da amostra é recomendado não ultrapassar o tempo de duas horas. Assim, para promover uma avaliação de um quantitativo elevado de amostras ou se o local de coleta de amostra estiver a uma certa distância do laboratório em que a metemoglobina será dosada, a metodologia de referência preconizada se torna limitada e de difícil aplicação, visto que não contempla o escopo que objetiva realizar.

Para promover a comparação dos resultados obtidos nos experimentos acima descritos foi utilizado ANOVA: fator único com nível de significância de 95%. Essa análise é uma ferramenta presente no pacote de análises de dados disponibilizados pelo Microsoft Office Excel 2007<sup>®</sup>.

Para avaliar a influência de outros parâmetros sobre a aplicabilidade da metodologia, foi planejada uma sequência de experimentos que alteravam duas variáveis ao mesmo tempo, análise multivariada - DCCR (Delineamento Composto Central Rotacional)<sup>29</sup> em cinco níveis, sendo elas os volumes das soluções (entre 5 e 25 µL) de cianeto de potássio a 5% e ferricianeto de potássio a 5% que são utilizadas no momento das leituras para a formação de cianometemoglobina e 100% de metemoglobina, respectivamente.

Para a construção do plano fatorial, todas as combinações experimentais foram implementadas pela variação entre as condições definidas pelos valores normalizados de cada uma das duas variáveis, entre -1 e +1, que permitem identificar efeitos lineares e interação das variáveis sobre a resposta, incluindo condições nos pontos estrela (-1,41 e +1,41), que permitem avaliação de efeitos quadráticos, e adição de repetições do valor zero, relativo à condição do ponto central (0), que corresponde ao valor intermediário entre os níveis superior e inferior<sup>29</sup>. Através da utilização de variáveis normalizadas, seus efeitos podem ser comparados sem que sofram influência da amplitude dos valores reais correspondentes aos níveis superior e inferior, permitindo, desta forma, identificar aqueles com maior influência sobre a resposta avaliada. Os ensaios relativos à condição do ponto central foram realizados de forma a determinar o erro experimental e avaliar a linearidade dos efeitos das variáveis independentes sobre a resposta, sendo sua triplicata utilizada para calcular as médias e desvio padrão. Este planejamento foi estruturado com o auxílio do programa estatístico denominado STATISTICA 9.1 (Statsoft, USA).

Para a realização de tais experimentos foi utilizado como material de referência o sangue de um voluntário, do qual os valores de metemoglobina já são conhecidos devido a uma sequência de análises de seu material biológico, em dias variados.

### **III.4.2- Validação da metodologia de análise:**

Para a realização da validação, primeiramente foram buscados guias normativos que orientassem a realização da mesma, visto que a presente metodologia é um ensaio bioanalítico.

Foram buscados tanto em âmbito nacional quanto internacional documentos que definam parâmetros e critérios específicos para validação de métodos bioanalíticos, uma vez que os parâmetros clássicos existentes para validação de ensaios analíticos não se aplicam nesta metodologia.

Além disso, para a realização da validação foram buscados materiais de referência certificados da matriz biológica, que neste caso é sangue, para que se trabalhasse durante tal processo com material de composição garantidamente conhecida e livre de qualquer interferente.

### **III.4.3- Análises Estatísticas:**

Para a avaliação dos resultados obtidos foram utilizados programas e métodos estatísticos que tem por objetivo auxiliar a interpretação dos valores gerados em cada análise. Desta forma, para promover a comparação dos dados obtidos nos experimentos da otimização da metodologia foi utilizado ANOVA: fator único com nível de significância de 95%. Essa análise é uma

ferramenta presente no pacote de análises de dados disponibilizados pelo Microsoft Office Excel 2007<sup>®</sup>.

Já para a realização do planejamento experimental que propôs a variação dos volumes das soluções segundo a construção de um plano fatorial com as variáveis normalizadas foi utilizado o programa estatístico denominado STATISTICA 9.1 (Statsoft, USA).

Quanto o cálculo para a determinação de valores aberrantes como *outliers*, foi realizado através do cálculo abaixo e a partir dos valores obtidos foi possível estabelecer um intervalo de confiança a 95% e os valores que não estavam compreendidos nestes limites não foram incluídos nas análises estatísticas dos resultados finais.

$$\bar{x} \pm 2x SD$$

Com os resultados finais das análises na população exposta, o grupo que apresentou variação positiva dos níveis de metemoglobina foram selecionados e analisados a fim de obter com maior detalhamento o comportamento somente desta variável e também a sua relação com as outras que poderiam exercer influência sobre o nível deste pigmento sanguíneo. Primeiramente foi investigado qual era a distribuição dos resultados através do teste Shapiro-Wilk e estes apresentaram uma distribuição normal, o que permitiu aplicação de testes paramétricos. Desta forma, foi promovido o teste estatístico descritivo denominado Correlação de Pearson que mede o grau da

correlação entre duas variáveis e a direção desta com significância estatística de 95%.

## **CAPÍTULO IV: RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **IV.1- Otimização da metodologia de análise:**

##### **IV.1.1- Avaliação da velocidade de centrifugação:**

O estudo de comparação entre as rotações utilizadas no processamento da amostra foi realizado em dois momentos distintos. No primeiro momento, o estudo visou comparar a eficácia da centrífuga clínica frente a esta análise, de mais fácil acesso em diversos laboratórios de análises clínicas, que permite obter 3000 rotação por minuto, com a centrífuga de grande porte que possibilita alcançar uma rotação de 10000 rpm e normalmente possui a opção de refrigeração, que neste experimento não foi utilizada. Os resultados estão descritos na Tabela 4.

**TABELA 4.** Resultados da centrifugação de alíquotas de uma mesma amostra submetidas a 3000 e 10000 rpm durante 15 minutos.

Percentual de Metemoglobina		
Nº de Réplicas	3000 rpm	10000 rpm
1ª	0,84	0,35
2ª	0,90	0,12
3ª	1,30	0,24

**Anova: fator único**

RESUMO

Grupo	Contagem	Soma	Média	Desvio Padrão
3000 rpm	3	3,04	1,01	0,06
10000 rpm	3	0,71	0,24	0,01

**ANOVA**

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,90	3	0,30	3,98	0,21	19,16
Dentro dos grupos	0,15	2	0,08			
Total	1,05	5				

**SQ= Soma dos Quadrados. gl= Graus de Liberdade. MQ= Média dos quadrados (Variância)**

Foi possível observar que não houve uma diferença significativa entre os resultados obtidos, mostrando que a utilização da rotação por minuto de 3000



gera valores de absorvâncias estatisticamente semelhantes aos valores de 10000 rpm .

O segundo teste realizado teve como objetivo comparar a utilização da centrífuga de 6000 rpm com a de 10000 rpm, visto que a centrífuga de 6000rpm é de mais fácil acesso e manipulação do que a de 10000 rpm, no ambiente laboratorial onde o experimento descrito foi realizado. Os resultados obtidos nesta etapa do experimento estão apresentados na Tabela 5.

**TABELA 5.** Resultados da centrifugação de alíquotas de uma mesma amostra submetidas a 6000 e 10000 rpm durante 15 minutos.

Percentual de Metemoglobina		
Nº de Réplicas	6000 rpm	10000 rpm
1ª	0,50	0,57
2ª	1,23	0,52
3ª	0,61	0,22

**Anova: fator único**

RESUMO

Grupo	Contagem	Soma	Média	Desvio Padrão
6000 rpm	3	2,34	0,78	0,15
10000 rpm	3	1,31	0,44	0,04

**ANOVA**

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,18	3	0,06	0,31	0,82	19,16
Dentro dos grupos	0,38	2	0,19			
Total	0,56	5				

Os resultados gerados após a análise estatística dos dados permitiram a inferência de que o percentual de metemoglobina obtido não sofre mudança significativa do seu valor quando a rotação por minuto de 10000 é substituída pelo de 6000 rpm permanecendo com o tempo de centrifugação de 15 minutos.

Essa etapa de desenvolvimento permite alteração na metodologia para a utilização da centrífuga com menor capacidade rotacional. Desta forma, a análise pode ser executada em uma ampla faixa de laboratórios, visto que não exige equipamentos específicos.

#### **IV.1.2- Tempo e condições de armazenagem da amostra:**

Para avaliar o comportamento da amostra frente ao tempo entre a coleta e a análise e as condições de armazenagem, os outros parâmetros do experimento, como o tempo de centrifugação e a rotação, permaneceram como o preconizado na metodologia de referência<sup>26, 27</sup>, de 15 minutos e 10000 rpm, respectivamente.

Os resultados deste conjunto de experimentos estão resumidos na Tabela 6, na qual são descritas as condições de armazenamento testadas- temperatura ambiente e sob refrigeração- e o tempo entre a coleta e a análise- 0, 2, 4, 6, 24, 48 horas.

**TABELA 6.** Resultados da análise de alíquotas de uma mesma amostra submetidas a condições de armazenamento distintas e analisadas em diferentes momentos.

Percentual de Metemoglobina											
Nº de Replicatas	Após a coleta	Após 2 horas da coleta		Após 4 horas da coleta		Após 6 horas da coleta		Após 24 horas da coleta		Após 48 horas da coleta	
		A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1ª	0,57	0,85	0,54	0,35	0,65	0,58	0,71	0,44	0,27	0,34	0,49
2ª	0,52	1,08	0,31	0,41	0,88	0,79	0,64	0,4	0,49	0,5	0,61
3ª	0,22	0,38	0,57	0,3	0,74	0,42	0,44	0,35	0,72	0,34	0,21

**A = Temperatura ambiente**

**B = Sob refrigeração**

#### **Anova: fator único**

##### RESUMO

Grupo	Contagem	Soma	Média	Desvio Padrão
Coluna 1	3	1,31	0,44	0,04
Coluna 2	3	2,31	0,77	0,13
Coluna 3	3	1,42	0,47	0,02
Coluna 4	3	1,06	0,35	0,00
Coluna 5	3	2,27	0,76	0,01
Coluna 6	3	1,79	0,60	0,03
Coluna 7	3	1,79	0,60	0,02
Coluna 8	3	1,19	0,40	0,00
Coluna 9	3	1,48	0,49	0,05
Coluna 10	3	1,18	0,39	0,01
Coluna 11	3	1,31	0,44	0,04

##### ANOVA

Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	0,62	10	0,06	1,90	0,10	2,30
Dentro dos grupos	0,71	22	0,03			
Total	1,33	32				

Através deste conjunto de experimentos foi possível observar e concluir que as diferentes condições de armazenamento testadas não geram resultados com diferença significativa no percentual de metemoglobina presente no indivíduo testado.

Os resultados gerados permitem que a metodologia seja modificada, tornando a técnica menos laboriosa e menos custosa, visto que o tempo preconizado na metodologia de referência<sup>26,27</sup> (2 horas) limitava a logística do processo de coleta de amostra e análise desta no estudo descrito. Com isso, foi possível comprovar que a análise da amostra pode ser realizada em até 48 horas após a coleta sendo esta armazenada sob refrigeração ou sob temperatura ambiente.

#### **IV.1.3- Avaliação de outros parâmetros da metodologia de análise:**

Para avaliar os resultados de metemoglobina quando é promovida alteração de duas variáveis essenciais para a metodologia de análise, um conjunto de experimentos foi realizado promovendo a combinação destas em diferentes volumes, levando a diferentes concentrações, conforme o estabelecido pelo planejamento experimental DCCR em cinco níveis.

Desta forma, a Tabela 7 represente os volumes das soluções de cianeto de potássio e ferricianeto de potássio, a normatização das variáveis e os valores obtidos nesse experimento.

**TABELA 7.** Planejamento de experimentos de análise da metemoglobina variando os volumes das soluções de cianeto de potássio e de ferricianeto de potássio (usando valores reais e valores normalizados segundo representação estatística).

Experimento	KCN ( $\mu\text{L}$ )	$x_1$	$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ( $\mu\text{L}$ )	$x_2$	%MHb
1	8	-1	8	-1	1,27
2	8	-1	22	1	0,59
3	22	1	8	-1	0,80
4	22	1	22	1	0,76
5	15	0	15	0	0,86
6	15	0	15	0	1,15
7	15	0	15	0	0,84
8	15	0	15	0	1,07
9	5	-1,41	15	0	0,64
10	15	0	5	-1,41	0,83
11	25	1,41	15	0	0,97
12	15	0	25	1,41	0,65

Para a realização de tais experimentos foi utilizado como material de referência o sangue de um voluntário, do qual os valores de metemoglobina já são conhecidos devido a uma sequência de análises de seu material biológico, em dias variados.

Para tais resultados a média geral foi de 0,87 com desvio padrão de 15 %, podendo-se afirmar que as variáveis testadas não causam efeitos sobre a porcentagem de metemoglobina, pois todos os níveis testados de diferentes

volumes apresentam resultados similares considerando o erro experimental em torno de 15% e um intervalo de confiança de 95%.

A análise estatística dos efeitos da variação de cianeto de potássio e de ferricianeto de potássio sobre o percentual de metemoglobina mostrou baixo efeito da variação da metemoglobina em relação aos volumes das soluções de análise, como descrito no resultado acima. A função central do planejamento é de projetar o comportamento do experimento frente às possíveis combinações das variáveis avaliadas e gerar as melhores condições de análise após a inserção dos resultados dos experimentos propostos pelo programa frente as variáveis a serem analisadas.

Os resultados indicam que não há diferença estatisticamente significativa (com 95% de confiança) entre os volumes de reagentes testados, ou seja, os resultados para volume de KCN e de  $K_3Fe(CN)_6$  variando de 8 a 25  $\mu L$  são similares, indicando que o percentual de metemoglobina formada é similar em toda esta faixa de reação. Mediante tais resultados foi possível observar que o volume a ser adicionado das respectivas soluções, preconizado na metodologia oficial (25  $\mu L$ ), ultrapassa o volume necessário para promover as reações. Porém, esse excesso de reagente adicionado garante que o rendimento da reação seja 100%, evitando assim uma reação incompleta que poderá gerar um falso resultado.

Além disso, esse conjunto de experimentos permitiu a observação da robustez do método utilizado frente a variação na velocidade de rotação da centrífuga, tempo entre a coleta e análise da amostra e a variação dos volumes

das soluções de análise, pois independente dessas alterações, o valor permaneceu estatisticamente similar, mostrando assim que tal metodologia é forte o suficiente para gerar resultados verdadeiros frente a pequenas alterações que possivelmente possam ocorrer.

#### **IV.2- Validação da metodologia de análise:**

Para a determinação dos parâmetros de validação da metodologia a ser utilizada para a análise de metemoglobina foi realizada uma ampla busca de normas e/ou legislações nacionais e internacionais que norteiam o processo de validação de métodos bioanalíticos, ou seja, métodos que utilizem reativos biológicos, como por exemplo, enzima, ou tenha como matriz um composto de origem biológica.

A ANVISA publicou um documento denominado “Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos” que a priori abrangeria o método em questão devido a este se tratar de um método bioanalítico; porém o texto apenas contempla técnicas que objetivam a quantificação de fármacos ou metabólitos em sangue, urina e saliva, tais como cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e estas combinadas com espectrometria de massa (MS). Os outros documentos não contemplavam este tipo de ensaio que utiliza a matriz biológica para a determinação de parâmetros fisiológicos e nem tinham como escopo a validação deste tipo de análise<sup>30</sup>.

No âmbito internacional, também não foram encontrados guias, normas ou resoluções que direcionassem como o procedimento de validação fosse

executado. Apenas observou-se a existência de protocolos que definem a forma de aplicação de metodologias que utilizem reativos biológicos ou matrizes biológicas.

Seguindo no esforço de obter informações sobre a validação de tal metodologia, foi realizada uma busca para a aquisição de material de referência certificado para a matriz sangue. O objetivo era de se trabalhar com material sem interferentes e com a garantia do conhecimento de sua composição. No Brasil, existe um grande esforço científico para que se estimule o desenvolvimento tecnológico e a comercialização desses materiais, porém até o atual momento a única matriz que se tem registro desse avanço é a urina, que dentre as matrizes biológicas é a considerada a mais livre de interferentes.

Diante dos resultados obtidos nas revisões bibliográficas, os experimentos realizados foram baseados em parâmetros utilizados em procedimentos de validação para métodos analíticos<sup>31</sup>, tais como: especificidade e seletividade, precisão e exatidão. Porém, para a presente metodologia de análise, estes parâmetros estabelecidos não seriam necessários, visto que em análises clínicas o resultado do exame laboratorial de um indicador de efeito não é o determinante para o fechamento do diagnóstico, e sim o conjunto de sinais e sintomas avaliados pelo médico. Logo, os resultados obtidos nestes exames possuem uma ampla faixa de aceitabilidade, não sendo necessário o rigor acentuado para a obtenção do valor exato.



- *Especificidade e Seletividade*

A especificidade e seletividade foram obtidas através da correta seleção do comprimento de onda (630 nm), pois apenas a metemoglobina absorve significativamente a luz emitida nesse comprimento do espectro, enquanto os outros pigmentos sanguíneos como a oxiemoglobina, deoxiemoglobina e cianometemoglobina não possuem absorção representativa no espectrofotograma. Desta forma, a metodologia utilizada cumpre com seu objetivo de quantificar apenas o que é proposto em seu fundamento, ou seja, a metemoglobina.

- *Precisão*

A precisão do método é composta de três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade.

A repetibilidade ou precisão intra-corrída teve como objetivo a observação dos resultados obtidos em experimentos realizados em uma mesma amostra em um curto espaço de tempo, que no caso foi em um mesmo dia, conforme demonstrado na Tabela 8.

**TABELA 8.** Resultados das diferentes análises de metemoglobina realizada em momentos distintos em um dia de trabalho utilizando uma amostra única.

Experimentos	%MHb
1	0,44
2	0,77
3	0,47
4	0,35
5	0,76
6	0,60
7	0,60
8	0,40
9	0,49
10	0,39

Média= 0,53  
 Desvio Padrão= 0,15  
 Coeficiente de Variação= 28,3%

Observando os resultados acima não é possível afirmar que o método possui repetibilidade como preconizado na literatura<sup>32</sup>, pois o coeficiente de variação é superior a 20%. Porém, realizando o cálculo de *outlier* com um intervalo de confiança de 95%, foi possível observar que os resultados obtidos no experimento 2 e 5 são valores que estão fora da faixa determinada no intervalo de confiança e a exclusão deles não compromete a avaliação dos resultados restantes, mas o coeficiente de variação tem uma redução para o valor de 19,8% o que é considerado aceitável dentro dos critérios de validação adotados.<sup>32</sup>

Já a precisão intermediária ou precisão inter-corrída objetivou a avaliação do comportamento dos resultados quando as análises foram executadas em dias diferentes utilizando a amostra colhida do mesmo

voluntário a cada dia. Assim, a análise foi realizada em quinze (15) dias diferentes, como descrito na Tabela 9.

**TABELA 9.** Resultados das diferentes análises de metemoglobina realizada em dias diferentes de trabalho utilizando amostras coletadas do mesmo indivíduo.

Experimentos (dias)	%MHb
1	0,44
2	0,55
3	0,78
4	0,35
5	0,60
6	0,24
7	0,39
8	0,47
9	0,55
10	0,49
11	0,44
12	0,77
13	0,60
14	0,40
15	0,76

Média= 0,52
Desvio Padrão= 0,16
Coeficiente de
Variação= 30,8%

Através do cálculo de *outlier* foi determinado uma faixa de valores dentro de um intervalo de confiança de 95% e foi possível observar que os valores obtidos no experimento 3, 6, 12 e 15 podem ser considerados pontos foras dessa faixa, ou seja, a exclusão destes não comprometerá na fidedignidade

dos resultados obtidos, somente irá diminuir o erro dos meus dados experimentais.

O último nível avaliado foi a da reprodutibilidade ou precisão inter-laboratorial, cujo objetivo é observar a concordância dos resultados obtidos nos experimentos realizados em laboratórios distintos utilizando alíquotas de uma mesma amostra. Para isso, uma amostra de sangue foi dividida em dois frascos com volumes semelhantes. A primeira alíquota denominada como “A” foi analisada no Laboratório de Toxicologia no Setor de Agrotóxico do Centro de Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH) localizada na Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ). A segunda alíquota, “B”, foi devidamente acondicionada e transportada em até duas horas para o Laboratório de Toxicologia da Universidade Federal Fluminense (UFF) onde foi realizada a análise. A Tabela 10 descreve os resultados obtidos nas triplicatas de leitura geradas em cada laboratório, considerando que as alíquotas tiveram tratamentos iguais e cada laboratório preparou as soluções necessárias para a execução da análise.

**TABELA 10.** Resultados das análises realizadas em dois diferentes laboratórios utilizando alíquotas de uma mesma amostra.

	% MHb	
	A	B
1ª Réplica	0,54	0,58
2ª Réplica	0,55	0,56
3ª Réplica	0,57	0,57
<b>Média</b>	0,55	0,57

A= Laboratório de Toxicologia- FIOCRUZ  
B= Laboratório de Toxicologia- UFF

#### Anova: fator único

##### RESUMO

<i>Grupo</i>	<i>Contagem</i>	<i>Soma</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>
A	3	1,66	0,55	0,00
B	3	1,71	0,57	1E-04

##### ANOVA

<i>Fonte da variação</i>	<i>SQ</i>	<i>gl</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>valor-P</i>	<i>F crítico</i>
Entre grupos	0,000417	1	0,000417	2,5	0,19	7,71
Dentro dos grupos	0,000667	4	0,000167			
Total	0,001083	5				

A partir dos resultados apresentados na Tabela acima é possível observar que os valores obtidos não possuem uma diferença estatisticamente significativa. Desta forma, a reprodutibilidade do método foi comprovada e os resultados gerados em diferentes laboratórios que utilizarem corretamente a metodologia proposta gerarão resultados semelhantes, o que se espera de

qualquer metodologia, ou seja, a aplicabilidade em qualquer ambiente laboratorial.

### **IV.3 – Estudo na população alvo:**

A população selecionada para a efetivação deste estudo foi oriunda de um banco de prontuários de pacientes atendidos no Ambulatório do CESTEJ, de forma espontânea. Este atendimento teve seu início há dois (02) anos e cerca de 400 trabalhadores já passaram pela consulta com o médico neurologista.

Dentre este quantitativo, um grupo menor foi recrutado segundo a localidade de moradia, que *a priori* seria o município do Rio de Janeiro. Desta forma, foram obtidos um conjunto integrante de 49 trabalhadores. Porém, ao entrar em contato e obter a disponibilidade em participar do estudo, este número foi reduzido para 28 trabalhadores.

Os encontros para a coleta foram organizados para se obter a melhor logística de análise, ou seja, os trabalhadores foram organizados em grupos segundo a localidade de trabalho e cada dia marcado teria concentrado trabalhadores atuantes de uma mesma região, conforme descrito na Tabela 11.

**TABELA 11.** Distribuição dos trabalhadores segundo a região de atuação.

<b>Bairros</b>	<b>Nº de Trabalhadores</b>
Nova Iguaçu	4
Mesquita	1
Nilópolis	2
Caxias	8
São João de Meriti	3
Realengo	1
Rocha	3
Penha	1
Santa Cruz	3
Jararepaguá	2
<b>TOTAL</b>	<b>28</b>

Porém, devido a problemas burocráticos quanto à obtenção de autorização da chefia dos guardas de endemia para a realização deste estudo nos locais de trabalho, a complicada logística de análise e o reduzido tempo para finalizar o presente trabalho, a coleta e a análise das amostras biológicas foram realizadas somente nos municípios de Nova Iguaçu e Duque de Caxias, onde tivemos a maciça aceitação dos trabalhadores e o apoio dos supervisores.

Dentre os trabalhadores recrutados também foram incluídos aqueles que atuavam nessas regiões e que ainda não haviam sido consultados pelo médico neurologista, mas que demonstraram interesse em participar deste estudo ao saber da análise com os colegas de profissão. Porém, para estes trabalhadores incluídos neste estudo, um questionário amplo foi aplicado contemplando

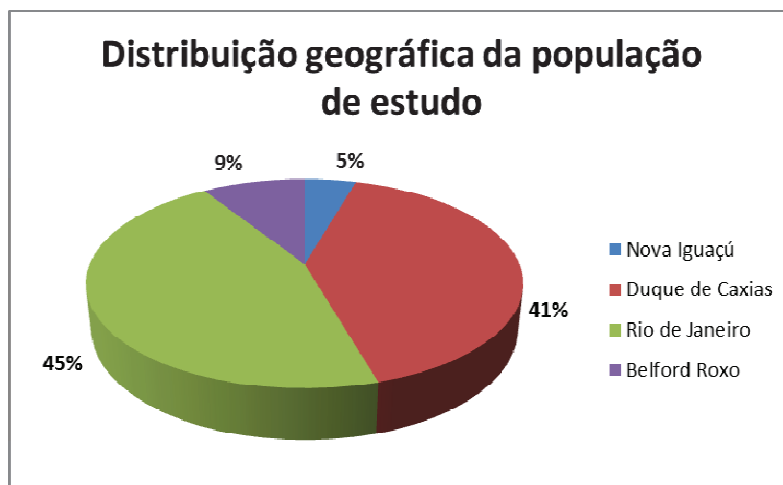
informações sobre exposição ocupacional e social e sobre interferentes alimentares e/ou medicamentosos. Além disso, houve uma orientação de que cada trabalhador iniciasse o processo de intervenção junto ao médico neurologista para a obtenção de um resultado mais amplo do efeito da exposição ocupacional sobre a sua saúde.

Ao final, tivemos um grupo amostral de conveniência de 22 trabalhadores (N=22), visto que o presente trabalho foi tratado como um estudo piloto para aplicar a metodologia adaptada, e observar o real funcionamento da logística de coleta e análise no cotidiano de um laboratório.

#### **IV.3.1- Perfil social da população:**

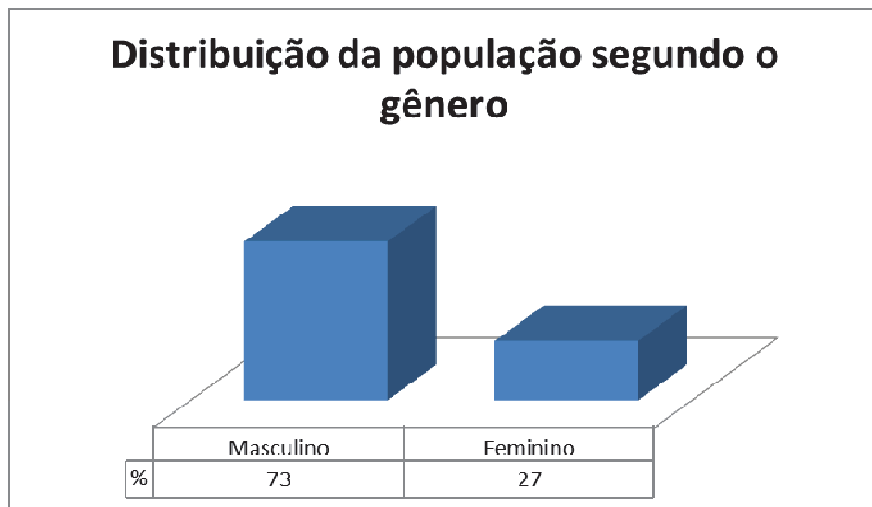
A população alvo deste trabalho em sua grande maioria reside na região da Baixada Fluminense (55%). Avaliando a distribuição populacional por município, o Rio de Janeiro é o que detém a maior frequência (45%), seguido pelo de Duque de Caxias (41%), conforme representado na Figura 6.



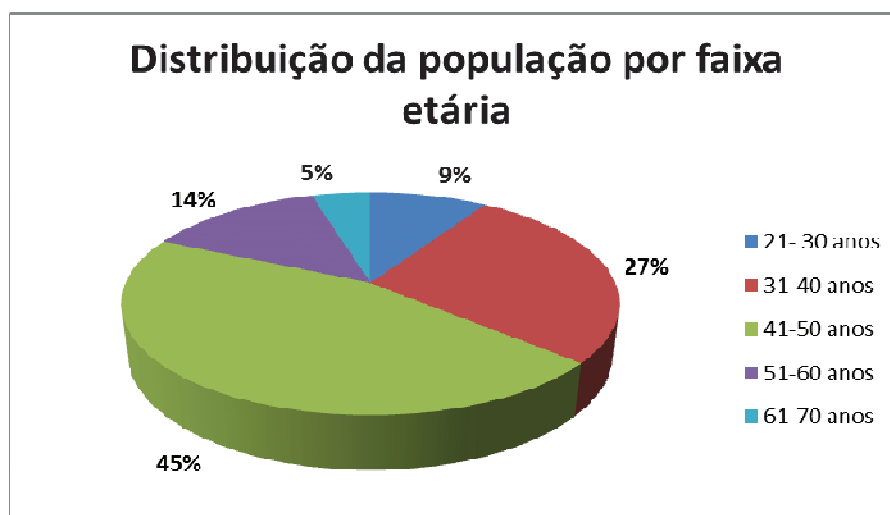


**FIGURA 6.** Distribuição geográfica da população de estudo segundo a cidade de sua residência.

Traçando um perfil quanto ao gênero e idade da população, foi possível inferir que a predominância masculina se faz presente na execução de tal atividade, como representado na Figura 7. Já analisando a idade do grupo de estudo, obteve-se uma média de 46 anos. A Figura 8 representa graficamente a distribuição de faixa etária desta população.



**FIGURA 7.** Representação gráfica da distribuição do grupo populacional segundo o gênero.



**FIGURA 8.** Representação gráfica da distribuição da população alvo em faixas etárias.

Nos dois municípios da baixada fluminense analisados, Nova Iguaçu e Duque de Caxias, foram observados diferenças entre os trabalhadores, dentre

estas vale destacar a discrepância de conhecimento do exercício de sua atividade e sobre a manipulação do agrotóxico.

No município de Nova Iguaçu, os trabalhadores ao serem indagados sobre qual era a sua função atual respondiam claramente sobre o papel que exerciam, sendo possível observar que tinham pleno conhecimento e estava bem definido o seu papel dentro do sistema de combate a endemias, sendo preferencialmente a de pulverização.

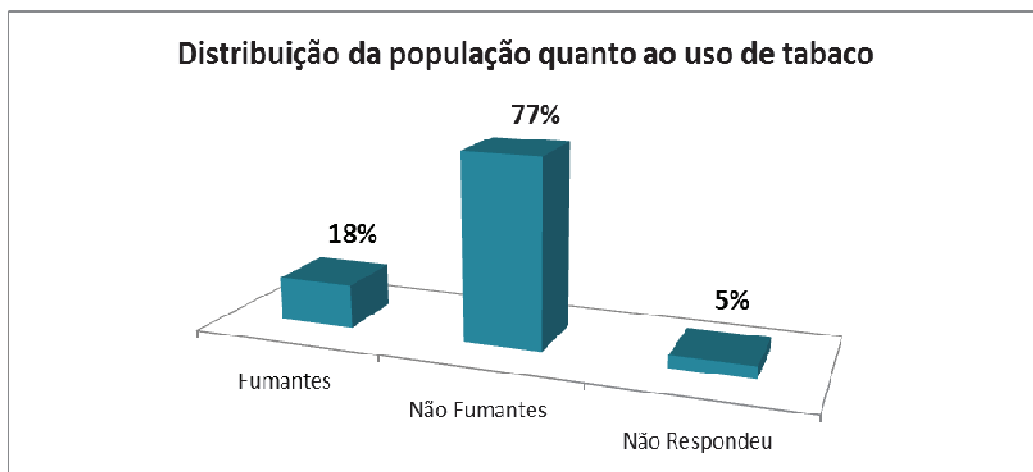
Já no município de Duque de Caxias, foi possível observar que um grande quantitativo de trabalhadores desconhecia a sua real atividade no ramo da intoxicação atual e não omitiram a informação de que tal esclarecimento não foi claramente transmitido por seus supervisores e na maioria das vezes responderam que era de tratamento.

Como já descrito na literatura<sup>33</sup>, o baixo nível educacional pode agravar a exposição devido ao fato do desconhecimento do uso adequado de tais substâncias e a forma correta de se proteger ao máximo da exposição. Sendo assim, foi possível observar que os trabalhadores atuantes no município de Duque de Caxias estão mais susceptíveis à exposição aos agrotóxicos por eles aplicados.

Em relação ao conhecimento do agrotóxico utilizado, foi possível concluir que os trabalhadores atuantes no município de Nova Iguaçu tinham mais informações sobre os agrotóxicos utilizados, como por exemplo, o nome das substâncias e o tipo de exame que eles são submetidos para a avaliação

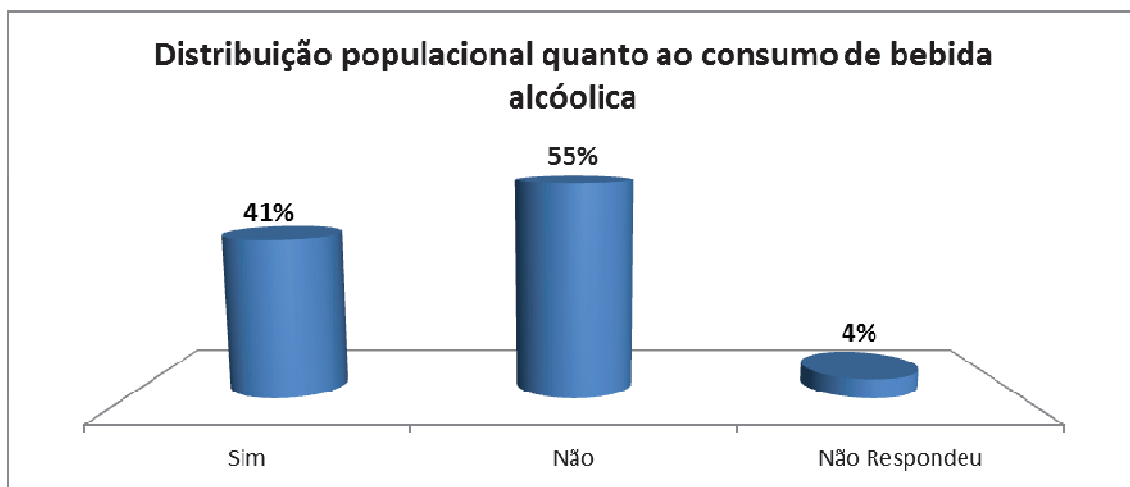
periódica de exposição ocupacional (Avaliação de Atividade de Colinesterase), além de solicitarem uma específica explicação sobre o porquê do exame e qual a contribuição da pesquisa para a sua saúde. O oposto deste cenário foi verificado no município de Duque de Caxias, onde se tinha o desconhecimento do nome do agrotóxico utilizado e foi observada a falta de interesse dos participantes no esclarecimento da proposta de análise oferecida no presente estudo.

Com as respostas obtidas nos questionários, foi possível traçar um perfil dos hábitos sociais dessa população. Um dos quesitos importantes e com plausibilidade de ser explorado é o hábito de fumar, como já descrito na literatura, que a interação do uso com a atividade exercida promove um aumento na exposição ao agente tóxico, podendo ser explicado pelo o aumento da frequência respiratória ocorrida em indivíduos fumantes<sup>34</sup>. Sendo assim, foi possível observar que o consumo de cigarro é reduzido nesta população, conforme demonstrado na Figura 9. É importante ressaltar que dentro do grupo que se declarou fumante, metade afirmou que às vezes fuma durante a execução de suas atividades e a outra metade informou que nunca pratica tal ato.



**FIGURA 9.** Representação gráfica da distribuição da população quanto ao consumo de tabaco.

Também foi avaliado o consumo de bebida alcoólica, uma vez que esta compromete significativamente a função hepática dependendo da frequência e quantidade de uso, e desta forma, a metabolização de substâncias fica comprometida podendo aumentar ou diminuir a toxicidade do agente tóxico<sup>17</sup>. O grupo amostral pesquisado tem em sua maioria o relato de não ingerir bebidas alcólicas, como representado na Figura 10. A totalidade dos trabalhadores que afirmaram consumir bebida alcóolica relatou que este consumo é eventual e quando consome a quantidade ingerida é inferior a quatro (04) drinques.



**FIGURA 10.** Representação gráfica da distribuição populacional quanto ao consumo de bebida alcoólica.

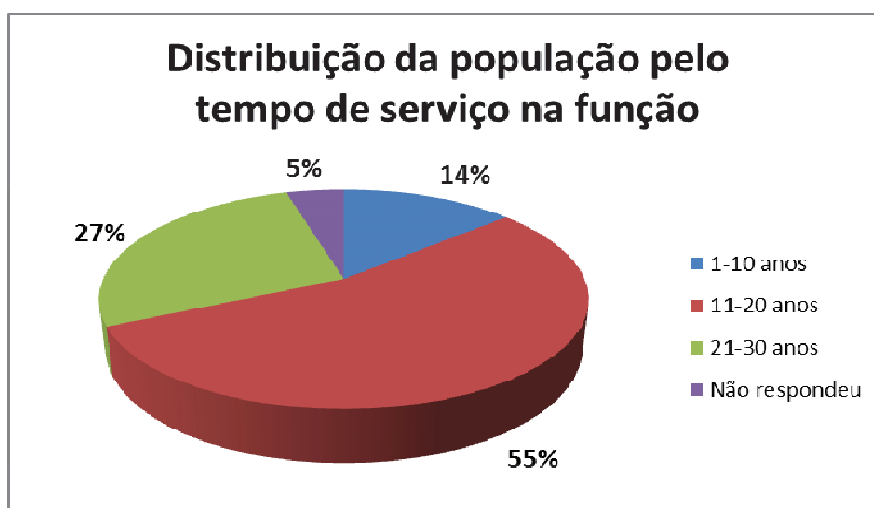
Quanto ao uso de entorpecentes ilícitos, como maconha, cocaína, crack, ecstasy e LSD, todos os trabalhadores afirmaram não serem usuários dessas substâncias.

Na tentativa de construir um real cenário de exposição a que o pesquisado estava submetido em seu cotidiano, foi perguntado se havia ou não contato com substâncias sabidamente metemoglobinizantes, como por exemplo, nitrato de amônio e anilina, e a sua frequência. Os trabalhadores que se recordavam desse histórico relataram que tiveram contato com diversas substâncias químicas, sem serem as que estavam relacionadas no questionário, como por exemplo, graxa, cloro e produtos químicos de beleza. Porém, até o presente momento não se tem o conhecimento que estas possuem efeito direto sobre a formação de metemoglobina, e as substâncias metemoglobinizantes na maioria dos casos (95%) não se fazem presentes no cotidiano de cada trabalhador.

### IV.3.2- Perfil ocupacional:

A fim de obter uma informação fidedigna a cerca do ambiente ocupacional a que os trabalhadores estão submetidos e suas possíveis consequências, o questionário aplicado contemplou uma sequência de perguntas que permitiram delinear um perfil ocupacional e verificar as possíveis fontes de exposição geradas *in loco*.

Um dos pontos importantes considerado foi o tempo de serviço exercido nesta função, pois a gravidade da exposição crônica está diretamente relacionada com o tempo e a concentração da substância que o indivíduo esteve exposto. Desta forma, foi observado que a faixa predominante de tempo de serviço foi de 11 a 20 anos (55%), seguida da faixa 21 a 30 anos (27%), como representado na Figura 11.



**FIGURA 11.** Representação gráfica da distribuição populacional quanto ao tempo de serviço na função.

Este resultado permite inferir que o grupo pesquisado possui uma larga carga de exposição a agentes exógenos, pois manipulam de forma direta ou indireta os agrotóxicos de diferentes famílias, visto que a classe escolhida para a aplicação depende do vetor a ser combatido.

Quanto ao tipo de contato dos agrotóxicos durante a jornada de trabalho, 100% dos trabalhadores afirmaram que era um contato direto. Ou seja, que no decorrer da execução da função havia a necessidade de manipulação da substância, seja no processo de diluição, de fracionamento ou de aplicação.

Foi possível, através do questionário, identificar a atividade do trabalhador com ocorrência da intoxicação atual. Dentre as opções descritas no questionário, a que apresentou maior percentual foi a de outros (67%), sendo especificada como aplicador (13%) e tratamento (87%). As outras opções citadas pelo restante dos trabalhadores foram a de pulverização (27%) e diluição (5%), como descrito na Tabela 12.



**TABELA 12.** Distribuição dos trabalhadores segundo a atividade na ocorrência da intoxicação atual.

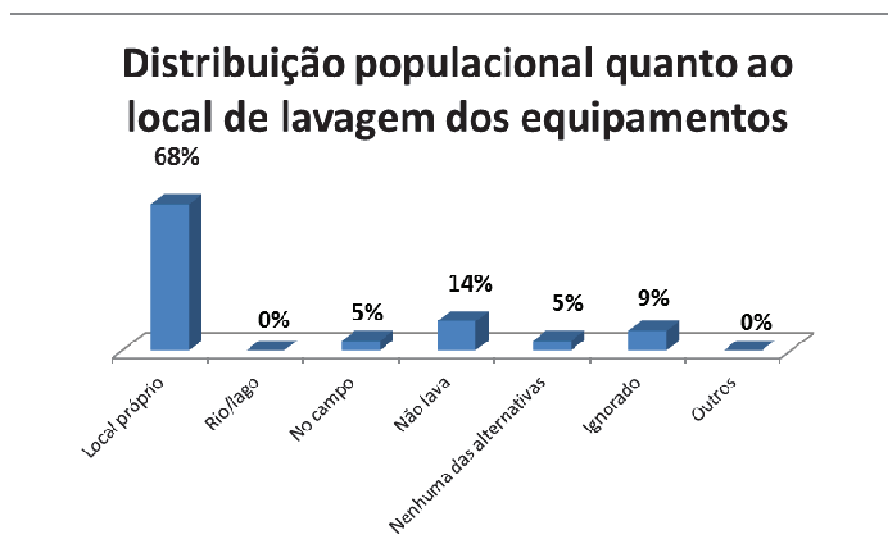
<b>Atividade no ramo da intoxicação atual</b>	<b>%</b>
Diluição	5
Tratamento de semente	-
Armazenamento	-
Colheita	-
Pulverização	27
Transporte	-
Nenhuma das alternativas	-
Outros	68
<b>Total</b>	<b>100</b>

<b>Atividade no ramo da intoxicação atual</b>	<b>%</b>	
Outros	Aplicador	13
	Tratamento	87
<b>Total</b>	<b>100</b>	

Para a execução das tarefas, os trabalhadores utilizam equipamentos como, por exemplo, espátulas e bombas de pulverização, que necessitam de limpeza. Esse procedimento é realizado pelos próprios trabalhadores, aumentando assim a exposição à substância química.

Os trabalhadores relataram que a limpeza é efetuada preferencialmente em local próprio para a execução de tal tarefa (68%). No entanto, cerca de 14% dos trabalhadores afirmaram que não lavam seus equipamentos, podendo ser entendido que o equipamento nunca é limpo ou que outras pessoas realizam

esta atividade ao invés do trabalhador. A Figura 12 demonstra graficamente a distribuição dos trabalhadores quanto ao relato do local de limpeza de seus equipamentos.

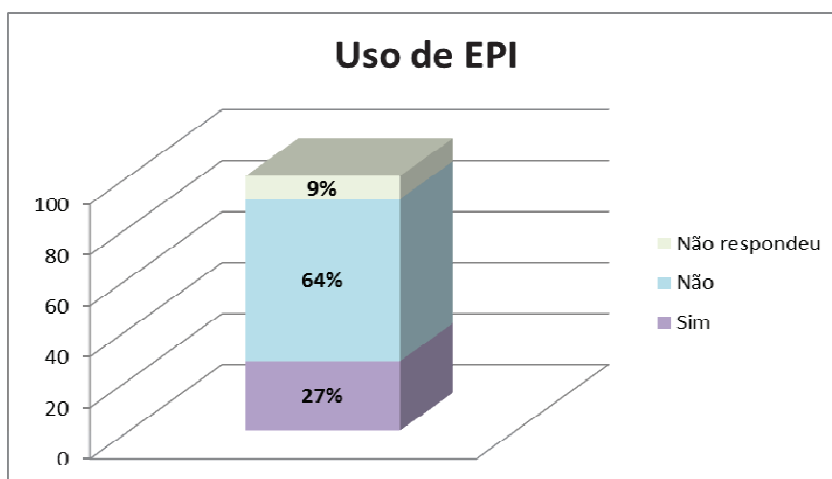


**FIGURA 12.** Representação da distribuição populacional quanto ao local de lavagem dos equipamentos.

O uso de Equipamento de Proteção Individual (EPI) é um dos principais requisitos para a minimização da exposição individual do trabalhador no ambiente ocupacional. Sendo assim, foram introduzidas no questionário perguntas a respeito do uso e manutenção de EPI.

Como já observado em outros estudos<sup>35,36</sup>, o resultado encontrado foi que a maioria dos entrevistados (64%) não utilizava equipamentos de proteção

individual na rotina ocupacional, seja pela ausência deste no ambiente de trabalho ou por falta de adaptação ao equipamento, como já constatado em outro estudo<sup>36</sup>. A Figura 13 representa graficamente essa distribuição dos entrevistados quanto ao uso ou não de EPI.



**FIGURA 13.** Representação da distribuição populacional quanto ao uso de EPI.

Para os trabalhadores que afirmaram o frequente uso de EPI em sua rotina ocupacional foi solicitada a especificação dos mesmos dentre uma lista pré- definida no questionário. Como resultado, os selecionados foram luvas, máscara de vapores, óculos de proteção, botas e macacão.

Porém, o questionamento referido acima não objetivou a aquisição da informação quanto ao uso do EPI no dia em que foi realizada a análise. Desta forma, originou uma limitação da possível inferência do uso de EPI e a exposição naquele dia, visto que a informação obtida foi de uma forma geral de uso e não apenas para o dia de análise.

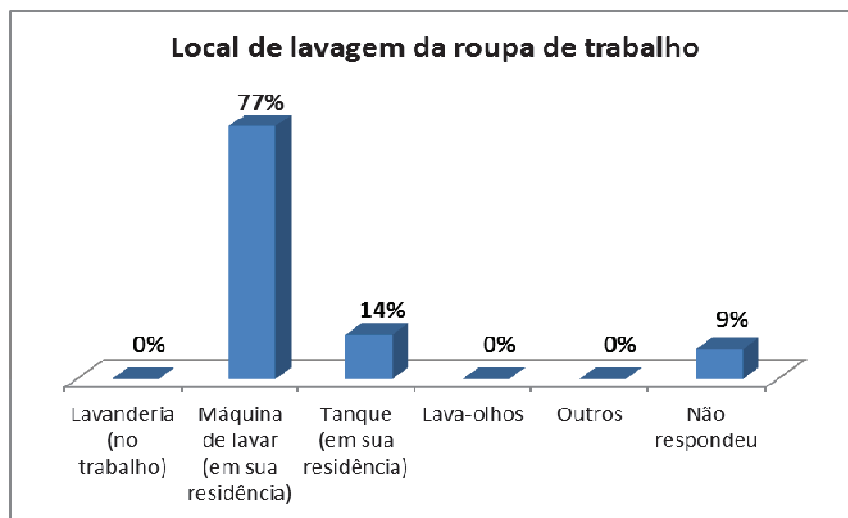
Outra informação pertinente ao estudo foi o conhecimento da presença de Equipamentos de Proteção Coletiva (EPC) no ambiente em que os trabalhadores exercem suas funções, como por exemplo, exaustores e extintores de incêndio. Todos os trabalhadores informaram através do questionário a ausência EPC em seus locais de trabalho. Tal informação condiz com as condições observadas pelos entrevistadores, que relataram que o local onde há a reunião dos trabalhadores para a distribuição das tarefas diárias e dos agrotóxicos, os chamados “ponto de apoio”, possuem estruturas precárias e improvisadas, podendo ser localizadas em postos de saúde, igrejas ou até mesmo em casas abandonadas apropriadas pelo governo.

A vestimenta utilizada durante a execução do trabalho é considerada uma proteção individual, pois ela age como uma primeira barreira física ao contato da substância com a pele do indivíduo exposto. Logo, parte da substância que iria diretamente para o tecido cutâneo fica retida na roupa. O uso prolongado da mesma roupa pode acarretar no acúmulo de substâncias de forma mais próxima ao indivíduo exposto, acentuando assim, a exposição ocorrida ao longo do tempo.

Assim, foi questionado a cada entrevistado quantos dias da semana ele usava a mesma roupa durante o trabalho. Os trabalhadores responderam que, em média, utilizam a mesma roupa durante três (03) dias e que a lavagem desta é realizada na maioria dos casos pelo próprio (50%). Quando relatado que a lavagem da roupa era efetuada por outra pessoa, foi perguntado se esta pessoa teve relato de alguma intoxicação, pois como já descrito na literatura,

as pessoas encarregadas por tal atividade, na maioria das vezes estão mais expostas do que os próprios trabalhadores devido ao fato destes utilizarem equipamentos de proteção no momento da aplicação da substância<sup>37</sup>. Do quantitativo de dez (10) trabalhadores que responderam que outras pessoas lavavam suas roupas de trabalho, apenas dois (02) relataram que suas esposas haviam apresentado processo alérgico e mal estar.

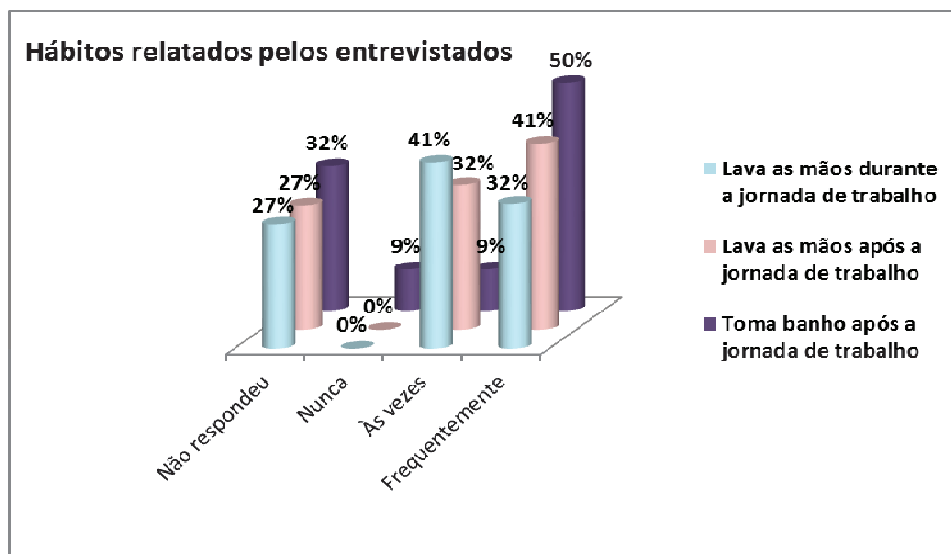
Outra informação necessária foi a de onde tal procedimento de lavagem é realizado, pois o local de limpeza selecionado informa se outras pessoas, como por exemplo, os familiares, estiveram em contato e a forma de exposição às substâncias químicas presentes no ambiente de trabalho dos entrevistados. Assim, 77% dos trabalhadores informaram que as suas roupas de trabalho são lavadas na máquina de lavar da sua residência, conforme representado na Figura 14. Mas não foi relatado se tal procedimento é realizado separadamente do restante da roupa da casa, o que acentua a exposição dos familiares residentes com os trabalhadores às mesmas substâncias a que estes estão expostos.



**FIGURA 14.** Representação da distribuição populacional quanto ao local de lavagem da roupa de trabalho.

O conhecimento de procedimentos de proteção e os hábitos adotados no ambiente de trabalho pode minimizar a exposição do trabalhador ao produto<sup>37</sup>. Assim, para obter com maior fidedignidade possível a exposição, foram inseridas no questionário perguntas relativas ao hábito de lavar as mãos durante e após a jornada de trabalho e se o ato de tomar banho após a jornada de trabalho era adotado pelos entrevistados.

O resultado obtido foi que cerca de 41% dos trabalhadores, às vezes, têm o hábito de lavar as mãos durante a execução de seus trabalhos. Em contrapartida, 41% dos trabalhadores afirmaram que lavam a mão frequentemente após a jornada de trabalho. Quanto ao ato de tomar banho após o período trabalhado, 50% dos entrevistados relataram que frequentemente adotam essa medida. A Figura 15 apresenta graficamente essa distribuição.



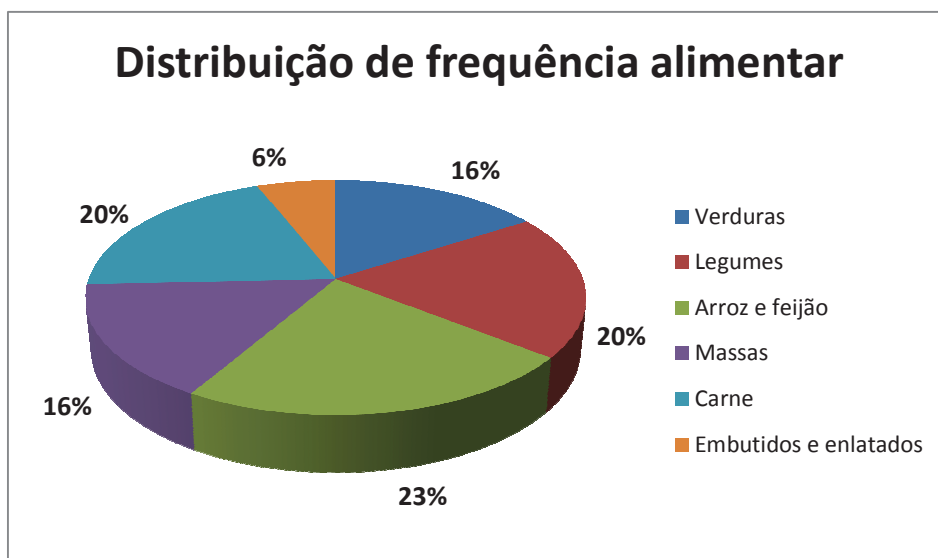
**FIGURA 15.** Representação da distribuição populacional quanto ao relato dos hábitos dos trabalhadores.

#### IV.3.3- Perfil alimentar e de uso de medicamentos:

O questionário específico aplicado à população de estudo contemplava questões relacionadas ao tipo de alimentação ingerida frequentemente e a rotina de uso de medicamentos, além de remeter a um histórico recente de realização de procedimentos cirúrgicos.

A principal justificativa para a obtenção dessas informações se baseia no conhecimento de que a presença de certos conservantes alimentares, como por exemplo, nitrato e nitrito, certos medicamentos, como por exemplo, dapsona e anestésico, e certas substâncias químicas, como por exemplo, anilinas, induzem a formação de metemoglobina<sup>17,20,21</sup>. Desta forma, a ingestão direta ou indireta dessas substâncias pode influenciar os resultados obtidos na avaliação do indicador de efeito na exposição ao Diflubenzuron.

Para a descrição do histórico alimentar foi questionado qual era o alimento ingerido nas refeições com maior frequência, podendo ser selecionada mais de uma opção. Sendo assim, o alimento com maior frequência de consumo relatado foi o arroz e feijão (23%) seguido da carne (20%), como representado na Figura 16. Tal achado corrobora o resultado do estudo promovido pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística<sup>38</sup>, no qual o arroz representou cerca de 84% e o feijão 72% da alimentação diária de cada indivíduo.



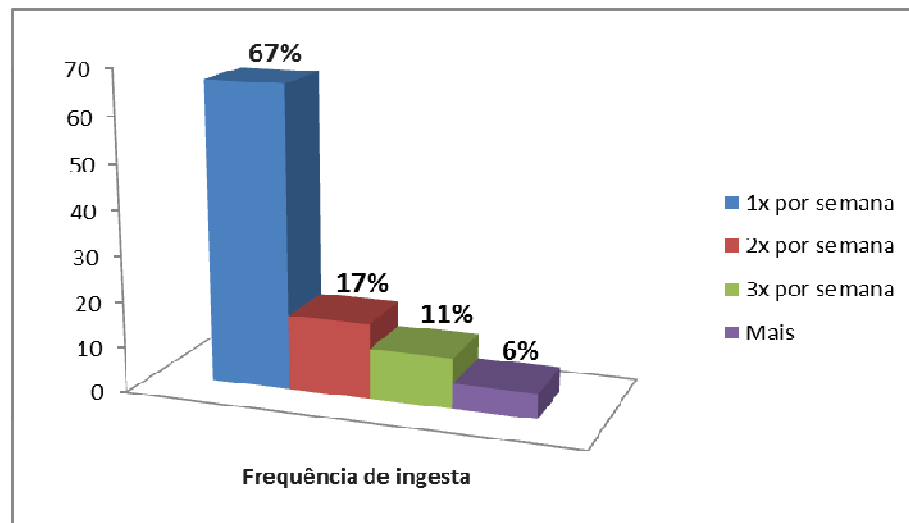
**FIGURA 16.** Representação gráfica da distribuição de frequência alimentar relatada pelos trabalhadores.

Os trabalhadores também foram questionados quanto ao hábito de se alimentar com comidas industrializadas e com qual frequência, uma vez que estas possuem em sua composição maior concentração de conservantes

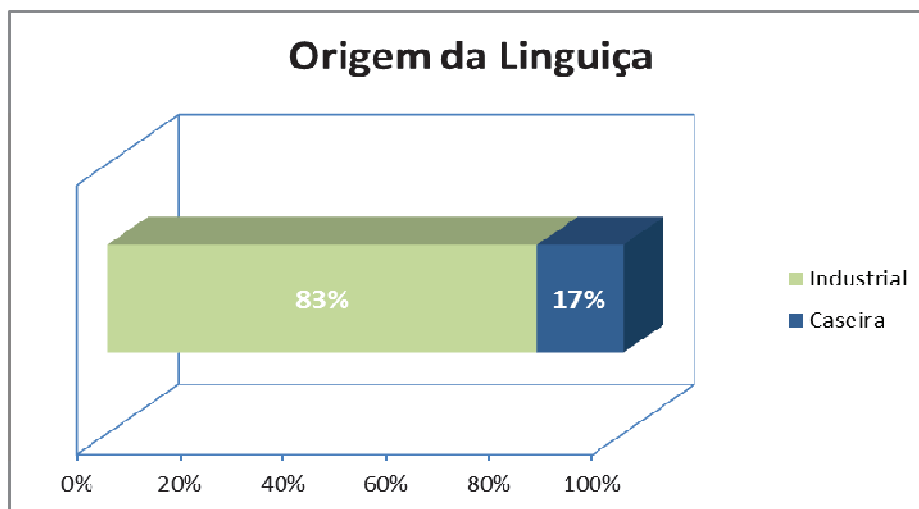


quando comparadas com comida *in natura*. Como resultado, foi obtido que 45% dos trabalhadores se alimentavam de comida industrializada. E o consumo de uma vez por semana foi o mais frequente (50%) seguido por duas vezes na semana (30%) e três vezes ou mais representaram, cada um, 10% dos indivíduos que declararam o consumo deste tipo de alimento.

Uma pergunta específica a cerca do hábito de consumir linguiça foi necessário, visto que já é sabido que os conservantes utilizados no processo de fabricação da linguiça, nitrato e nitrito, são substâncias metemoglobinizantes<sup>39,40</sup>. Além disso, foi avaliada a frequência de consumo e se o entrevistado tinha o conhecimento da origem da linguiça, se era de fabricação caseira ou industrializada. A maioria dos trabalhadores afirmaram que consomem linguiça (82%), pelo menos uma vez na semana (67%) e a origem de fabricação desta é preferencialmente industrial (83%). As Figuras 17 e 18 retratam essas distribuições dentro da população de estudo.



**FIGURA 17.** Representação gráfica da distribuição de frequência de ingestão de linguiça relatada pelos trabalhadores.



**FIGURA 18.** Representação gráfica da distribuição percentual da origem da linguiça ingerida pelos trabalhadores.

Foi observado que 50% dos trabalhadores entrevistados utilizam algum tipo de medicamento diariamente. Sendo que a família de medicamentos que

possui como mecanismo de ação a diminuição da pressão arterial foi a que obteve o maior número de relatos (67%).

Com o resultado do histórico recente de realização de procedimento cirúrgico foi possível inferir que a análise de metemoglobina terá baixa interferência quanto à presença de anestésicos, uma vez que a maioria dos trabalhadores (95%) afirmou não terem sido submetidos a qualquer procedimento médico desta natureza no último ano.

#### **IV.3.4- Resultados das coletas e análise de Metemoglobina:**

Nos dois municípios da baixada fluminense pesquisados, Nova Iguaçu e Duque de Caxias, 22 trabalhadores aceitaram voluntariamente participar do estudo, desde o fornecimento de informações até a doação de uma pequena alíquota, cerca de 10 mL, para a análise de metemoglobina.

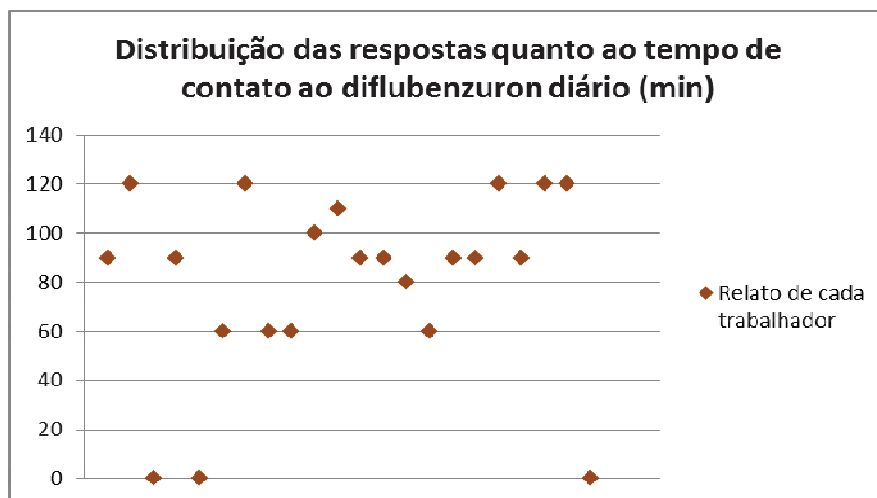
A análise de metemoglobina foi realizada no Setor de Agrotóxicos do Laboratório de Toxicologia do Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana- FIOCRUZ, e a metodologia adotada foi a adaptada e avaliada no presente trabalho.

Os trabalhadores relataram que a jornada de trabalho é moldada conforme a demanda de serviço diária, ou seja, eles possuem uma atividade determinada para ser executada e ao término destas é considerada finalizada a jornada de trabalho diário, independentemente do horário. Desta forma, os

indivíduos recrutados, no momento da segunda coleta de sangue, encontrava-se no final das suas atividades ocupacionais daquele dia.

Outra informação relevante é o tempo de aplicação ou manipulação do agrotóxico, pois este permite conhecer de forma mais realista o período de contato com a substância, para uma futura inferência do grau de exposição que o indivíduo esteve submetido no dia da análise. Sendo assim, no momento da segunda coleta, foi perguntado a cada trabalhador por quanto tempo foi realizada a atividade que promoveu este contato com o agrotóxico.

Segundo os relatos dos trabalhadores, o tempo médio de aplicação do agrotóxico no dia da análise foi de 93 minutos, sendo que tais valores se distribuem entre 60 a 120 minutos. Mesmo informando a necessidade da execução do trabalho normalmente, três (03) trabalhadores que não aplicaram o diflubenzuron no dia da análise, mas afirmaram que manipularam tal substância e o tempo de contato não foi informado. A Figura 19 representa, em um gráfico de dispersão, a distribuição das respostas quanto ao tempo de aplicação.



**FIGURA 19.** Representação gráfica da distribuição das respostas quanto ao tempo de aplicação realizado por cada trabalhador.

Nos dias em que foi realizado o estudo, os pesquisados relataram que apenas aplicaram o agrotóxico e não realizaram a atividade de fracionamento. Desta forma, o contato realizado com a substância foi na forma mais diluída, logo a exposição foi menor em relação à atividade de fracionamento, no qual o agrotóxico encontra-se sob a forma mais concentrada e em maior quantidade, podendo gerar elevado número de partículas dispersas no ambiente, acentuando assim a exposição.

No processo de quantificação do percentual da metemoglobina analisada antes e após a exposição, esperava-se ter como achado o aumento dessa porcentagem, visto que o metabólito do diflubenzuron, denominado PCA, é conhecidamente uma substância metemoglobinizante. Porém, algumas das amostras da totalidade dos resultados não tiveram tal comportamento,

conforme apresentado na Tabela 13. Vale ressaltar que todos os resultados ficaram abaixo do nível tolerado e determinado pela legislação que é de 2%<sup>28</sup>.

**TABELA 13.** Resultado da variação do percentual de metemoglobina após a exposição ao diflubenzuron com as características de cada trabalhador

Trabalhador	Idade	Tempo de serviço	Tempo de aplicação (min)	Fuma	%MHb
1	49	17	90	Não	0,21
2	51	18	90	Sim	0,54
3	50	18	120	Não	-0,50
4	46	-	90	-	0,10
5	59	16	120	Sim	-0,59
6	45	16	120	Não	-0,71
7	47	17	Não Aplicou	Não	-0,23
8	45	26	90	Não	-0,44
9	29	1	120	Não	-1,24
10	47	22	Não Aplicou	Não	0,10
11	38	11	90	Não	0,04
12	43	22	Não Aplicou	Sim	-1,07
13	26	1	60	Não	-0,11
14	31	11	120	Não	-0,14
15	35	11	60	Não	0,08
16	50	22	-	Não	-0,53
17	55	21	100	Não	-0,32
18	37	18	110	Não	0,41
19	62	20	90	Não	-0,03
20	47	22	90	Não	-0,43
21	40	9	80	Não	0,33
22	39	12	60	Sim	0,46

Para uma melhor visualização, os resultados obtidos foram categorizados em faixas de valores em percentual de metemoglobina. Desta forma, foi possível observar que a maioria dos resultados calculados (59%) apresentam valores inferiores à zero, ou seja, o nível de metemoglobina presente no sangue após a exposição era inferior ao nível basal determinado para cada trabalhador, como apresentado na Tabela 14.

**TABELA 14.** Resultado da variação do percentual de metemoglobina distribuído em faixas.

<b>Faixas</b>	<b>%</b>
< 0%	59
0,01-0,10%	18
0,11-0,20%	0
0,21-0,30%	5
0,31-0,40%	5
0,41-0,50%	9
0,51-0,60%	5
<b>Total</b>	<b>100</b>

O aumento de 0,01 a 0,10% foi a segunda faixa com maior percentual de distribuição dos resultados. Este achado confirma a teoria de que por ser uma reação de equilíbrio, para haver a formação de metemoglobina em níveis elevados tem que ocorrer exposição, em altas concentrações, a substâncias metemoglobinizantes. Não sendo assim, exposições brandas levam a um discreto aumento no nível deste indicador de efeito, como o observado acima<sup>22</sup>.

A predominância do resultado encontrado pode ser justificada pelo fato da coleta ter sido realizada no momento seguinte ao término da jornada de trabalho, sem possibilitar a metabolização do diflubenzuron ao seu principal metabólito PCA, que é substância sabidamente oxidante, pois o tempo necessário para a ocorrência desta biotransformação ainda é desconhecido.

Além disso, os trabalhadores que apresentaram valores da diferença inferiores a 0% podem ter utilizado ou ter tido contato, concomitantemente com o diflubenzuron, com substâncias redutoras, como a Vitamina C e as substâncias que possuem grupamentos chamados como tios, que promovem a retirada de um (01) elétron do ferro (Fe) presente na estrutura do pigmento sanguíneo e conseqüentemente alteraram o equilíbrio para o retorno da metemoglobina à forma de hemoglobina<sup>17,20</sup>.

Dentre os resultados obtidos na análise de metemoglobina, foram selecionados somente os casos em que se teve uma variação positiva da metemoglobina. Esta seleção se deve à intenção de obter maiores informações sobre o grupo e com isso delinear um perfil destes trabalhadores quanto às variáveis analisadas. Desta forma, apenas nove (09) trabalhadores estava dentro do critério estabelecido, ou seja, MHb > 0. Deste grupo, 67% representa o gênero masculino e a distribuição etária dos trabalhadores varia entre 35 a 51 anos.

Quanto ao uso de Equipamento de Proteção Individual (EPI), cerca de 56% dos trabalhadores relataram que não têm o hábito de utilizar tal equipamento durante a realização de suas atividades. Foi observado em outros



estudos que a falta desta proteção proporciona o aumento do risco de ter alteração nos níveis de metemoglobina<sup>35,36</sup>, mas não foi possível avaliar estatisticamente devido ao tamanho da amostragem.

Em relação à adoção de atitudes que permitem a minimização da exposição, a maioria dos entrevistados que tiveram alteração positiva da MHb afirmaram que às vezes tem o hábito de lavar as mãos no trabalho (56%) e após o trabalho (44%) e também de tomar banho após o trabalho (23%).

Avaliando especificamente o comportamento alimentar deste grupo foi possível observar que 67% tem o hábito de ingerir comida industrializada e 89% consome linguiça pelo menos uma vez por semana. Vale ressaltar que tais alimentos são os que possuem em sua composição elevada concentração de conservantes que normalmente são substâncias metemoglobinizantes, como já descrito anteriormente.

Outras variáveis avaliadas neste grupo foram o consumo de bebidas alcólicas e o hábito de fumar. Cerca de 57% dos entrevistados responderam que possui o hábito de ingerir bebidas alcólicas em uma frequência de uma vez por semana. Já para variável fumo, 67% dos trabalhadores afirmaram que não são fumantes.

O tempo de aplicação do agrotóxico no dia de análise neste grupo variou entre 60 a 110 minutos, indicando assim que o contato direto com a substância química se fez presente na execução do trabalho naquele dia em que foi realizada a análise. Apenas um trabalhador relatou que não aplicou a

substância, mas afirmou ter tido contato com esta e outro que não informou o tempo de aplicação, conforme descrito na Tabela 15.

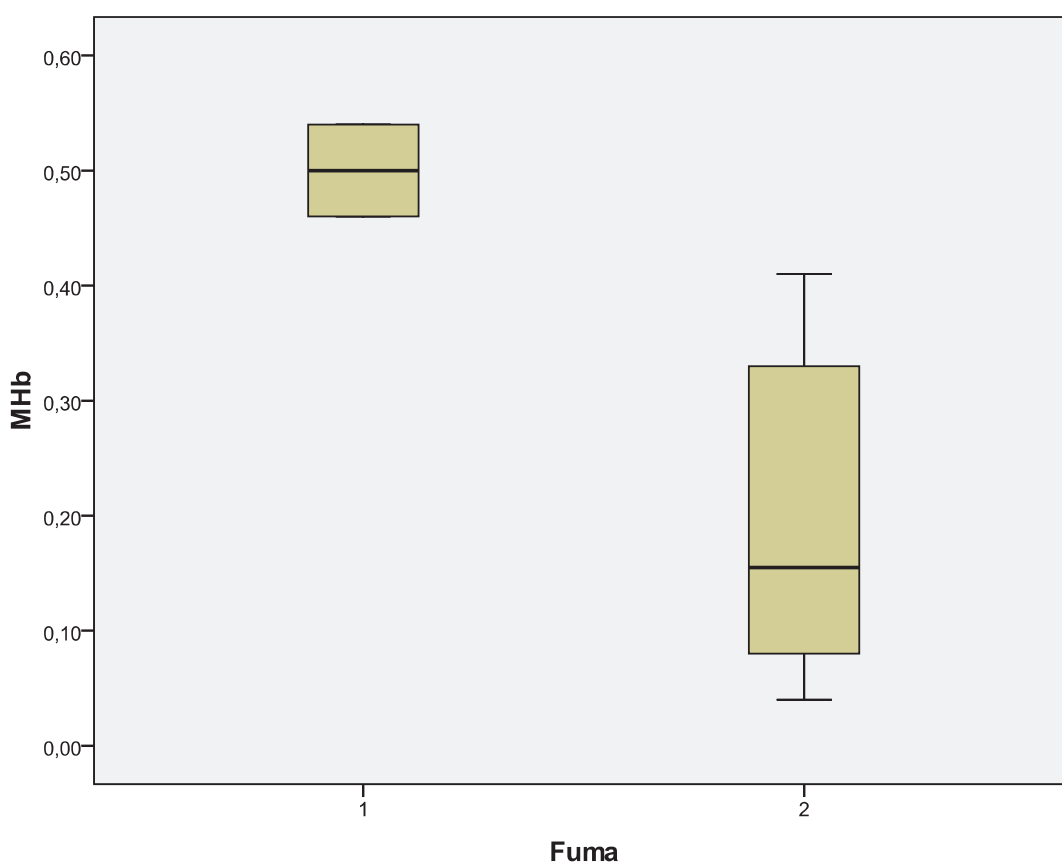
**TABELA 15.** Resultado da distribuição dos trabalhadores com alteração positiva da MHb quanto ao tempo de aplicação do agrotóxico no dia da análise.

<b>Tempo de aplicação (min)</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
0	1	12,5
60	1	12,5
80	1	12,5
90	4	50
110	1	12,5
<b>Total</b>	<b>8</b>	<b>100</b>

Após a análise descritiva das variáveis, foram realizadas teste estatístico de Shapiro- Wilk no qual observou-se que os resultados possuíam distribuição normal. Sendo assim, testes paramétricos foram realizados como a Correlação de Pearson realizada entre a variável percentual de metemoglobina com as diversas outras variáveis que possivelmente poderiam ter efeito sobre a oscilação destes níveis. A variável nível percentual de metemoglobina apresentou curva de distribuição normal e, portanto, foram realizados testes estatísticos paramétricos. Dentre todas as correlações realizadas, a única variável que obteve uma correlação com variação da MHb foi a do fumo. Os resultados estatísticos mostram uma forte correlação inversa, ou seja, os

indivíduos que tem o hábito de fumar possuem os maiores valores de variação de metemoglobina comparando os níveis antes e após a exposição.

A Figura 20 representa graficamente a distribuição dos resultados de metemoglobina quanto ao fato do trabalhador ser fumante ou não.



Legenda: 1-Fumantes e 2- Não Fumantes

**FIGURA 20.** Representação gráfica da distribuição dos níveis de MHb por categoria de consumo de tabaco.

Dado o número reduzido da amostra analisada, isto poderia explicar porque outras variáveis não apresentaram correção estatística, mas o fato de

ter sido verificada entre % Mhb e fumo confirma a grande influência desta variável sobre os processos de formação de metemoglobina.

O resultado observado acima pode ser corroborado pela informação de que o cigarro possui em sua composição substâncias sabidamente oxidantes, como por exemplo, as nitrosaminas. Sendo assim, é possível afirmar que os fumantes estão expostos a maiores concentrações de substâncias metemoglobinizantes, tendo desta forma a maior formação de metemoglobina quando comparados com os não fumantes. Logo, o hábito de fumar pode ser considerado um fator de risco para os guardas de endemias que diariamente estão expostos ao diflubenzuron.

## **CAPÍTULO V: CONCLUSÃO**

Com o presente trabalho, foi possível concluir que a proposta de adaptação da metodologia de análise se mostrou eficaz para o objetivo do estudo, que no caso é a quantificação do pigmento sanguíneo denominado metemoglobina, através do Espectrofotômetro UV-VIS. Esta modificação permitiu a utilização de uma menor rotação por minuto na etapa de centrifugação e possibilitou uma maior margem de tempo para a realização da análise após a coleta sanguínea.

Porém, o problema quanto à complexa logística de análise não foi solucionado, visto que o indicador de efeito aferido necessita que o próprio trabalhador seja o controle dele mesmo, uma vez que o comportamento da metemoglobina é específico para cada indivíduo. Desta forma, se faz necessário manter as duas coletas em momentos distintos, antes e depois da jornada de trabalho.

Os resultados apresentados possibilitaram traçar com detalhamento o perfil geral do grupo de estudo, desde os hábitos sociais até o ocupacional. Quanto à avaliação do biomarcador de efeito, houve uma relação discreta entre a exposição ao diflubenzuron e a formação de metemoglobina, mas outros estudos são necessários, visto que este foi um estudo preliminar e norteador para trabalhos futuros. Entretanto, um número considerável de resultados negativos foi observado, seja pelo baixo número amostral recrutado, ou a precoce coleta sem haver a metabolização do diflubenzuron em PCA ou pela baixa dose que o trabalhador esteve em contato durante a referida jornada de trabalho. Vale ressaltar que nosso estudo indicou que os EPIs não são

utilizados por falta do fornecimento pelos gestores municipais ou que quando fornecido não são adequados para o seu devido fim, como por exemplo, uso de máscaras com filtros não trocados que acabam atenuando a exposição que o trabalhador está submetido. Além disso, foi observado que as condições de trabalho eram insalubres e que os trabalhadores não possuíam treinamento adequado para exercer tal função, agravando ainda mais o risco ocupacional ao qual estão expostos os guardas de endemias.

Com a execução da correlação entre as variáveis foi possível afirmar que o hábito de fumar, além de causar outros danos aqui não verificados, é um fator de risco para os trabalhadores que atuam no combate a endemias, visto que aumenta a concentração de exposição a substâncias metemoglobinizantes.

Para estudos futuros, faz-se necessário consorciar a presente metodologia com outras técnicas que atualmente já são utilizadas para auxiliar no diagnóstico das concentrações dos diferentes pigmentos sanguíneos, como por exemplo, a técnica do co-oxímetro e a oxímetro de pulso. Além disso, também há a necessidade de desenvolver um estudo que contemple uma ampla verificação dos fatores endógenos que levam à auto-formação de metemoglobina e que faz com que tais indivíduos se tornem mais susceptíveis à exposição a agentes oxidantes devido ao fato de portarem patologias hereditárias, como a deficiência da enzima da metemoglobina reductase (citocromo b5), que tem como coenzima NADH (nicotinamida-adenina dinucleotídeo), que promove a redução da metemoglobina à hemoglobina.

## **CAPÍTULO VI: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



1. GOMEZ, C. M. & COSTA, S. M. F. T., Saúde do trabalhador: novas-velhas questões. *Ciência & Saúde Coletiva*. v.10 n°4 , 2005.
2. MACHADO, J. M. H. Processo de vigilância em saúde do trabalhador. *Caderno de Saúde Pública*. v.13, supl. 2, pp. 33-45, Rio de Janeiro, 1997.
3. GALLI, A., SOUZA, D., GARBELLINI, G. S., COUTINHO, C. F. B., MAZO, L. H., AVACA, L. A., MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. *Química Nova*, v. 29, n° 1, pp.105-112 , 2006.
4. LARINI L., Toxicologia dos Praguicidas. Editora Casa Paulistana de Comunicação. 1ª Edição, 1999.
5. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Estudo traça perfil do mercado de agrotóxicos no Brasil. [http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/imprensa/!ut/p/c5/rZPJkptADlafZR7Ag6BZj-ybaQab\\_UJhE2OwWWwleHj64NwyqZ](http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/anvisa/imprensa/!ut/p/c5/rZPJkptADlafZR7Ag6BZj-ybaQab_UJhE2OwWWwleHj64NwyqZ). Acessado em 07/11/2011.
6. *ENCYCLOPEDIA OF TOXICOLOGY*. Segunda Edição. Philip Wexler, et al., Editora Elsevier. Volume II. pp. 42 – 43, 2000.
7. FAO/ WHO. *Specifications and Evaluations for Agricultural Pesticides*. Evaluation Report , 339, 2004.

8. EPA. *Registration Eligibility Decision(RED) Prevention, Pesticides And Toxic Substances*.EPA 738-R-97-008, Agosto de 1997.
9. FOURNET F., SANNIER C. E MONTENY N., Effects of the insect growth regulators OMS 2017 and diflubenzuron on the reproductive potencial of *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*. v. 9, nº4, pp.426-430, 1993.
10. LEFEVRE A.M.C., LEFEVRE F., SCANDAR S.A.S., YASUMARO S., SAMPAIO S.M.P., Representações dos agentes de combate ao *Aedes aegypti* sobre a estratégia de retirada do inseticida nas ações de controle do vetor. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. v. 6, nº 4, 2003.
11. PORTAL DA ANVISA- *Monografias autorizadas de agrotóxicos*. Acessado em 23/04/2011 às 20:14 horas.
12. WHO-OMS. *Specifications and evaluations for public health pesticides: Diflubenzuron*. 2006.
13. WINKALER, E. U. *Tese de mestrado: Aspectos ecotóxicológicos dos inseticidas diflubenzuron e teflubenzuron para o pacu (*piaractus mesopotamicus*)*. Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008.
14. EPA. *Memorandum of Diflubenzuron. Human Health Risk Assessment for the Proposed Establishment of an Emergency Exemption Tolerance for Use in/on Lemons.*, Abril de 2007.

15. RAMWELL, C.T., JOHNSON P. D., BOXALL, A.B.A. E RIMMER D.A.,  
Pesticide Residues on the External Surfaces of Field Crop Sprayers:  
Occupational Exposure. *The Annals Occupational Hygiene.*, v. 49, n° 4,  
pp. 345–350, 2005.
16. CHOI H., MOON J.K., LIU K. H.,PARK H. W.,IHM Y. B., PARK B. S.,  
KIMJ.H., H. Risk Assessment of Human Exposure to Cypermethrin  
During Treatment of Mandarin Fields. *Archives Environmental  
Contamination and Toxicology.* v. 50, pp. 437–442, 2006.
17. OGA, S. *Fundamentos de Toxicologia.*São Paulo. Ed. Atheneu  
3ª Edição, 2005.
18. AMORIM, L. C. A. O Uso dos Biomarcadores na Avaliação da Exposição  
Ocupacional a Substâncias Químicas. *Revista Brasileira de Medicina do  
Trabalho.* V.1, n°2, pp. 124- 132, Belo Horizonte, 2003.
19. GREGUS, Z.; KLAASSEN, C.D. MECHANISMS OF TOXICITY. IN:  
CASARETT, L.J.; DOULL'S, J. *Toxicology – The Basic Science of  
Poisons.* 6ª ed. New York, 2001.
20. CARRAZZA M. Z., *Tese de doutorado: a metemoglobinemia e a  
dapsonemia como Indicadores na intoxicação aguda por Dapsona.*  
Faculdade de Ciências Farmacêutica-USP. São Paulo 1998.
21. CARRAZA, M. Z. N. Metemoglobinizantes: Determinação de  
Metemoglobina por Espectrofotometria. In: Moreau, R. L. M.; Siqueira,

- M. E. P. B. *Ciências Farmacêuticas- Toxicologia Analítica*. Editora Guanabara Koogan, 2009.
22. NASCIMENTO, T. S., PEREIRA, R. O. L., MELLO, H. L. D. E COSTA, J., Metemoglobinemia: do diagnóstico ao tratamento. *Revista Brasileira de Anestesiologia*. v.58, nº6, pp.651-664, 2008.
23. MOTTIN, T. S., *Seminário apresentado na disciplina Bioquímica do tecido animal*. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.
24. KUMA, F., Properties of methemoglobin reductase and kinetic study of methemoglobin reduction. *The Journal of Biological Chemistry*. v. 256, nº 11, pp. 5518-5523, 1981.
25. HEGESH, E.; GRUENER, R.N.; COHEN, S.; BOCHKOVSKY, R.; SHUVAL, H.I. A sensitive micromethod for the determination of methemoglobin in blood. *Clinica Chimica Acta*, v.30, pp. 679- 682, 1970.
26. EVELYN K. A. & MALLOY H. T., Microdetermination of Oxyhemoglobin, Methemoglobin, and Sulfhemoglobin in a single sample of blood. *Journal Biological Chemistry*. v. 126, pp. 655-662, 1938.
27. NAOUM, P.C., RADISPIEL, J., MORAES, M.S. Dosagem espectrométrica de metaemoglobina sem interferentes químicos ou enzimáticos. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 26, nº1, pp. 19 - 22, 2004.

28. NORMA REGULAMENTADORA Nº 7 – Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional. Portaria SSST n.º 24, de 29 de dezembro de 1994.
29. RODRIGUES, M. I., IEMMA, A. F. Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos – Uma estratégia seqüencial de planejamentos. *Casa do Pão Editora*. Campinas. 2005.
30. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. *Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003: "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos"*.
31. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2010 Revisão 03.
32. BRITO, N.M., JUNIOR, O.P.A., POLESE, L., RIBEIRO, M.L. Validação de métodos analíticos: Estratégia e discussão. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*. Curitiba, v.13, p.129-146. 2003.
33. OLIVEIRA-SILVA, J.J., ALVES, S. R., MEYER, A., PEREZ, F., SARCINELLI, P. N., MATTOS, R. C. O. C., MOREIRA, J. C. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. *Revista de Saúde Pública*. São Paulo, v.35, n.2, p. 130-135. 2001.
34. TSUJI, H., LEE, K.M., YOSHINO, K., NAKAMURA, H., LULHAM, G., RENNE, R., YOSHIMURA, H. Comparison of the physiological and morphological effects of cigarette smoke exposure at comparable weekly

- doses on Sprague-Dawley rats. *Inhalation Toxicology*. v.23, n.1, p.17-32. 2011.
- 35.CHESTER MH, ADAM AV, INKMANN-KOCH A, LITCHFIEL MH, SABAPATHY R, TUIMAN CP. Field evaluation of protective equipment for pesticide applicators in a tropical climate. In: Forget G, Goodman T, Villiers A. *Impact of pesticide use on health in developing countries*. [Proceedings of a symposium held in Ottawa, Canada, 1990].
- 36.ALVES, S. M. F., FERNANDES, P. M., REIS, E. F. Análise de correspondência como instrumento para descrição do perfil do trabalhador da cultura de tomate de mesa em Goiás. *Ciência Rural*. v.39, n.7, p.2042-2049. Santa Maria. 2009.
- 37.PERES, F., LUCCA, S. R., PONTE, L. M. D., RODRIGUES, K. M., ROZEMBERG, B. Percepção das condições de trabalho em uma tradicional comunidade agrícola em Boa Esperança, Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*. v.20, n.4, p.1559-1568. Rio de Janeiro, 2004.
- 38.IBGE. Pesquisa de Orçamentos Familiares- POF 2008-2009. Disponível em:  
[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008\\_2009\\_analise\\_consumo/pofanalise\\_2008\\_2009.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_analise_consumo/pofanalise_2008_2009.pdf) Acessado em: 18/01/2013 às 07:45.

39. OLIVEIRA, M. J., ARAÚJO, W. M., BORGIO, L. A. Quantificação de Nitrato e Nitrito em Linguças do Tipo Frescal. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 25, nº4, p. 736-742, Campinas, 2005.
40. LARA, W. H., TAKAHASHI, M.Y., YABUKI, H.Y. Níveis de Nitratos e Nitritos em Alimentos Infantis. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v.40, nº2, p. 147-152, 1978.

## **ANEXOS**



## ANEXO A: Protocolo Operacional Padrão

	Ministério da Saúde			
<b>FIOCRUZ</b> Fundação Oswaldo Cruz	INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCÂNTARA DE SOUZA ENSP			
<b>TÍTULO: DOSAGEM DE METEMOGLOBINA EM AMOSTRAS DE SANGUE HEPARINIZADO: MÉTODO DESCRITO POR EVELYN-MALLOY E MODIFICADO POR J. MEUNIER</b>		<b>CÓDIGO CESTEJH</b>		
<b>PALAVRAS-CHAVE</b> <b>METEMOGLOBINA E AGENTES METEMOGLOBINIZANTES</b>	<b>DATA DA CRIAÇÃO DO DOCUMENTO</b> <b>30/05/2012</b>	<b>REVISÃO</b> <b>00</b>		
<p><b>SUMÁRIO</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Objetivo</li> <li>2. Campo de aplicação</li> <li>3. Definições</li> <li>4. Siglas</li> <li>5. Fundamento do método</li> <li>6. Condições de biossegurança</li> <li>7. Material</li> <li>8. Equipamentos/instrumentos de medição</li> <li>9. Procedimento</li> <li>10. Cálculos</li> <li>11. Responsabilidades</li> <li>12. Referências bibliográficas</li> </ol> <p><b>1. OBJETIVO</b></p> <p>Este POP fixa condições, padroniza, define e estabelece regras que devem ser aplicadas ao avaliar, através da porcentagem de metemoglobina encontrada no sangue (MHb), a exposição à agentes metemoglobinizantes.</p> <p><b>2. CAMPO DE APLICAÇÃO</b></p> <p>Este POP aplica-se ao Setor de Agrotóxicos do Laboratório de Toxicologia do CESTEJH.</p>				
ELABORADO	VERIFICADO	APROVADO	DATA	PÁGINAS 1/7

**TÍTULO: DOSAGEM DE METEMOGLOBINA EM AMOSTRAS DE SANGUE  
HEPARINIZADO: MÉTODO DESCRITO POR EVELYN-MALLOY E  
MODIFICADO POR J. MEUNIER**

**CÓDIGO  
CESTEH**

### 3. DEFINIÇÕES

#### 3.1- Metemoglobina (MHb):

Pigmento da hemoglobina resultante da ação de substâncias que induzem a oxidação de um dos átomos de ferro que está na composição da hemoglobina, do estado ferroso ( $Fe^{+2}$ ) para o férrico ( $Fe^{+3}$ ). Sob esta forma o transporte gasoso no sangue fica comprometido, pois a MHb não consegue se ligar ao oxigênio, ao gás carbônico ou ao monóxido de carbono devido ao estado de oxidação +3. Além disso, há a formação de um subproduto, o superóxido ( $O_2^-$ ) que é uma espécie reativa de oxigênio, tendo grande importância em diversos processos fisiopatológicos.

#### 3.2- Agentes Metemoglobinizantes:

Substâncias exógenas que promovem aumento da porcentagem de metemoglobina no organismo humano, como por exemplo, analgésicos, quimioterápicos, nitratos e nitritos, anilinas, naftaleno, nitrobenzenos, nitroglicerinas, entre outros.

#### 3.3- Populações Expostas Ocupacionalmente:

Grupos de indivíduos que atuam direta ou indiretamente no controle de pragas tanto na agricultura, quanto em meio urbano, utilizando o inseticida diflubenzuron. Também estão expostos trabalhadores que durante a sua jornada de trabalho estão em contato com anilinas, naftaleno, nitrobenzenos, nitroglicerinas, entre outros.

#### 3.4-Solução Estoque:

Solução que deve ser armazenada em condições adequadas estando sempre disponível no momento da realização de uma análise.

### 4. SIGLAS

São usadas no texto deste POP as seguintes siglas:

MHb	Metemoglobina
PM	Peso Molecular
mL	Mililitro
g	Grama
$\mu$ L	Micro litro
KCN	Cianeto de Potássio
$K_3Fe(CN)_6$	Ferricianeto de Potássio
mg	Miligrama
L	Litro
%	Porcento
nm	Nanômetro
$\lambda$	Comprimento da onda

REVISÃO  
02

PÁGINAS  
27

**TÍTULO: DOSAGEM DE METEMOGLOBINA EM AMOSTRAS DE SANGUE  
HEPARINIZADO: MÉTODO DESCRITO POR EVELYN-MALLOY E  
MODIFICADO POR J. MEUNIER**

**CÓDIGO  
CESTEH**

## 5. FUNDAMENTO DO MÉTODO

Essa técnica se fundamenta no princípio que os pigmentos sanguíneos oxiemoglobina, deoxiemoglobina, metemoglobina e cianometemoglobina, possuem absorção máxima em comprimentos de ondas semelhantes, mas cada pigmento tem picos de absorção menores, porém significativos em diferentes comprimentos de onda. No caso, a metemoglobina possui uma absorção pequena, porém exclusiva no comprimento de onda de 630 nm, assim nesse  $\lambda$  a absorvância obtida será proporcional a concentração de metemoglobina na amostra.

Na tentativa de anular a ação de outros pigmentos interferentes presente no sangue, como por exemplo, carboxiemoglobina e sulfemoglobina, quatro leituras serão realizadas:

A primeira leitura ( $A_1$ ) a ser efetuada na amostra tratada é sem alteração da composição dos pigmentos sanguíneos presentes na amostra. A segunda leitura ( $A_2$ ) é realizada na amostra anteriormente descrita com adição de cianeto de potássio, que levará a transformação da metemoglobina à cianometemoglobina, que nesse comprimento de onda possui uma absorvância mínima. Desta forma, o valor observado é resultante dos pigmentos residuais da hemoglobina, e a diferença da primeira leitura com a segunda fornecerá a real proporção da concentração de metemoglobina presente na amostra.

A terceira leitura ( $A_3$ ) a ser realizada será de uma alíquota da amostra tratada com uma solução de ferricianeto de potássio, que ao contato com a hemoglobina promove a oxidação do ferro levando a formação de metemoglobina que fornecerá um valor de absorvância. A esta é acrescida uma solução de cianeto de potássio para novamente promover a leitura residual de outros pigmentos da hemoglobina, que será denominada como quarta leitura ( $A_4$ ). A diferença entre a terceira e quarta leitura é proporcional a concentração da metemoglobina gerada "in vitro".

## 6. CONDIÇÕES DE BIOSSEGURANÇA

O ensaio deve ser realizado utilizando jalecos, luvas descartáveis e óculos de segurança, já que há manipulação de material biológico.

Os tubos contendo sangue, antes de serem descartados, devem ser descontaminados com água sanitária comercial.

## 7. MATERIAL

- tubos Falcon de 15 mL;
- pipeta automática ajustável de 100 $\mu$ L;
- pipeta automática ajustável de 1.000 $\mu$ L;
- pipeta automática ajustável de 5.000 $\mu$ L;
- ponteiros para pipetas automáticas.

REVISÃO  
00

PÁGINAS  
3/7

**TÍTULO: DOSAGEM DE METEMOGLOBINA EM AMOSTRAS DE SANGUE HEPARINIZADO: MÉTODO DESCRITO POR EVELYN-MALLOY E MODIFICADO POR J. MEUNIER**

**CÓDIGO  
CESTEH**

#### 8. EQUIPAMENTOS/INSTRUMENTOS DE MEDIÇÃO

- centrífuga com capacidade de 6000 rpm
- espectrofotômetro UV-Visível;

#### 9. PROCEDIMENTO

##### 9.1 – Reagentes:

##### 9.1.1- Tampão Fosfato Dibásico de Sódio 0,01M pH 6,8

##### 9.1.1.1- Preparo de solução estoque:

9.1.1.1.1- Sal de fosfato dibásico de sódio (PM= 141,6g) a 0,01M. Fornecedores sugeridos: Merck e Sigma. Esta solução possui estabilidade de  $\pm 1$  dia.

*Ajustar o pH da solução de fosfato de sódio dibásico para 6,8 com HCl 1M ou NaOH 1M.*

##### 9.1.2- Solução de KCN 5% P/V

##### 9.1.2.1- Preparo de solução estoque:

9.1.2.1.1- Sal de KCN (PM= 65,12g). Fornecedores sugeridos: Merck e Sigma. Esta solução possui estabilidade de  $\pm 1$  semana. Armazenar em temperatura ambiente.

##### 9.1.3- Solução de $K_3Fe(CN)_6$ 5% P/V

##### 9.1.3.1- Preparo de solução estoque:

9.1.3.1.1- Sal de  $K_3Fe(CN)_6$  (PM= 329,24g). Fornecedores sugeridos: Merck e Sigma. Esta solução possui estabilidade de  $\pm 1$  semana. Armazenar em frasco âmbar em temperatura ambiente.

##### 9.1.4- Solução de Triton-X 1% V/V

##### 9.1.4.1- Preparo de solução estoque:

9.1.4.1.1- Triton-X 100. Fornecedores sugeridos: Acros Organics. Esta solução possui estabilidade de  $\pm 3$  meses. Armazenar em temperatura ambiente.

*Para melhor dissolução do Triton na solução utilizar o ultrassom por 15 min.*

REVISÃO  
05

PÁGINAS  
4/7

**TÍTULO: DOSAGEM DE METEMOGLOBINA EM AMOSTRAS DE SANGUE HEPARINIZADO: MÉTODO DESCRITO POR EVELYN-MALLOY E MODIFICADO POR J. MEUNIER**

**CODIGO  
CESTEH**

### 9.2 – Preparo de Amostras:

9.2.1- Amostras de sangue (aproximadamente 4mL coletados em presença de heparina) devem ser homogeneizadas suavemente por inversão contínua do tubo.

9.2.2- Coletar em tubo falcon de 15 mL, 100 $\mu$ L de sangue total, identificar e adicionar 2 mL de solução tampão e 3 mL de solução detergente. Centrifugar a 6000 rpm por 15 min.

9.2.3- Desprezar o restante do sangue em água sanitária comercial.

### 9.3– Dosagem de Metemoglobina (em duplicata):

9.3.1- Em cada cubeta:

- **Leitura A<sub>1</sub>**: 1,5 mL do sobrenadante do sangue processado;
- **Leitura A<sub>2</sub>**: 1,5 mL do sobrenadante do sangue processado descrito acima com 25  $\mu$ L da solução de KCN 5%, após leve agitação e repouso de 1 minuto;
- **Leitura A<sub>3</sub>**: 1,5 mL do sobrenadante do sangue processado adicionado 25  $\mu$ L da solução de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 5%, após leve agitação e repouso por 5 minutos;
- **Leitura A<sub>4</sub>**: 1,5 mL do sobrenadante do sangue processado descrito acima com 25  $\mu$ L da solução de KCN 5%, após leve agitação e repouso de 1 minuto.

9.3.1.1 Programação do Espectrofotômetro:

Deve-se programar o Espectrofotômetro para leitura em modo Fotométrico de  $\lambda$  de 630nm.

## 10. CÁLCULOS:

Os cálculos são realizados com nas absorvâncias obtidas em cada leitura para obter o percentual de metemoglobina sem a presença da interferência dos outros pigmentos sanguíneos na leitura. Desta forma, a fórmula abaixo deve ser utilizada para se obter o percentual de MHB na amostra:

REVISÃO  
00

PÁGINAS  
5/7

TÍTULO: DOSAGEM DE METEMOGLOBINA EM AMOSTRAS DE SANGUE  
HEPARINIZADO; MÉTODO DESCRITO POR EVELYN-MALLOY E  
MODIFICADO POR J. MEUNIER

CODIGO  
CESTEH

$$\text{Porcentagem de Metemoglobina} = \frac{A_1 - A_2}{A_3 - A_4} \times 100$$

10.1- Valores de Referência:

10.1.1-MHb:

- média de uma população não exposta: até 2%

10.3 – Controle de Qualidade Analítico

As amostras são analisadas em duplicata e, caso haja variação de mais de 15% entre os valores encontrados, é repetida a análise.

## 11. RESPONSABILIDADES

Técnicos e analistas do Setor de Agrotóxicos do Laboratório de Toxicologia do CESTEH.

## 12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Evelyn K. A., Malloy H. T., *Journal Biological Chemistry*, v. 126, pp. 655-662, 1938

Naoum, P.C. et al. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia*, v. 26, nº1, pp. 19 - 22, 2004

Hegesh, E.; Gruener, R.N.; Cohen, S.; Bochkovsky, R.; Shuvai, H.I. . *Clin. Chim. Acta*, v.30, pp. 679- 682, 1970.

REVISÃO  
00

PÁGINAS  
6/7

TÍTULO: DOSAGEM DE METEMOGLOBINA EM AMOSTRAS DE SANGUE HEPARINIZADO: MÉTODO DESCRITO POR EVELYN-MALLOY E MODIFICADO POR J. MEUNIER	CODIGO CESTEH
--	------------------

Carrazza M. Z., *Tese de doutorado: a metemoglobinemia e a dapsoneemia como indicadores na intoxicação aguda por Dapsona*. Faculdade de Ciências Farmacêutica-USP. São Paulo 1998.

NR 7 – Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional. Portaria SSST n.º 24, de 29 de dezembro de 1994.

REVISÃO  
00

PÁGINAS  
7/7

## ANEXO B: Consentimento do Conselho de Ética em Pesquisa



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz  
Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca  
Comitê de Ética em Pesquisa



Rio de Janeiro, 15 de fevereiro de 2012.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca – CEP/ENSP, constituído nos Termos da Resolução CNS nº 196/96 e, devidamente registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, recebeu, analisou e emitiu parecer sobre a documentação referente ao Protocolo de Pesquisa, conforme abaixo, discriminado:

**PROTOCOLO DE PESQUISA CEP/ENSP - Nº 333/11**  
**CAAE: 0351.0.031.000-11**

**Título do Projeto:** "Doenças neurológicas nos trabalhadores expostos cronicamente a agrotóxicos no estado do Rio de Janeiro: o estudo dos guardas de endemia"

**Classificação no Fluxograma:** III

**Será encaminhado à Conep (áreas temáticas especiais) e, portanto, deve aguardar a apreciação final desta para início da execução?** Não

**Pesquisadora Responsável:** Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos

**Instituição Proponente:** Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca – ENSP/FIOCRUZ

**Data de recebimento no CEP-ENSP:** 19 / 12 / 2011

**Data de apreciação:** 08 / 02 / 2012

**Parecer do CEP/ENSP:** Aprovado.

Ressaltamos que a pesquisadora responsável por este Protocolo de Pesquisa deverá apresentar a este Comitê de Ética um relatório das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (*item VII.13.d, da resolução CNS/MS Nº 196/96*) de acordo com o modelo disponível na página do CEP/ENSP na internet.

Esclarecemos, que o CEP/ENSP deverá ser informado de quaisquer fatos relevantes (incluindo mudanças de método) que alterem o curso normal do estudo, devendo a pesquisadora justificar caso o mesmo venha a ser interrompido.

  
Prof. Angela Esther  
Coordenadora  
Comitê de Ética em Pesquisa  
CEP/ENSP



## ANEXO C: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr.(a) está sendo convidado(a) a participar da pesquisa intitulada "Avaliação de exposição ao Diflubenzuron em guardas de endemias da região metropolitana do Estado do Rio de Janeiro", a ser realizada pela mestrandia Cristiane Barata, sob orientação da prof.<sup>a</sup> Dra. Paula de Novaes Sarcinelli.

O Sr.(a) foi selecionado porque trabalha como guarda de endemia, na região metropolitana do Rio de Janeiro, aplicando o diflubenzuron no combate a dengue. Sua participação não é obrigatória. A qualquer momento pode desistir de participar e retirar o seu consentimento. Sua recusa não trará prejuízo em sua relação com os pesquisadores ou com a Instituição.

O objetivo desse estudo é desenvolver uma metodologia para avaliar o efeito hematológico do diflubenzuron, ou seja, sua ação no sangue de indivíduos expostos a esta substância quando exercem suas atividades de trabalho. Sua participação nesta pesquisa consistirá em responder a um questionário e fornecer uma amostra de sangue, que será coletada por um profissional treinado, no início e no final da jornada de trabalho. O sangue será coletado em tubos vacutainer heparinizados com agulhas descartáveis, num total de 10 mL (aproximadamente uma colher de sobremesa). Um ligeiro desconforto acontecerá na coleta de sangue (semelhante à picada de um inseto), com pequena ardência no lugar onde este foi coletado. As amostras de sangue serão utilizadas exclusivamente para as análises do projeto, sendo descartadas após o término das análises.

Os riscos relacionados à sua participação na pesquisa – além do desconforto provocado pela coleta de sangue – referem-se à sua identificação como informante. Para evitar esta situação, as informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. O Sr.(a) será identificado apenas pela sua idade, sexo e profissão. O seu depoimento será usado para que melhor possamos

entender a realidade do seu trabalho e os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação.

O benefício relacionado à sua participação nessa etapa refere-se à possibilidade de contribuir para o desenvolvimento de um novo método de indicação de exposição ocorrida no ambiente de trabalho. Após as análises os laudos analíticos produzidos serão remetidos em envelopes lacrados para cada participante. Este procedimento deverá ser acompanhado de orientações e encaminhamento ao Serviço de Ambulatório do CESTEH/ENSP/FIOCRUZ, se necessário. Ao final da pesquisa os dados coletivos serão apresentados aos participantes da pesquisa e gestores da instituição executora do projeto (CESTEH/ENSP/FIOCRUZ).

Sr.(a) receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, e do CEP, podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento.

---

Assinatura do Pesquisador Responsável

***Contato com a pesquisadora responsável:***

Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana  
 Fundação Oswaldo Cruz  
 Rua Leopoldo Bulhões, 1480 - CEP: 22610-142  
[cristianebarata@hotmail.com](mailto:cristianebarata@hotmail.com) fone: (21)2598-2991/ (21) 2598-2982

Declaro que entendi os objetivos e condições de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

\_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

---

Assinatura do sujeito da pesquisa

Em caso de dúvida entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da ENSP:  
 Rua Leopoldo Bulhões, 1480 – Térreo – Manguinhos – Rio de Janeiro – RJ.  
 CEP: 21.041-210  
 Tel e Fax - (21) 25982863  
 e-mail: [cep@ensp.fiocruz.br](mailto:cep@ensp.fiocruz.br)  
<http://www.ensp.fiocruz.br/etica>

## ANEXO D: Questionário Específico Com Consulta e Sem Consulta



<u>QUESTIONÁRIO ESPECÍFICO (Com consulta)</u>		
METEMOGLOBINA		
Nome:		
Idade:		
Sexo: 1( ) Feminino 2( ) Masculino		
Cargo funcional:		
1. Nas refeições, que tipo de alimento é consumido com frequência?		
1( ) Verduras	2( ) Legumes	3( ) Arroz, feijão
4( ) Massas	5( ) Carnes frescas	6( ) Embutidos e enlatados
2. Tem costume de se alimentar de comidas industrializadas?		
1( ) Sim	2( ) Não	
3. Se sim, com qual frequência?		
1( ) 1x por semana	2( ) 2x por semana	3( ) 3x por semana
4( ) Mais		
4. Tem hábito de comer linguiça?		
1( ) Sim	2( ) Não	
5. Se sim, com qual frequência?		
1( ) 1x por semana	2( ) 2x por semana	3( ) 3x por semana
4( ) Mais		
6. Qual é a origem da linguiça consumida ?		
1( ) Industrial	2( ) Caseira	

7. Faz uso de algum medicamento diariamente?	
1( ) Sim	2( ) Não
8. Se sim, qual?	
9. Fez algum tipo de procedimento cirúrgico há pouco tempo?	
1( ) Sim	2( ) Não
10. Se sim, qual? E a quanto tempo?	
11. Dentre os medicamentos listados abaixo, algum foi consumido atualmente e quando cessou o tratamento?	
a. Anestésicos	
1( ) Benzocaína (Sanilin <sup>®</sup> , AMIDALIN <sup>®</sup> , XYLESTESIN 5% PESADA-50etj. 2ml(SP) <sup>®</sup> , SOLARCAINE <sup>®</sup> , GINGILONE <sup>®</sup> , ALBICON <sup>®</sup> , Andolba <sup>®</sup> , EMLA DISCO <sup>®</sup> , SILENCIUM PASTILHA <sup>®</sup> )	
_____	
2( ) Lidocaína (PROTANOL <sup>®</sup> , Ceftriaxona sódica <sup>®</sup> , Cezolin <sup>®</sup> )	
_____	
3( ) Prilocaína (EMLA Creme <sup>®</sup> , EMLA DISCO <sup>®</sup> , CITOCAINA 3%+FELIPRESSINA-50carp <sup>®</sup> , CLORIDRATO DE PRILOCAÍNA <sup>®</sup> )	
_____	
b. Quimioterápicos	
4( ) Sulfonamidas (ASSEPIUM BALSÂMICO <sup>®</sup> , ASSEPIUM <sup>®</sup> , BACFAR BALSÂMICO <sup>®</sup> , BACFAR <sup>®</sup> , Bacris <sup>®</sup> , BACTRIM <sup>®</sup> , BACTRIM BALSÂMICO <sup>®</sup> , DIENTRIN <sup>®</sup> , INFECTRIN <sup>®</sup> , Qiftrim <sup>®</sup> , SEPTIOLAN <sup>®</sup> , SEPTIOLAN BALSÂMICO <sup>®</sup> , TRIMEXAZOL <sup>®</sup> , PARAQUEIMOL <sup>®</sup> , NAZÓBIO <sup>®</sup> , AZULFIN <sup>®</sup> , SALAZOPRIN <sup>®</sup> )	
_____	
5( ) Cloroquina (REUQUINOL <sup>®</sup> , DICLORIDRATO DE CLOROQUINA <sup>®</sup> , CLOROQUINA <sup>®</sup> , DIFOSFATO DE CLOROQUINA <sup>®</sup> )	
_____	
6( ) Dapsona	
_____	
7( ) Primaquina	
_____	
8( ) Trimetoprima (ASSEPIUM <sup>®</sup> , BACFAR BALSÂMICO <sup>®</sup> , BACFAR <sup>®</sup> , Bacris <sup>®</sup> , BACTRIM <sup>®</sup> , BACTRIM	

BALSÂMICO<sup>®</sup>, DIENTRIN<sup>®</sup>, INFECTRIN<sup>®</sup>, Qiftrim<sup>®</sup>, SEPTIOLAN<sup>®</sup>, SEPTIOLAN BALSÂMICO<sup>®</sup>, TRIMEXAZOL<sup>®</sup>)

9( ) Solofenur:

c. Analgésicos

10( ) Fenazopiridina (PYRIDIUM<sup>®</sup>)

11( ) Fenacetina

12( ) Antipirina

12. Teve contato com alguma das substâncias abaixo atualmente? Onde e quando?

- |                           |                       |                            |
|---------------------------|-----------------------|----------------------------|
| 1( ) Nitrato de amônio    | 7( ) Nitrito de amila | 13( ) Nitrito de butila    |
| 2( ) Nitrito de isobutila | 8( ) Nitrato de sódio | 14( ) Aminofenol           |
| 3( ) Anilinas             | 9( ) Bromatos         | 15( ) Cloratos             |
| 4( ) Metoclopramida       | 10( ) Naftaleno       | 16( ) Nitrobenzeno         |
| 5( ) Nitroetano           | 11( ) Nitroglicerina  | 17( ) Óxidos de nitrogênio |
| 6( ) Polidores de sapatos | 12( ) Propanila       |                            |



<u>QUESTIONÁRIO ESPECÍFICO (Sem consulta)</u>	
METEMOGLOBINA	
Nome:	
1. Sexo: 1( )Feminino                      2( ) Masculino	
2. Idade:	
3. Bairro:	
4. Vínculo:	
5. Regime de trabalho: 1( )turno 2( )diurno ( )regime ( ) variável	
6. Função: 1( ) Administrativa 2( ) Téc. Agrícola/agrônomo 3( ) Aplicador/preparador de calda 4( ) aplicador na pecuária 5( )NA 6( ) Outros. Quais?	
7. Tempo na função (em anos)?	
8. Tipo de contato: 1( )Direto            2( ) indireto            3( )Sem contato 4( ) ignorado	
9. Atividade no ramo da intoxicação atual: 1( ) diluição 2( ) tratamento de semente 3( ) armazenamento 4( ) colheita 5( )Pulverização 6( ) transporte 7( )NA 8( ) Outros. Quais?	
10. Lavagem dos equipamentos: 1( ) local próprio 2( ) rio/lago 3( ) no campo 4( ) não lava 5( )NA                      6( ) ignorado 7( ) Outros. Quais?	
11. Em seu trabalho atual faz uso de equipamentos de proteção individual (EPI)? 1( ) Sim 2( ) Não	
12. Quais? 1( ) máscara de vapores 2( ) máscara de partículas 3( ) óculos de proteção 4( ) protetor auricular 5( )luvas 6( ) botas 7( )aventais 8( ) macacão 9( ) outros. Especificar:	
13. Em seu trabalho atual faz uso de equipamentos de proteção coletiva (EPC)? 1( ) Sim 2( )	

	<input type="checkbox"/> Não
14. Quais?	<input type="checkbox"/> exaustor <input type="checkbox"/> redes de proteção <input type="checkbox"/> sinalizadores de segurança <input type="checkbox"/> extintores de incêndio <input type="checkbox"/> lava-olhos <input type="checkbox"/> chuveiros de segurança <input type="checkbox"/> kit de primeiros socorros <input type="checkbox"/> outros. Especificar:
15. Quantos dias da semana usa a mesma roupa durante o trabalho?	___ dias
16. Você lava a sua roupa de trabalho?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> outras pessoas <input type="checkbox"/> NA
17. No caso de ser "outros" houve algum caso de intoxicação?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não. Especificar:
18. Onde você lava a sua roupa de trabalho?	<input type="checkbox"/> lavanderia (no trabalho) <input type="checkbox"/> em sua residência <input type="checkbox"/> máquina de lavar <input type="checkbox"/> tanque <input type="checkbox"/> lava-olhos <input type="checkbox"/> outros. Especificar:
19. Você lava as suas mãos no trabalho?	<input type="checkbox"/> frequentemente <input type="checkbox"/> às vezes <input type="checkbox"/> nunca
20. Você lava as suas mãos após o trabalho?	<input type="checkbox"/> frequentemente <input type="checkbox"/> às vezes <input type="checkbox"/> nunca
21. Você toma banho após o trabalho?	<input type="checkbox"/> frequentemente <input type="checkbox"/> às vezes <input type="checkbox"/> nunca
22. Você fuma?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
23. Costuma fumar durante o trabalho?	<input type="checkbox"/> frequentemente <input type="checkbox"/> às vezes <input type="checkbox"/> nunca
24. Quantos cigarros fuma por dia?	<input type="checkbox"/> 10 ou menos <input type="checkbox"/> 11 a 20 <input type="checkbox"/> 21 a 30 <input type="checkbox"/> 31 ou mais
25. Costuma beber ou comer durante o trabalho?	<input type="checkbox"/> frequentemente <input type="checkbox"/> às vezes <input type="checkbox"/> nunca
26. Você ingere bebidas alcoólicas?	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
27. Que tipo de bebidas alcoólicas você costuma beber?	<input type="checkbox"/> cerveja <input type="checkbox"/> vinho <input type="checkbox"/> destilados <input type="checkbox"/> outros
28. Com que frequência você ingere bebidas alcoólicas?	<input type="checkbox"/> 1x/semana <input type="checkbox"/> 3x/semana <input type="checkbox"/> 3 ou mais vezes/semana
29. Quantos drinques por dia você ingere?	<input type="checkbox"/> <4 drinques <input type="checkbox"/> >4 drinques
30. Quantos drinques por semana você ingere?	<input type="checkbox"/> <14 drinques <input type="checkbox"/> >14 drinques

31. Faz uso de alguma substância entorpecente ilícita? 1( ) Sim 2( ) Não
32. Qual? 1( ) maconha 2( ) cocaína 3( ) crack 4( ) ecstasy 5( ) LSD 6( ) outros. Especificar:
33. Nas refeições, que tipo de alimento é consumido com frequência? 1( ) Verduras            2( ) Legumes            3( ) Arroz, feijão 4( ) Massas            5( ) Carnes frescas            6( ) Embutidos e enlatados
34. Tem costume de se alimentar de comidas industrializadas? 1( ) Sim 2( ) Não
35. Se sim, com qual frequência? 1( ) 1x por semana 2( ) 2x por semana 3( ) 3x por semana 4( ) Mais
36. Tem hábito de comer lingüiça? 1( ) Sim            2( ) Não
37. Se sim, com qual frequência? 1( ) 1x por semana            2( ) 2x por semana 3( ) 3x por semana 4( ) Mais
38. Qual é a origem da lingüiça consumida ? 1( ) Industrial 2( ) Caseira
39. Faz uso de algum medicamento diariamente? 1( ) Sim 2( ) Não
40. Se sim, qual?
41. Fez algum tipo de procedimento cirúrgico há pouco tempo? 1( ) Sim 2( ) Não
42. Se sim, qual? E a quanto tempo?



43. Dentre os medicamentos listados abaixo, algum foi consumido atualmente e quando cessou o tratamento?

a. Anestésicos:

1( ) Benzocaína (Sanilin<sup>®</sup>, AMIDALIN<sup>®</sup>, XYLESTESIN 5% PESADA-50etj, 2ml(SP)<sup>®</sup>, SOLARCAINE<sup>®</sup>, GINGILONE<sup>®</sup>, ALBICON<sup>®</sup>, Andolba<sup>®</sup>, EMLA DISCO<sup>®</sup>, SILENCIUM PASTILHA<sup>®</sup>)

---

2( ) Lidocaína (PROTANOL<sup>®</sup>, Ceftriaxona sódica<sup>®</sup>, Cezolin<sup>®</sup>)

---

3( ) Prilocaina (EMLA Creme<sup>®</sup>, EMLA DISCO<sup>®</sup>, CITOCAINA 3%+FELIPRESSINA-50carp<sup>®</sup>, CLORIDRATO DE PRILOCAINA<sup>®</sup>)

---

b. Quimioterápicos

4( ) Sulfonamidas (ASSEPIUM BALSÂMICO<sup>®</sup>, ASSEPIUM<sup>®</sup>, BACFAR BALSAMICO<sup>®</sup>, BACFAR<sup>®</sup>, Bacris<sup>®</sup>, BACTRIM<sup>®</sup>, BACTRIM BALSÂMICO<sup>®</sup>, DIENTRIN<sup>®</sup>, INFECTRIN<sup>®</sup>, Qiftrim<sup>®</sup>, SEPTIOLAN<sup>®</sup>, SEPTIOLAN BALSAMICO<sup>®</sup>, TRIMEXAZOL<sup>®</sup>, PARAQUEIMOL<sup>®</sup>, NAZÓBIO<sup>®</sup>, AZULFIN<sup>®</sup>, SALAZOPRIN<sup>®</sup>)

---

5( ) Cloroquina (REUQUINOL<sup>®</sup>, DICLORIDRATO DE CLOROQUINA<sup>®</sup>, CLOROQUINA<sup>®</sup>, DIFOSFATO DE CLOROQUINA<sup>®</sup>)

---

6( ) Dapsona

---

7( ) Primaquina

---

8( ) Trimetoprima (ASSEPIUM<sup>®</sup>, BACFAR BALSAMICO<sup>®</sup>, BACFAR<sup>®</sup>, Bacris<sup>®</sup>, BACTRIM<sup>®</sup>, BACTRIM BALSÂMICO<sup>®</sup>, DIENTRIN<sup>®</sup>, INFECTRIN<sup>®</sup>, Qiftrim<sup>®</sup>, SEPTIOLAN<sup>®</sup>, SEPTIOLAN BALSAMICO<sup>®</sup>, TRIMEXAZOL<sup>®</sup>)

---

9( ) Solofenur

---

c. Analgésicos:

10( ) Fenazopiridina (PYRIDIUM<sup>+</sup>)

---

11( ) Fenacetina

---

12( ) Antipirina

---

44. Teve contato com alguma das substâncias abaixo atualmente? Onde e quando?

1( ) Nitrato de amônio

7( ) Nitrito de amila

13( ) Nitrito de butila

2( ) Nitrito de isobutila

8( ) Nitrato de sódio

14( ) Aminofenol

3( ) Anilinas

9( ) Bromatos

15( ) Cloratos

4( ) Metoclopramida

10( ) Naftaleno

16( ) Nitrobenzeno

5( ) Nitroetano

11( ) Nitroglicerina

17( ) Óxidos de nitrogênio

6( ) Polidores de sapatos

12( ) Propanila