

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA SÉRGIO AROUCA

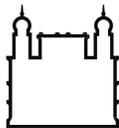
**AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO CHUMBO EM
CRIANÇAS ATRAVÉS DOS INDICADORES
ALA-U E ZPP E SUA RELAÇÃO COM FATORES
NUTRICIONAIS E A VITAMINA D.**

MÁRCIA APARECIDA RIBEIRO DE CARVALHO

**Dissertação de mestrado submetida à Escola Nacional de Saúde
Pública Sérgio Arouca (ENSP), como parte dos requisitos para
obtenção do grau de mestre em ciências (área de Saúde Pública).**

Rio de Janeiro

2006



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA
SERGIO AROUCA
ENSP

**AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO CHUMBO EM
CRIANÇAS ATRAVÉS DOS INDICADORES ALA-U E
ZPP E SUA RELAÇÃO COM FATORES
NUTRICIONAIS E A VITAMINA D.**

por

Márcia Aparecida Ribeiro de Carvalho

Orientadora: Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos

Dissertação defendida e aprovada em.....dede 2006.

Pela seguinte banca examinadora:

Dr Jaime de Silva e Lima

Dr^a Paula Novaes Sarcinelli

Dr Sérgio Rabello Alves

Catálogo na fonte
Centro de Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca

C331a Carvalho, Márcia Aparecida Ribeiro de
Avaliação da exposição ao chumbo em crianças
através dos indicadores ALA-U e ZPP e sua relação
com fatores nutricionais e a vitamina D./ Márcia
Aparecida Ribeiro de Carvalho. Rio de Janeiro:
s.n., 2006.
66p., ilus., tab., graf.
Orientadora: Mattos, Rita de Cássia Oliveira da
Costa
Dissertação de Mestrado apresentada à Escola
Nacional de Saúde Pública

1. Intoxicação por Chumbo 2. Avaliação 3.
Criança 4.Ácido Aminolevulínico-urina 5.Exposição
Ambiental 6.Estado Nutricional 7. Vitamina D

*Dedico este trabalho a Alexandre, pelo carinho,
incentivo e dedicação, sempre presentes.*

AGRADECIMENTOS

- ❖ À orientadora Rita Mattos pela amizade, apoio e conhecimento transmitido, além da confiança e oportunidade na participação deste projeto.
 - ❖ À professora Maria de Fátima (Fafá) pela amizade e ajuda durante a execução deste trabalho.
 - ❖ À Marianne pela ajuda quanto às questões nutricionais.
 - ❖ Ao professor Jaime de Silva e Lima, pela gentileza na participação da avaliação deste trabalho.
 - ❖ À professora Paula Novaes Sarcinelli, pela gentileza na participação deste trabalho e ajuda quanto à avaliação estatística.
 - ❖ À Fátima, Leandro, Renato, Regina e Monique, do Setor de Metais pelas análises realizadas.
 - ❖ À minha amiga Helena pela sua amizade sincera e pela ajuda em todos os momentos.
 - ❖ Aos amigos do CESTEJ que participaram de modo direto ou indireto na realização deste trabalho; Alan, Carlúcio, Ely, Flor, Isabele, Juliana, Lucineide, Mário, Murata, Fabrício e Simone.
 - ❖ À minha família pelo incentivo e carinho, base para todos os caminhos a serem percorridos.
 - ❖ À Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) e a FIOCRUZ pelo apoio financeiro concedido para realização deste trabalho.
-

RESUMO

Nos últimos anos cresceu a preocupação com a exposição crônica a baixos níveis de chumbo, principalmente, para as mulheres grávidas e crianças. A exposição das crianças pode começar ainda durante a vida intra-uterina e se agravar durante a infância. A toxicidade do chumbo se expressa principalmente sobre o sistema hematológico, alterando a atividade de enzimas da biossíntese do heme. Deste modo, ocorre o acúmulo de ácido δ -aminolevulínico (ALA) que é excretado pela urina. O estado nutricional pode alterar a suscetibilidade à exposição ao chumbo através de vários fatores como a quantidade de calorias, cálcio, ferro e vitamina D ingeridos. O objetivo deste trabalho é avaliar a exposição ao chumbo através dos indicadores ácido δ -aminolevulínico urinário (ALA-U) e zincoprotoporfirina (ZPP) e determinar a influência nutricional na toxicidade deste metal em crianças através da análise da vitamina D (25OHD) e do consumo alimentar de micronutrientes importantes para o metabolismo ósseo. Para tanto, foi padronizado um método para determinação de 25OHD em plasma e os seus níveis foram estudados em uma população de crianças de 0 a 16 anos, residentes em uma comunidade do Complexo de Manguinhos, RJ. Também foram avaliados os níveis de ALA-U e ZPP e o consumo alimentar. A metodologia padronizada mostrou-se sensível e específica, capaz de distinguir os níveis suficientes e deficientes desta vitamina, e classificar as deficiências em suave, moderada e grave. A população apresentou grande deficiência no consumo de cálcio, ferro e vitamina D, além de baixo consumo de calorias. O indicador de efeito ALA-U foi capaz de identificar o grupo de crianças mais suscetível à exposição. Além disto, foi observada uma correlação negativa com os índices hematimétricos, mostrando que este indicador é adequado para a avaliação da exposição ambiental e capaz de prever as alterações hematológicas, verificado através da construção de modelos de regressão linear. Na avaliação da ZPP, 78,5 % das crianças tiveram valores acima dos de referência. O consumo de vitamina D também apresentou correlação negativa com os níveis de chumbo em sangue (Pb-S) e foi capaz de prever os níveis deste indicador em 8,4 %, demonstrando a importância deste fator nutricional na exposição ao chumbo.

ABSTRACT

In the last years, the concern about lead chronic exposure has increased, mainly, in children and pregnant women. Children exposure can occur during intrauterine life and can be aggravated during infancy. Lead toxicity affects, especially, the hematologic system, modifying the activity of several enzymes of heme synthetic pathway. This alteration results in blood accumulation of delta-aminolevulinic acid (ALA) and its urinary excretion (ALA-U). The nutritional status can modify the susceptibility to lead exposure through the intake of calcium, iron, vitamin D and calories ingested. The aim of this work was to evaluate the exposure to lead through ALA-U and zinc-protoporphirin (ZPP) and to determine the nutritional influence in lead toxicity in children through the analysis of the vitamin D (25OHD) and the ingestion of important micronutrients for bone metabolism. Therefore, a method for determination of 25OHD in plasma was standardized and its levels were determined in a population of children from 1 to 16 years old, living in a community of Manginhos Complex, Rio de Janeiro. Moreover, ALA-U and ZPP, as well as alimentary consumption were evaluated. The standardized methodology revealed to be sensible and specific, being able to distinguish the enough and the deficient levels from vitamin D and to classify the deficiencies in soft, moderate and severe. The population presented great deficiency in calcium, iron, vitamin D and calories intakes. ALA-U was able to identify the more susceptible group of children to the exposure. Furthermore, a negative correlation between hematimetric indexes (hemoglobin and hematocrit) was observed, showing that this biological marker is good to assess environmental exposures and able to predict the hematologic alterations, which was verified through the construction of linear regression models. In the evaluation of ZPP, 78,5% of the children had values above of the reference value. Vitamin D intakes also presented negative and significant correlation with Pb-B levels and was able to predict in 8,4% Pb-B, demonstrating the importance of this nutritional factor in the exposure to lead.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
SUMÁRIO	VII
LISTA DE TABELAS	IX
LISTA DE FIGURAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
I – INTRODUÇÃO	1
1.1. O IMPACTO DO CHUMBO NA SAÚDE PÚBLICA.	1
1.2. CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DAS CRIANÇAS QUE PODEM AFETAR A EXPOSIÇÃO A SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS.	2
1.3. EFEITOS BIOLÓGICOS DA EXPOSIÇÃO AO CHUMBO EM CRIANÇAS.	3
1.3.1 – <i>Características da exposição</i>	3
1.3.2 – <i>Toxicidade do chumbo</i>	4
1.4 – INDICADORES BIOLÓGICOS DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO.	7
1.4.1 – <i>Indicadores de dose interna</i>	7
1.4.2 – <i>Indicadores de efeito</i>	8
1.4.2.1 – <i>Atividade da ALA-D</i>	9
1.4.2.2 – <i>ALA urinário – ALA-U</i>	9
1.4.2.3 – <i>Zinco Protoporfirina Eritrocitária - ZPP</i>	10
1.4.3 – <i>Indicadores de suscetibilidade</i>	11
1.5 – INFLUÊNCIA DE FATORES NUTRICIONAIS NA TOXICIDADE DO CHUMBO. ..	12
1.5.1 – <i>VITAMINA D</i>	12
1.6 – EFEITOS DO CHUMBO NO METABOLISMO ÓSSEO E NO METABOLISMO DA VITAMINA D.....	15
II – OBJETIVOS	17
II.1 – OBJETIVO GERAL	17
II.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
III – MATERIAIS E MÉTODOS	18
III.1 – EQUIPAMENTOS	18
III.2 – REAGENTES	18
III.3 – PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE VITAMINA D (25-OHD ₃)	18
III.3.1 – <i>Extração da vitamina do plasma</i>	18
III.3.2 – <i>Análise cromatográfica</i>	19
III.3.3 – <i>Preparação da curva analítica</i>	19
III.4 – DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	20
III.5 – DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	20
III.6 – DESCRIÇÃO DA ROTINA OPERACIONAL.	21
III.7 – DELINEAMENTO DO ESTUDO	21
III.8 – DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CHUMBO EM MATRIZES AMBIENTAIS. ..	21
III.9 – DETERMINAÇÃO DOS INDICADORES BIOLÓGICOS	22
III.9.1 – <i>Determinação de chumbo em sangue (Pb-S) e de chumbo na urina (Pb-U)</i>	22
III.9.2 – <i>Determinação de Zinco Protoporfirina Eritrocitária (ZPP)</i>	22
III.9.3 – <i>Determinação de ALA urinário (ALA-U)</i>	22
III.10 – ANÁLISE DOS INDICADORES CLÍNICOS	23
III.10.1 – <i>Determinação de Cálcio urinário (Ca-U)</i>	23
III.10.2 – <i>Análise de creatinina</i>	23

III.11 – ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	24
IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
IV.1 - PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE VITAMINA D (25-OHD ₃) E DETERMINAÇÃO DOS SEUS NÍVEIS NA POPULAÇÃO.	25
IV.2 - CARACTERÍSTICAS SÓCIO-ECONÔMICAS E DEMOGRÁFICAS.....	29
IV.3 – DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CHUMBO EM MATRIZES AMBIENTAIS. ...	31
IV.4 - AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS NUTRICIONAIS.....	33
IV.5. AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO CHUMBO	34
IV.6. AVALIAÇÃO DOS INDICADORES CLÍNICOS.....	40
IV.7. ANÁLISE DA INTERAÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS E NUTRICIONAIS COM INDICADORES DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO.....	42
IV.7.1 – Modelos de regressão linear múltipla.....	44
V – CONCLUSÕES	46
VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
VII – ANEXOS	57
ANEXO I - QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO.	57
ANEXO II - PARÂMETROS UTILIZADOS NA AVALIAÇÃO AMBIENTAL.....	61
ANEXO III – DETERMINAÇÃO DE CHUMBO EM SANGUE (PB-S) E CHUMBO EM URINA (PB-U).	62
ANEXO IV – DETERMINAÇÃO DE CÁLCIO URINÁRIO (CA-U)	62
ANEXO V – LOCALIZAÇÃO DOS PONTOS DE COLETA DE AMOSTRAS NO CAMPUS DA FIOCRUZ E NO PARQUE JOÃO GOULARD.	63
ANEXO VI – QUESTIONÁRIOS DE FREQUÊNCIA ALIMENTAR E RDA.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Teste interensaiio para padronização da metodologia de análise de 25OHD.	25
Tabela 2: Níveis médios de 25OHD e consumo de vitamina D segundo a classificação de Lips (2004).	28
Tabela 3: Características das crianças e seus responsáveis.	31
Tabela 4: Valores médios do chumbo nas matrizes ambientais.	32
Tabela 5: Média da Dose Potencial e do Fator de Risco Neurológico estimado, considerando todas as coletas realizadas.	32
Tabela 6: Freqüência alimentar das crianças comparada a RDA de 1989.	33
Tabela 7: Percentual de crianças com relação ao alcance da RDA.	33
Tabela 8: Indicadores biológicos de exposição ao chumbo.	35
Tabela 9: Tabela descritiva dos índices hematimétricos encontrados nas crianças.	41
Tabela 10: Modelo de regressão linear com a hemoglobina como variável dependente.	44
Tabela 11: Modelo de regressão linear com o hematócrito como variável dependente.	44
Tabela 12: Modelo de regressão linear com o cálcio urinário como variável dependente.	45
Tabela 13: Modelo de regressão linear com o Pb-S como variável dependente.	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeitos do chumbo na biossíntese do heme.	5
Figura 2: Estrutura química do ALA, GABA e Ácido glutâmico.....	6
Figura 3: Metabolismo e funções da vitamina D.	14
Figura 4: Curva de calibração com as médias das áreas das curvas ($r = 0,989$).	26
Figura 5: Correlação entre os níveis de 25OHD e Paratormônio.	27
Figura 6: Distribuição do logaritmo da concentração de 25OHD pela classificação de Lips, 2004.	28
Figura 7: Valores médios de Pb-S por grupos de idade.	36
Figura 8: Distribuição dos indicadores biológicos ALA-U por grupos de idade.	38
Figura 9: Relação em percentagem dos exames de urinálise.	41
Figura 10: Distúrbios hematológicos distribuídos segundo valores de Pb-S ($\mu\text{g/dL}$).	42
Figura 11: Correlação entre a ingestão de vitamina D e Pb-S.	43

LISTA DE ABREVIATURAS

AAP – Academia Americana de Pediatria

ALA - Ácido δ aminolevulínico

ALAD - Ácido δ aminolevulínico desidratase

ALA-P - Ácido δ aminolevulínico plasmático

ALA-S - Ácido δ aminolevulínico sintetase

ALA-U - Ácido δ aminolevulínico urinário

Ca/cr – Razão Cálcio – creatinina

Ca-U – Cálcio urinário

CDC –Center of Disease Control (Centro de Controle de Doenças)

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

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

Cr - Creatinina

CSEGSF – Centro de Saúde Escola Germano Sinval Faria

CV - Coeficiente de Variação

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

DP - Desvio padrão

Drf – Dose de Referência

EAS –Elementos Anormais no Sedimento

ENSP – Escola Nacional de Saúde Pública

EPA - Environmental Protection Agency (Agência de Proteção ao Meio Ambiente)

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

GABA – ácido gama aminobutírico

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance

IBMP - Índice Biológico Máximo Permitido

IDH – Índice de Desenvolvimento Humano

IU – International Unit (Unidade Internacional)

Kcal – quilocaloria

LD – Limite de Detecção

Log - Logaritmo

mg/g Hb – micrograma por grama de Hemoglobina

NHANES - National Health and Nutrition Examination Survey (Levantamento Nacional de Avaliações Nutricionais e de Saúde)

NOAEL – No Observed Adversed Effect Level (Dose na qual não é observado efeito adverso)

NR-7 – Norma Regulamentadora n° 7

OMS – Organização Mundial de Saúde

ONU – Organização das Nações Unidas

PAPES III – Programa de Apoio a Pesquisa Estratégica em Saúde III

Pb-P - Chumbo plasmático

Pb-S - Chumbo em sangue

Pb-U - Chumbo em urina

POP - Protocolo Operacional Padrão

PSF – Programa de Saúde da Família

PTH – Paratormônio

PVC – Policloreto de vinila

r - Coeficiente de correlação

RDA – Recomendação Diária Aceitável

SNC - Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

UV – Ultravioleta

VDR – Vitamin D Receptor (Receptor de Vitamina D)

VR – Valor de Referência

ZPP - Zinco Protoporfirina

$\mu\text{mol/mol}$ heme – micromol por mol de heme

$1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ – 1,25 Dihidroxitamina D, Calcidiol

$24,25(\text{OH})_2 \text{D}$ – 24,25 Dihidroxitamina D, Calcitriol

25OHD – 25 Hidroxivitamina D

I – INTRODUÇÃO

I.1. O IMPACTO DO CHUMBO NA SAÚDE PÚBLICA.

O chumbo é um dos metais mais abundantes da crosta terrestre e tem sido usado desde os tempos pré-históricos, tornando-se amplamente distribuído e mobilizado no meio ambiente. Há uma longa história de exposição ao chumbo através dos alimentos e bebidas, que foi comum nos tempos do império romano. A exposição ambiental ao metal aumentou muito após a Revolução Industrial. Estima-se que o uso extensivo de chumbo pela indústria tem liberado cerca de 300 milhões de toneladas do metal para o ambiente nos últimos 500 anos. A contaminação global pelo chumbo é atribuída à disponibilidade do metal no solo, na água e no ar como resultado da atividade humana¹.

Na maioria dos países desenvolvidos a liberação de chumbo para o ambiente foi reduzida, devido a campanhas de saúde pública e o declínio do seu uso comercial, principalmente na gasolina, além da introdução de medidas de controle das emissões nos ambientes de trabalho. A intoxicação aguda através da exposição ambiental tornou-se pouco freqüente, mas a exposição crônica a baixos níveis ainda é um problema de saúde pública, especialmente entre minorias e grupos sócio-economicamente desfavorecidos. A preocupação com os efeitos adversos decorrentes da exposição crônica cresceu, em particular, em populações mais suscetíveis, como as mulheres grávidas e crianças².

Nos países em desenvolvimento, o chumbo continua a ser um problema de saúde pública significativo devido às variadas fontes de exposição, como a fabricação e reforma de baterias chumbo-ácido, reparadoras de radiadores, fundições secundárias e refino de metais. Deste modo, ocorre a exposição aos trabalhadores e também à população vizinha dos locais que exercem estas atividades. A exposição da população em geral ao chumbo também pode ocorrer durante atividades como a demolição e a restauração de construções velhas, cujas tintas contenham o metal em sua composição. Embora a exposição ao chumbo tenha crescido, poucos destes países introduziram regulamentações ou medidas educativas para resolver o problema^{3, 4}.

1.2. CARACTERÍSTICAS FISIOLÓGICAS DAS CRIANÇAS QUE PODEM AFETAR A EXPOSIÇÃO A SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS.

As crianças, durante os primeiros estágios da vida, têm características fisiológicas que aumentam a sua vulnerabilidade aos efeitos das substâncias químicas. A exposição aos contaminantes ambientais ocorre, assim como aos adultos, através da inalação, ingestão e absorção cutânea. Embora a taxa de inalação seja a mesma, em relação aos adultos, o volume de ar inalado por unidade de peso corpóreo é maior para as crianças. O consumo de alimentos e a área superficial são também maiores por peso corporal. As crianças têm uma alta percentagem de água no corpo, especialmente em órgãos e tecidos, o que resulta em duas vezes mais água no compartimento extracelular quando comparado ao adulto. A percentagem de água decresce com o aumento da idade, de acordo com a maturação dos diferentes órgãos, também ocorre ganho de peso em uma taxa maior que no resto da vida, devido ao rápido crescimento. A expectativa de ganho de peso no primeiro mês de vida é entre 200 e 300 g/kg de massa corporal por mês⁵.

Na criança, o desenvolvimento de muitos órgãos, sistemas e mecanismos metabólicos continuam após o nascimento e em alguns casos, alcançam a completa maturidade somente na adolescência. Durante a vida intra-uterina, a interação entre a circulação materna e fetal fornece a troca dos gases respiratórios, nutrientes e remoção dos produtos de degradação. Os sistemas: respiratório, gastrointestinal, endócrino, imunológico e reprodutivo, além da função renal, são todos imaturos ao nascimento e evoluem em direção a maturidade em taxas diferentes. Estas diferenças afetam tanto a dinâmica quanto a cinética dos xenobióticos no corpo e podem causar efeitos mais sérios do que os esperados em adultos. A filtração glomerular ao nascimento é somente 30-40 % da encontrada em adultos e a secreção e reabsorção tubular é também menos eficiente. A maturação e o relativo peso do órgão podem favorecer a concentração de certas classes de xenobióticos, por exemplo, o cérebro pode ter maior risco porque a barreira hematoencefálica não está completamente desenvolvida até aproximadamente seis meses após o nascimento⁵.

I.3. EFEITOS BIOLÓGICOS DA EXPOSIÇÃO AO CHUMBO EM CRIANÇAS.

I.3.1 – Características da exposição.

A exposição das crianças ao chumbo pode começar ainda durante a vida intra-uterina, pois a barreira placentária é ineficiente para o transporte do chumbo da mãe para o feto, existindo elevada correlação entre a concentração de chumbo no sangue (Pb-S) materno, na ocasião do parto, e no cordão umbilical. O transporte materno-fetal inicia-se em torno da 14^o semana, sendo mais intenso no 3^o trimestre de gestação, importante período de maturação do sistema nervoso⁶.

Durante o primeiro mês de vida a alimentação consiste principalmente de leite materno, de vaca ou fórmulas. O leite materno pode ser uma via adicional de exposição. Para crianças alimentadas com fórmulas, a água usada no seu preparo pode também ser uma fonte de exposição. Quando comparados aos adultos e ou crianças mais velhas, as crianças até cinco anos de idade necessitam de uma grande ingestão de fluidos por unidade de peso corporal, equivalente a 1/7 do seu peso para repor a perda de água através da superfície corporal, alta taxa metabólica e imaturidade dos rins para concentrar a urina⁵.

A exploração oral do ambiente constitui uma parte importante do desenvolvimento entre seis meses e três anos de idade. A ingestão de solo, poeira da casa e da rua através da atividade de levar as mãos à boca (em média 100 mg/dia) é reconhecida como uma importante fonte de exposição em crianças menores de cinco anos¹.

A exposição pode ser agravada na infância devido às particularidades fisiológicas deste período que determinam uma suscetibilidade maior ao chumbo. A absorção por via digestiva é muito significativa, uma vez que 50% do chumbo ingerido é absorvido. E esta absorção aumenta na presença de deficiências nutricionais, mais comuns nas crianças que nos adultos, como a baixa ingestão de ferro e cálcio⁷.

Outra fonte importante de exposição para as crianças é a atividade de trabalho dos pais, que podem levar para casa o metal através das suas roupas e calçados⁸.

I.3.2 – Toxicidade do chumbo.

O chumbo interfere no funcionamento das membranas celulares e enzimas, formando complexos estáveis com ligantes contendo enxofre, fósforo, nitrogênio ou oxigênio (grupamentos -SH, -H₂PO₃, -NH₂, -OH) que funcionam como doadores de elétrons⁹.

A toxicidade do chumbo pode se expressar, tanto em crianças quanto em adultos, como um desequilíbrio na função de muitos sistemas. Os mais afetados com a exposição ao chumbo são o hematopoiético, o nervoso central e periférico, o renal e o digestivo¹⁰.

O efeito tóxico do chumbo mais estudado é o que ocorre na medula óssea, com relação ao sistema hematológico, com a redução da hematopoiese e inibição da síntese do grupamento heme, que constitui moléculas importantes não só deste sistema, como a hemoglobina, mas também mioglobina, catalase e citocromos. O resultado desta inibição, no sistema hematológico leva a uma anemia hipocrômica e microcítica^{11, 12}.

A figura 1 mostra um esquema dos efeitos do chumbo na síntese do heme. Neste mecanismo, a enzima mais sensível aos efeitos tóxicos do chumbo é a ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALA-D) que é inibida a baixos níveis de exposição. O chumbo também reduz a atividade da ferroquelatase, a enzima que está envolvida no último passo para formação do heme. A falha na condensação de duas moléculas de ácido δ -aminolevulínico (ALA) para formar o porfobilinogênio pela ALA-D e da adição de ferro na protoporfirina pela ferroquelatase resulta na redução da síntese do heme. A formação reduzida de heme estimula por “feedback” negativo a ácido δ -aminolevulínico sintetase (ALA-S), primeira enzima do mecanismo de biossíntese. Assim, ocorre um aumento na produção de ALA e decréscimo da sua condensação em porfobilinogênio resultando em uma quantidade considerável de ALA na circulação sanguínea e na urina¹¹.

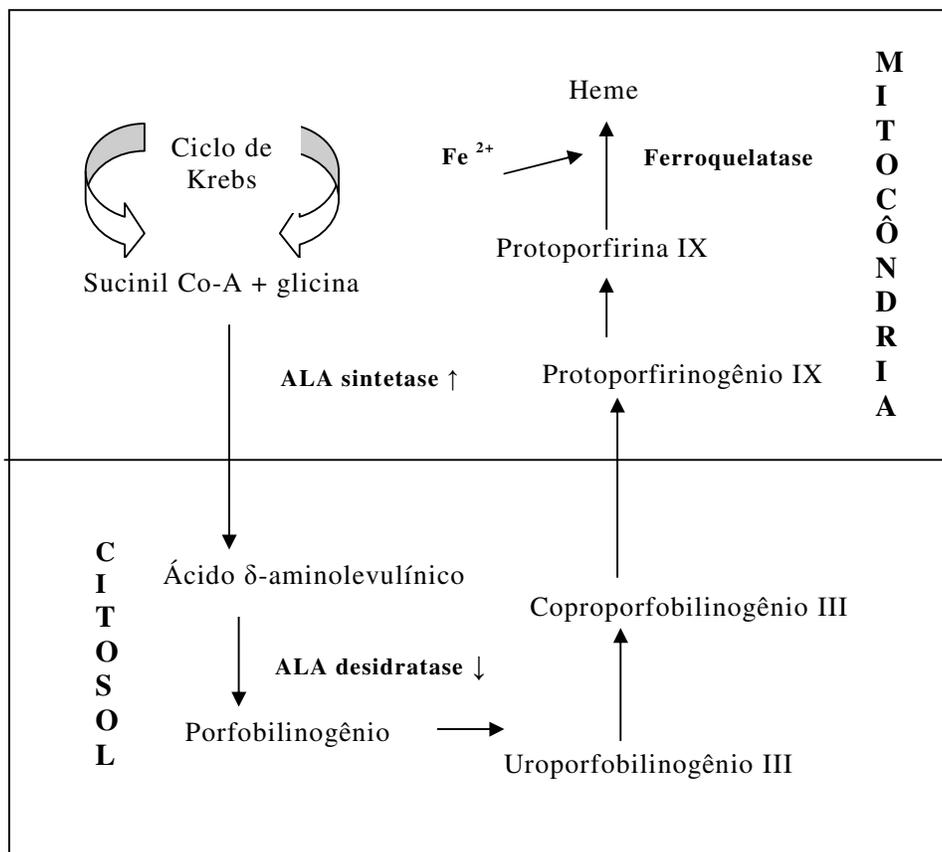


Figura 1: Efeitos do chumbo na biossíntese do heme.

Fonte: Adaptado de Gurer & Ercal (2000).

A molécula de ALA pode sofrer uma auto-oxidação e levar à formação de espécies oxigênio reativo como o íon superóxido (O_2^-), o radical hidroxila (OH) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), causando o aumento da peroxidação lipídica, dano no DNA e alteração dos mecanismos homeostáticos do cálcio. Os componentes da membrana celular dos eritrócitos são vulneráveis a peroxidação lipídica e têm limitada capacidade para reparo do dano oxidativo¹³. Além disso, o ALA é neurotóxico em modelos animais “in vivo”, mas seus efeitos em modelos animais “in vitro” são mais reprodutíveis. É estruturalmente similar ao neurotransmissor inibitório ácido γ -aminobutírico (GABA) e ao neurotransmissor excitatório ácido L-glutâmico (Figura 2). Isto fornece uma ligação entre a síntese do heme e manifestações neurológicas na exposição ao chumbo e nas porfirias^{11, 14}.

O chumbo também exerce sua toxicidade sobre o tecido nervoso de maneira direta, alterando a estrutura dos componentes celulares¹⁴.

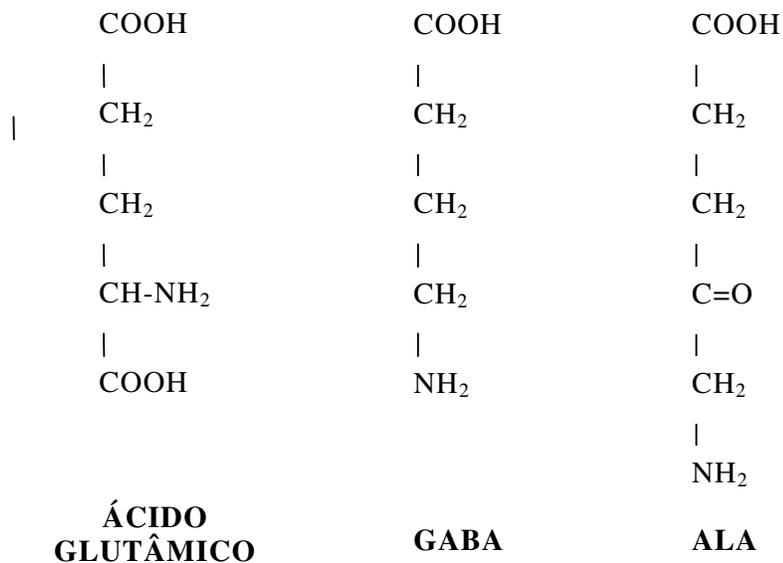


Figura 2: Estrutura química do ALA, GABA e Ácido glutâmico.

Fonte: Sithisarankul (2001).

O chumbo causa anormalidades no sistema nervoso central (SNC) dos adultos, sendo as neuropatias periféricas mais proeminentes. Ao contrário disso, no sistema nervoso em desenvolvimento, os efeitos centrais são mais evidentes que os periféricos. Além disso, os efeitos no sistema nervoso periférico (SNP) adulto tendem a serem revertidos após o término da exposição. Nas crianças os efeitos no SNC parecem não ocorrer da mesma forma, talvez porque o chumbo perturbe processos complexos pelos quais as conexões sinápticas são selecionadas e modificadas⁴.

A vulnerabilidade individual para dano no neurodesenvolvimento também parece variar de acordo com as características pessoais. Os níveis de Pb-S que para alguns indivíduos sinalizam efeitos subclínicos, em outros resultam em encefalopatia ou mesmo morte. As crianças apresentam respostas distintas a baixos níveis de exposição. Deste modo, aquelas com o mesmo nível de Pb-S não devem ser consideradas iguais para o desenvolvimento destes efeitos⁴.

A exposição excessiva e prolongada ao chumbo pode causar doença renal progressiva que pode assumir duas formas, a disfunção tubular renal e a nefropatia intersticial. A disfunção tubular renal ocorre, na maior parte, em crianças sob exposição aguda por via oral, e algumas vezes em trabalhadores

expostos. Esta disfunção está geralmente associada aos efeitos conhecidos sobre o SNC, caracteriza-se pela presença de corpos de inclusão nuclear, alterações fisiológicas na mitocôndria e citomegalia das células epiteliais dos túbulos proximais. Mattos (2001) observou o aparecimento dos corpos nucleares de inclusão a partir de 27,6 µg/dL de Pb-S em trabalhadores. A nefropatia intersticial, um efeito direto da exposição crônica sobre os rins, descrita principalmente em trabalhadores expostos, é caracterizada por esclerose vascular, atrofia ou hiperplasia da célula tubular, fibrose intersticial progressiva, nenhum ou poucos corpos de inclusão e esclerose glomerular¹⁶.

Quanto aos efeitos do chumbo sobre o sistema gastrointestinal, a cólica é um dos efeitos iniciais no quadro de intoxicação em sujeitos expostos em seus ambientes de trabalho ou em indivíduos com exposição aguda a níveis elevados de chumbo, sendo também um sintoma da intoxicação em crianças¹⁷.

1.4 – INDICADORES BIOLÓGICOS DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO.

A utilização dos indicadores biológicos tem uma função chave em investigações de avaliação do risco, pois fornecem informações úteis para prever o desenvolvimento de doenças e implementar programas de prevenção; são utilizadas como ferramentas no processo de monitorização biológica da exposição a substâncias químicas¹⁸.

Os indicadores biológicos podem ser classificados em: 1) Indicadores de exposição ou de dose interna, que representam medições da própria substância ou de seus metabólitos em matrizes biológicas; 2) Indicadores de efeito, decorrentes de alterações bioquímicas, fisiológicas ou estruturais, provenientes da interação entre a substância e o organismo; 3) Indicadores de suscetibilidade, que se referem a limitações inerentes à sensibilidade do organismo exposto, influenciando na capacidade de responder à exposição e nas características desta resposta¹⁰.

1.4.1 – Indicadores de dose interna

O chumbo inorgânico é absorvido principalmente através dos pulmões e pelo trato gastrointestinal até alcançar a corrente sanguínea, na qual 98% são encontrados nas células vermelhas. O Pb-S é representativo da concentração de chumbo nos tecidos moles e freqüentemente usado como uma medida da carga

corpórea e da quantidade absorvida do metal. A meia-vida no sangue e em tecidos moles é de 28 a 36 dias. As concentrações de Pb-S são geralmente consideradas o índice de exposição ao chumbo mais confiável. Mais de 95 % do chumbo presente no sangue está ligado aos eritrócitos e em equilíbrio dinâmico com o chumbo presente no plasma (Pb-P). Este está em equilíbrio com o “pool” extracelular e envolvido com todo o movimento do chumbo entre diferentes compartimentos biológicos. Assim, o Pb-P circula pelo corpo, afeta a carga corpórea de chumbo e é responsável pela sua toxicidade nos tecidos moles, como a medula óssea, rins, cérebro etc. Os níveis de Pb-P aumentam rapidamente com a repentina ingestão ou exposição aguda ao chumbo e caem com o passar do tempo. A sua meia-vida é muito curta, talvez menos de 1 hora^{19, 20}.

Partes do chumbo absorvido são excretadas pela urina. A quantidade de chumbo na urina (Pb-U) não depende só das condições de exposição, mas também da carga corporal e da função renal. O Pb-U, assim como o Pb-P, aumenta exponencialmente com o aumento do Pb-S em uma situação de exposição contínua, e principalmente como reflexo da exposição recente²¹. A concentração de chumbo no osso também é utilizada como indicador biológico, analisada por uma técnica de fluorescência por raios X, mas tem seu uso limitado apenas a alguns países. Outras matrizes biológicas como cabelo e dentes têm tido uso prático, principalmente em estudos epidemiológicos¹⁰.

I.4.2 – Indicadores de efeito

Os órgãos ou tecidos em que os primeiros efeitos biológicos podem ser observados são chamados alvos. Os efeitos subclínicos aparecem quando a concentração da substância química alcança um certo nível nestes tecidos ou órgãos. As concentrações críticas de chumbo na medula óssea podem ser detectadas medindo o grau do distúrbio na via de biossíntese do heme. O decréscimo da atividade de enzimas e quantidades alteradas de intermediários do mecanismo de biossíntese, e também outros efeitos em outros órgãos podem ser usados como indicadores biológicos de efeito¹⁰.

As interações do chumbo com alguns processos enzimáticos responsáveis pela síntese do heme podem ser sensivelmente determinados pela inibição da ALA-D e variação da concentração de alguns metabólitos como o ácido δ -

aminolevulínico na urina (ALA-U), sangue (ALA-S) ou plasma (ALA-P), coproporfirina urinária e zinco protoporfirina no sangue (ZPP)¹⁰.

I.4.2.1 - Atividade da ALA-D

A função catalítica da ALA-D é um dos primeiros processos bioquímicos afetados pelo chumbo. A atividade da enzima eritrocitária é o indicador de exposição recente ao chumbo mais sensível, por isso, vem sendo utilizada rotineiramente como ferramenta para diagnóstico em casos de suspeita de intoxicação por chumbo, em alguns laboratórios clínicos e toxicológicos²². A inibição da ALA-D é detectada mesmo em baixas concentrações de Pb-S (<10µg/dL); em níveis de 15 µg/dL, a atividade da enzima sofre uma inibição de 50%. A inativação máxima ocorre na faixa de 40 a 60µg/dL de Pb-S²³.

Populações não expostas têm uma ampla faixa de atividade da enzima, sendo que apenas 2% de indivíduos apresentam menos que 50% dos valores normais. A atividade da enzima pode ser afetada pelo uso de álcool e cigarro (tabaco), também por patologias não relacionadas ao chumbo, como cirrose hepática, e ainda por porfirias hereditárias^{24,25}. Por conta disso, alguns pesquisadores incluem uma etapa de ativação enzimática com ditiotreitol, zinco ou calor, nos procedimentos de análise da atividade da enzima, determinando o percentual de recuperação da ALA-D, e não sua atividade diretamente^{26, 27}. Em trabalhadores expostos ao metal, Mattos (2001) encontrou um percentual de recuperação de 40,96 % ,e no grupo controle um percentual de recuperação de 27,69 %, sendo a diferença entre os grupos, estatisticamente significativa.

A ligação do chumbo a metalotioneínas e a outras proteínas não pertencentes a biossíntese do heme, parece exercer um efeito modulador sobre a inibição da ALA-D²⁸. A inativação da ALA-D resulta em proporcional acúmulo de ALA no plasma e na urina²².

I.4.2.2 – ALA urinário – ALA-U

O efeito imediato da indução da ALA-S e da inibição da ALA-D causam um aumento da concentração do ácido δ aminolevulínico (ALA) no plasma ,e, conseqüentemente na urina, sendo o período de latência de apenas algumas horas para alterações nas taxas de absorção do chumbo. Na urina os níveis do

ALA, têm sido largamente empregados na monitorização biológica ao chumbo^{29, 30}.

Um fator que poderia ser limitante para a sua utilização como indicador seria a variabilidade interindividual da excreção de metabólitos para a mesma absorção de chumbo. Esse problema pode ser contornado em parte, pela correção da urina, que pode ser efetuada de várias formas, como por exemplo, a sua diluição ou a correção pela densidade. Entretanto, a correção pela creatinina, apesar de indícios de variação por influência do fluxo urinário, tem demonstrado ser a forma mais eficaz^{19, 30, 31}.

A utilização de métodos cada vez mais sensíveis para a determinação deste metabólito tem possibilitado a detecção cada vez mais precoce dos casos de exposição ao chumbo em que ainda não são observados sinais ou sintomas. A utilização de Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) como método analítico, ao invés do método espectrofotométrico, comumente utilizado no Brasil, representa um avanço nesta determinação. Incorpora uma etapa prévia de separação cromatográfica, diminuindo a interferência de outros compostos aminoacetona presentes na urina³².

As vantagens de um indicador que possa ser analisado utilizando a urina como matriz biológica são claras: não causa nenhum tipo de desconforto, por não ser um teste invasivo, além de maior facilidade na coleta, armazenamento, transporte e manuseio da amostra. Além disso, algumas vezes as coletas de sangue não são praticáveis em estudos com crianças^{33, 34}.

I.4.2.3 - Zinco Protoporfirina Eritrocitária - ZPP

O passo final da síntese do heme, a introdução de Fe^{2-} na protoporfirina IX, também é afetada pelo chumbo. A inibição da redução de Fe^{3-} pela exposição ao chumbo causa a redução do transporte de Fe^{2-} dentro da mitocôndria, levando ao acúmulo de protoporfirina no eritrócito. A protoporfirina é quelada com Zn^{2-} para formar zincoprotoporfirina. Então, o acúmulo de protoporfirina ou zincoprotoporfirina no eritrócito fornece um índice de distúrbio no passo final de síntese do heme, sugerindo um efeito bioquímico do metal na medula óssea, e um depósito ativo do chumbo no tecido¹⁰. A determinação de ZPP tem sido proposta como indicador de exposição alta e recente, e sua utilização é crescente junto a outros

indicadores^{15, 35}. Além da avaliação da toxicidade do chumbo, Labbé, Vreman & Stevenson (1999), recomendam que a determinação de ZPP seja expandida para avaliação do estado nutricional principalmente em deficiências de ferro em crianças, grávidas, doadores de sangue e diagnóstico de deficiências no metabolismo do ferro. Estes autores estipularam que uma variação dos níveis de ZPP de 60 a 80 $\mu\text{mol/mol}$ heme, mesmo que os valores de hemoglobina e hematócrito estejam normais, está associada à queda dos estoques de ferro em crianças, consequência da ingestão insuficiente do nutriente ou doenças crônicas.

I.4.3 – Indicadores de suscetibilidade

O indicador de suscetibilidade é um indicador da habilidade inerente ou adquirida de um organismo para responder ao desafio da exposição a um xenobiótico. Em condições semelhantes de exposição, diferenças genéticas de indivíduos no metabolismo ou componentes macromoleculares podem produzir diferentes doses em órgãos alvo e assim, diferentes tipos de resposta. Apesar de ser dada maior atenção a suscetibilidade genética, alguns fatores adquiridos como o estado nutricional, doenças, mudanças fisiológicas, medicação e a exposição a outros agentes ambientais também podem afetar a suscetibilidade individual¹⁰.

Na exposição ao chumbo, o polimorfismo da ALA-D está relacionado à suscetibilidade de efeitos no metabolismo do heme. O gene ALA-D humano tem dois alelos 1 e 2, cuja diferença é a troca de uma guanina por uma citosina na região de codificação, por conseguinte a troca de um aminoácido lisina por asparagina. Isso resulta em cargas distintas das isoenzimas. Sendo assim, a proteína ALAD-2 pode se ligar mais fortemente ao chumbo que a proteína ALAD-1¹⁰. Mitri (2003) estudou uma população brasileira e encontrou o genótipo ALAD 1-1 em 98 % e o genótipo ALAD1-2 em 2 %.

A função da vitamina D depende da sua interação com receptores localizados no núcleo celular, que regulam a produção de proteínas ligantes de cálcio. O gene para o receptor de vitamina D (VDR) está localizado no cromossoma 12 e muitos alelos variantes têm sido identificados. Recentes estudos sugerem que os polimorfismos dos receptores da vitamina D estão

associados à baixa densidade mineral óssea e devido a isso espera-se que estas variações genéticas também afetem o acúmulo de chumbo no osso³⁸.

1.5 – INFLUÊNCIA DE FATORES NUTRICIONAIS NA TOXICIDADE DO CHUMBO.

Há alguns anos reconhece-se a função do estado nutricional em alterar a suscetibilidade na exposição ao chumbo. Vários fatores nutricionais interferem na absorção, mobilização e distribuição do metal entre os ossos e tecidos moles, e na sua retenção e excreção do corpo. Dentre esses fatores, o consumo alimentar total (quantidade de calorias), a percentagem de gordura, cálcio, ferro, zinco e vitamina D influenciam a suscetibilidade à intoxicação por chumbo. As crianças são mais vulneráveis à má nutrição em geral e também ao alto risco de intoxicação. Dietas pobres em cálcio e ferro aumentam a captação de chumbo e o seu acúmulo no corpo³⁹.

1.5.1 – VITAMINA D

A vitamina D ou colecalciferol é sintetizada naturalmente na pele pela radiação ultravioleta do 7-desidrocolesterol ou pode provir de fontes vegetais (vitamina D₂; ergocalciferol) e de fontes animais (vitamina D₃; colecalciferol). Estes compostos ingeridos através da alimentação são idênticos ao colecalciferol formado na pele, exceto pela substituição de um ou mais átomos que não afetam sua função. São permutáveis entre si, apesar de diferirem nas suas taxas de metabolismo⁴⁰.

As melhores fontes dietéticas desta vitamina são: peixes de água salgada, especialmente salmão, sardinha e arenque, fígado e gema de ovo. Leite, manteiga e outros alimentos são, rotineiramente, enriquecidos com ergocalciferol (vitamina D₂) preparado pela irradiação do ergosterol de levedura. Com exposição adequada ao sol, a vitamina D não é necessária na alimentação, porém, durante a gestação, lactação e crescimento, as necessidades tornam-se maiores⁴¹. A recomendação diária (RDA) é de 400 IU (10 µg) para mulheres, crianças e homens até 22 anos.

A vitamina D ingerida é absorvida no intestino, mediada por sais biliares e ácidos graxos, entrando no plasma como um complexo proteína-quilomícron através do sistema linfático intestinal. A vitamina D ingerida e aquela que é

produzida na pele são transportadas ao fígado ligadas a uma α -globulina específica. Uma pequena parcela é transportada associada à albumina e a lipoproteínas. Esta forma da vitamina D não é a substância ativa, no fígado, é iniciado o processo de bioativação pela adição de um grupo hidroxila no carbono de posição 25, formando assim o pré-hormônio 25-hidroxivitamina D – 25(OH)D; calcidiol – que é o principal metabólito circulante da vitamina D. Outras hidroxilações ocorrem no carbono de posição 1 e 25, nos túbulos proximais do rim, formando, a 1,25-dihidroxivitamina D – 1,25(OH)₂D; calcitriol – metabólito mais ativo presente na circulação e a 24,25 dihidroxivitamina D – 24,25(OH)₂D. Também pode ocorrer formação extra-renal de 1,25(OH)₂D^{40, 42, 43}.

As hidroxilações são realizadas por enzimas que funcionam de modo coordenado e possuem domínios típicos de citocromo P 450, são chamadas 25-hidroxilase, 1 α -hidroxilase e 24,25 hidroxilase⁴⁴.

O órgão alvo mais importante do calcitriol é o intestino, embora este hormônio também atue em ossos, rins, placenta, pele e outros órgãos. O calcitriol liga-se ao seu receptor no núcleo e induz a expressão da proteína de ligação de Ca²⁺. Normalmente, o calcitriol estimula a absorção de Ca²⁺ no intestino e a mineralização do esqueleto; porém, havendo altos níveis, descalcifica os ossos, através da formação e estímulo dos osteoclastos, um efeito que é potencializado pelo hormônio da paratireóide (PTH). Eles também inibem a excreção de cálcio pelo rim, através do estímulo da reabsorção nos túbulos distais renais⁴⁵.

A ativação da vitamina D é regulada de forma importante pelo PTH. Altos níveis de PTH estimulam a produção 1,25-(OH)₂D, enquanto níveis baixos de PTH induzem formação de 24,25-(OH)₂D (Figura 3)⁴¹.

A deficiência de vitamina D é um fator de risco para doenças do metabolismo ósseo. O nível circulante de 25OHD é aproximadamente 500 a 1000 vezes maior que o nível de 1,25(OH)₂D e a sua meia-vida no sangue é mais duradoura, sendo considerada um bom indicador do consumo de vitamina D. O nível circulante de 1,25(OH)₂D é considerado um bom marcador clínico para o metabolismo mineral ósseo, pois a sua produção no rim é estritamente regulada pelos hormônios que definem os níveis de cálcio, principalmente o paratormônio⁴³.

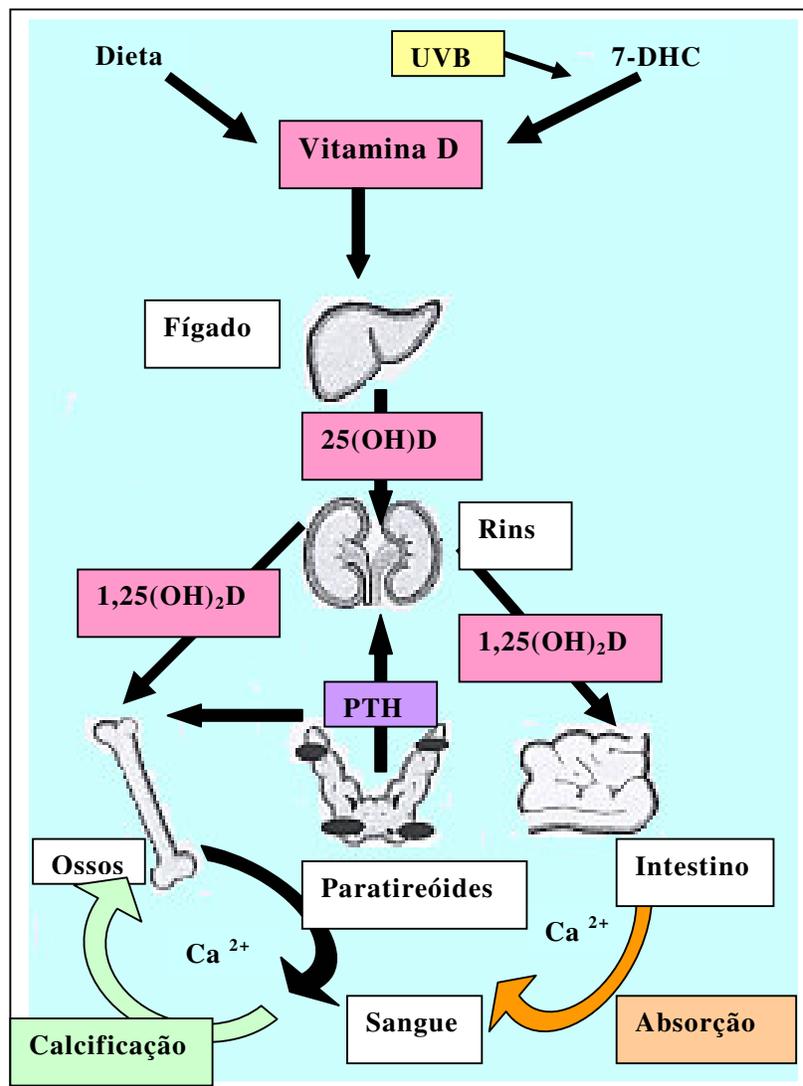


Figura 3: Metabolismo e funções da vitamina D.

7-DHC = 7- deidrocolesterol, UVB = radiação solar UVB

Fonte: Adaptado de Holick (2004)

Estudos epidemiológicos evidenciaram que níveis de 25OHD se correlacionam negativamente com níveis de paratormônio. Assim, a insuficiência de vitamina D causa hiperparatireoidismo secundário com conseqüente perda óssea^{47, 48}.

As concentrações de 25OHD podem ser medidas por Cromatografia Líquida com detecção UV, Ensaio Competitivo de Ligação a Proteína, Radioensaio, Imunoensaio Enzimático ou Ensaio Quimioluminescente de Ligação a Proteína⁴⁶. A cromatografia líquida é considerada o método mais confiável e o “padrão ouro” para determinar e validar a determinação de 25OHD no soro ou no plasma. Porém, apresenta algumas dificuldades com

relação à separação do analito de interesse de contaminantes. O problema principal na determinação de 25OHD é a molécula por si mesma, devido à insolubilidade em água e a existência de dois metabólitos quase idênticos⁴⁹.

Na validação de uma metodologia busca-se a confiabilidade analítica do método escolhido ou desenvolvido. Para iniciar os estudos de uma metodologia ou mesmo buscar confiabilidade em uma já existente, deve-se seguir um protocolo analítico que deve constar de algumas etapas:

a) *avaliação da estimativa do desvio padrão relativo*, que mede a amplitude de variação em torno da média, também é chamado de coeficiente de variação (%);

b) *cálculo da média aritmética*, que é definida como o total das observações divididas pelo número total, e pode ser usada como medida útil e segura para fazer inferências estatísticas;

c) *estudo da repetitividade*, é um parâmetro típico de precisão, é a máxima diferença aceitável entre duas repetições, do mesmo ensaio e no mesmo laboratório, sob as mesmas condições no mesmo dia (intra-ensaio) ou em dias diferentes (interensaio);

d) *avaliação da linearidade do método – curva de calibração*, usada para se obter os resultados em proporções diretas as concentrações da substância em estudo, sendo o eixo X o da concentração e o eixo Y o da resposta plotados em uma reta. O coeficiente de correlação (r), expressa a relação de X e Y da curva, e os valores ideais esperados são -1 e 1⁵⁰.

1.6 – EFEITOS DO CHUMBO NO METABOLISMO ÓSSEO E NO METABOLISMO DA VITAMINA D

Durante a vida há um contínuo processo de remodelamento ósseo que ocorre nas unidades metabólicas ósseas envolvendo uma seqüência de formação e reabsorção óssea. Durante o período de crescimento do esqueleto a formação excede a reabsorção e a massa óssea aumenta. A formação óssea é feita pelo osteoblasto que sintetiza colágeno. Este forma uma matriz orgânica na qual o cálcio é depositado como uma massa amorfa de fosfato de cálcio. O osteoblasto também sintetiza uma proteína, a osteocalcina, que é importante no processo de mineralização. A reabsorção óssea é feita pelo osteoclasto, uma grande célula

multinucleada que ataca a superfície óssea formando túneis no osso mineralizado. O chumbo se acumula no osso (meia-vida de aproximadamente 27 anos) e durante o remodelamento ósseo normal e aumentado, como na gravidez, lactação, crescimento e menopausa, ele pode ser mobilizado⁵¹.

É bem conhecido que a exposição ao chumbo afeta a absorção de cálcio a nível intestinal interferindo na formação óssea. Chumbo e cálcio competem pela ligação a sítios da proteína de transporte. Porém, mais recentemente, percebeu-se que o efeito primário que afeta este mecanismo de formação óssea é a alteração do sistema endócrino da vitamina D. O metabolismo dessa vitamina, como visto anteriormente, envolve o fígado, os rins, o intestino e os ossos⁵².

O rim é um dos principais órgãos-alvo do chumbo e um possível efeito bioquímico pode ser encontrado neste órgão, explicando, assim, mudanças no metabolismo ósseo observadas após exposição ao metal. A enzima que faz a hidroxilação do calcidiol no rim, transformando-o em 1,25-(OH)₂D necessita de uma fosforilação em um sítio inativo para sua ativação e a enzima que catalisa a formação do metabólito 24,25 dihidroxivitamina D é dependente de uma proteína quinase ligada a cálcio para se tornar ativa. O chumbo interfere nas reações ligadas ao fosfato e no processo mediado pelo cálcio, sendo estes os efeitos primários do chumbo a nível celular⁵².

Há relatos de que em crianças o aumento da absorção de chumbo leva ao decréscimo dos níveis plasmáticos de calcidiol, calcitriol e cálcio^{53, 54, 55}. Estas mudanças também foram observadas em animais por Eldenstein *et al.*, 1984 e Fullmer *et al.*, 1997. Porém, Koo *et al.* (1991) não encontraram alterações significativas no metabolismo da vitamina D, cálcio e conteúdo mineral ósseo em crianças com níveis de Pb-S de 9,7 µg/dL e estado nutricional adequado.

Devido à importância do estado nutricional para a produção de efeitos tóxicos à exposição ao chumbo, podendo determinar maior suscetibilidade, principalmente em crianças, faz-se necessário o desenvolvimento de estudos que investiguem a relação entre o consumo de nutrientes e os indicadores biológicos de exposição ao chumbo.

II – OBJETIVOS

II.1 – OBJETIVO GERAL

Este estudo faz parte de um projeto maior financiado pelo PAPES III e pela FUNASA que visa gerar dados da real exposição ambiental ao chumbo em crianças residentes na área urbana. Constitui em uma etapa fundamental para implantação de um programa preventivo de Saúde Pública, que visa a redução da exposição infantil. Para tanto, foram determinados os níveis deste metal em matrizes ambientais, os níveis de indicadores biológicos de exposição ao chumbo, parâmetros do metabolismo ósseo e fatores nutricionais em crianças. Esta dissertação tem como objetivo principal avaliar a exposição ao chumbo através dos indicadores ALA-U e ZPP e determinar a influência nutricional na toxicidade deste metal em crianças através da análise da 25OHD e do consumo alimentar de micronutrientes importantes para o metabolismo ósseo (ferro, cálcio e vitamina D).

II.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Padronizar segundo critérios analíticos uma metodologia para determinação de vitamina D (25OHD) no sangue, através da Técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) com detecção UV.
- ✓ Determinar os níveis de vitamina D (25OHD) na população estudada.
- ✓ Avaliar características sócio-econômicas, demográficas e de risco ambiental da população estudada através de questionário específico validado.
- ✓ Estudar o estado nutricional da população utilizando um questionário de frequência alimentar.
- ✓ Determinar os níveis dos indicadores de ALA-U e ZPP na população.
- ✓ Avaliar a exposição ao chumbo através dos resultados encontrados, comparando os níveis de ALA-U e ZPP com outros indicadores de exposição, parâmetros clínicos e dieta da população estudada.

III – MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto onde este estudo está inserido, bem como o questionário e termo de consentimento foram submetidos ao Conselho de Ética em Pesquisa (CEP) da ENSP/FIOCRUZ, recebendo aprovação em 11 de junho de 2001, parecer n° 24.

III.1 – EQUIPAMENTOS

- ✓ Espectrofotômetro UV/VIS, modelo 1601 A, marca Shimadzu;
- ✓ Hematofluorômetro modelo 206 D, marca Aviv;
- ✓ Cromatógrafo Líquido de Alta performance (HPLC), modelo SCL 10 A marca Shimadzu com injetor automático;
- ✓ Centrífuga Himac, modelo CR 21 E, marca Hitachi.
- ✓ Centrífuga clínica, modelo 206-R (Janetzi), marca excelso baby II.

III.2 – REAGENTES

- ✓ Etanol 99%, Aldrich, grau HPLC;
- ✓ Isopropanol 99,7%, Merck, grau analítico;
- ✓ Metanol 99,8%, Merck, grau HPLC;
- ✓ N-Hexano 87,4%, Merck, grau analítico;
- ✓ Cloridrato de ácido δ -aminolevulínico, Sigma, grau analítico;
- ✓ Padrão de 25-hidroxitamina D, Sigma, grau analítico.

III.3 – PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE VITAMINA D (25-OHD₃)

A padronização desta metodologia foi baseada em um método desenvolvido por Aksnes (1992). Este método é composto de uma extração da vitamina do plasma com hexano e uma corrida cromatográfica.

III.3.1 –Extração da vitamina do plasma

As amostras de sangue foram coletadas por punção venosa, exclusivamente, em tubos com o anticoagulante heparina. Foram imediatamente

centrifugadas por 15 minutos, à temperatura ambiente. Os plasmas foram separados e mantidos congelados até o momento da análise.

Para extração da vitamina, as amostras de plasma foram descongeladas à temperatura ambiente, sendo 500 µL colocados em um tubo de ensaio e a ele adicionados 500 µL de uma solução de metanol-isopropanol (90:10, v/v) , agitados por 15 s. Uma alíquota de 1,5 mL de n-Hexano foi adicionada aos tubos, homogeneizados por 60 s e centrifugados a 1000 g por 3 min. A camada de n-hexano foi retirada, transferida para outro tubo de ensaio e evaporada até a secura com N₂.

III.3.2 – Análise cromatográfica

Após a secura, as amostras foram redissolvidas em 125 µL de metanol e injetados 100 µL em um loop de 20 µL com autoinjeter. A coluna utilizada foi do tipo C18 (5 µm x 4mm x 150 mm) e o tempo de corrida foi de 20 min. Para a determinação da vitamina foi utilizada como fase móvel metanol-água na proporção de 85:15 (v/v). O fluxo utilizado foi de 1 mL/min, a temperatura do forno foi 30°C e o efluente da coluna foi monitorado a 265 nm com um detector U.V. conectado ao integrador que calculou as áreas dos picos cromatográficos. Os picos cromatográficos referentes a vitamina D foram detectados com o tempo de retenção de 13 min.

III.3.3 – Preparação da curva analítica

A curva analítica foi constituída de cinco diferentes concentrações (9,7, 19,5, 39,0, 78,1, 156,2 ng/mL) preparadas por uma diluição seriada do padrão (1 g/L). No primeiro tubo foram adicionados 990µL de plasma e 10µL da solução padrão da vitamina. Nos demais tubos foram adicionados 500µL de plasma. A partir daí foi feita uma diluição seriada partindo do tubo da maior concentração para o tubo de menor concentração, retirando-se 500µL do primeiro e passando para o segundo, assim por diante, até que no último tubo os 500µL retirados foram descartados. Esta curva foi preparada em todos os dias de análise.

III.4 – DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

Este estudo foi realizado em uma comunidade situada no Complexo de Manguinhos, localizado na bacia hidrográfica da Baía de Guanabara, na Baixada de Inhaúma, zona norte do Município do Rio de Janeiro. Esta região é considerada, segundo registro de situação ambiental no município, como de alto índice de poluição atmosférica, sendo a qualidade do ar ainda mais prejudicada pela proximidade da Refinaria de Manguinhos, Estação de Transferência de Lixo do Caju, além de várias outras indústrias e ausência de área verde.

O Complexo de Manguinhos é formado por onze comunidades, em que suas lideranças apontam como principais problemas, uma rede de esgoto insuficiente ou inexistente, a dificuldade de acesso aos serviços de saúde e o alto índice de desemprego. O Relatório de Desenvolvimento Humano, elaborado recentemente pela ONU, o IDH (Índice de Desenvolvimento Humano) deste bairro está em 1550 (IDH de 0,606 -médio desenvolvimento humano).

A comunidade estudada foi Parque João Goulard, que faz parte deste complexo, situada ao longo da estrada de ferro da Leopoldina sendo cortada pelos rios Faria-Timbó e Jacaré.

III.5 – DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

A população alvo foi constituída de crianças na faixa etária de 0-16 anos. Os seguintes critérios de inclusão foram adotados:

1. Concordância em participar do estudo e para isso foi firmado um termo de compromisso com os pais ou responsáveis.
2. Morar na residência há no mínimo três meses.
3. Ter idade entre 0-16 anos.
4. Não possuir doença debilitante principalmente renal ou hematológica.

III.6 – DESCRIÇÃO DA ROTINA OPERACIONAL.

Este trabalho foi realizado junto ao Programa de Saúde da Família (PSF) e ao Laboratório de Análises Clínicas do Centro de Saúde Escola Germano Sinfal Faria (CSEGSF). As famílias foram visitadas em suas residências por agentes de saúde e membros da equipe do Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH). Nesta ocasião foram convidadas a participar do projeto, obtendo todas os esclarecimentos e concordando em participar através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Assim, eram agendados o dia de coleta de material biológico e entrevista.

Foi aplicado um questionário para obtenção das seguintes variáveis: idade, sexo, escolaridade, tempo de residência na área, características físicas e localização das residências, destino do lixo, descrição das atividades ocupacionais, frequência das avaliações de saúde, hábitos de fumar e beber e hobbies dentre outros (Anexo I).

A avaliação nutricional foi realizada através de um questionário de frequência alimentar que objetivou conhecer e estimar o consumo diário de grupos de alimentos mais consumidos de acordo com RDA (Recommended Dietary Allowances, 1989) e DRI (Dietary References Intakes, 1997), por faixa etária e sexo.

III.7 – DELINEAMENTO DO ESTUDO

Foi adotado um modelo epidemiológico transversal (“cross-sectional”) para determinar a associação entre a exposição e a possibilidade de efeitos à saúde, em um dado ponto do tempo. Participaram do estudo 65 crianças.

III.8 – DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CHUMBO EM MATRIZES AMBIENTAIS.

Este trabalho está inserido em um projeto maior, que teve como um de seus objetivos determinar os níveis de chumbo em diferentes matrizes ambientais. Para enriquecer os dados obtidos nesta dissertação, os resultados da avaliação ambiental foram aqui acrescentados.

A determinação das concentrações de chumbo em solo, água, poeira e ar foram realizados por Espectrometria de Absorção Atômica. A partir destes

dados, foram conduzidos cálculos de determinação da Dose Potencial e do Fator Risco para crianças para avaliação da exposição ao chumbo através da ingestão e por via inalatória. Foram utilizados para o cálculo dos riscos as médias dos valores encontrados na FIOCRUZ e em João Goulard, para as matrizes solo, poeira e ar. Os parâmetros considerados encontram-se no Anexo II.

III.9 – DETERMINAÇÃO DOS INDICADORES BIOLÓGICOS

As metodologias utilizadas seguiram os Procedimentos Operacionais Padrões estabelecidos no Laboratório de Toxicologia do CESTE/ENSP/FIOCRUZ.

III.9.1 – Determinação de chumbo em sangue (Pb-S) e de chumbo na urina (Pb-U)

Os níveis de Pb-S e Pb-U foram determinados de acordo com o Procedimento Operacional Padrão do Setor de Metais do Laboratório de Toxicologia do CESTE (Anexo III).

III.9.2 – Determinação de Zinco Protoporfirina Eritrocitária (ZPP)

As análises de ZPP foram realizadas no mesmo dia da coleta, no setor de indicadores de efeito. As amostras de sangue foram agitadas durante 1 hora. Cerca de 50 µL de sangue foram colocados em lamínulas e analisados em hematofluorômetro, após ajuste utilizando uma lamínula vazia como branco. A leitura foi feita em comprimento de excitação e emissão de 415 nm e 569 nm, respectivamente.

Foram utilizados os seguintes controles de calibração: 1,74 µg/g de Hb (baixo), 3,63 µg/g de Hb (médio) e 10,14 µg/g de Hb (alto) da marca AVIV, sendo considerado como limite aceitável um coeficiente de variação de 10%⁵⁸. Os valores obtidos foram convertidos para µmol/mol de heme para comparação com a literatura que utiliza na maioria das vezes esta unidade.

III.9.3 – Determinação de ALA urinário (ALA-U)

A determinação da concentração de ALA-U foi realizada pelo método de Ogata & Taguchi modificado (1987), que consiste no uso de metilacetoacetato na etapa de condensação e formação do ALA-pirrol, e do n-butanol para diminuir o número de interferentes encontrados na urina, impedindo a formação

de outros pirróis. Esta análise foi realizada no Setor de Indicadores de Efeito. As amostras de urina foram mantidas congeladas até o momento da análise. A 1 mL de urina foram adicionados 0,2 mL de ácido acético 60% e 2 mL de n-butanol. Foram acrescentados 500 µL de tampão fosfato de potássio 1 M, pH 6,8 e 100 µL de metilacetato a 500 µL da fase aquosa. A mistura foi aquecida a 100°C por 10 minutos. Após resfriamento em gelo por 3 min, 110 µL foram injetados com injetor automático no cromatógrafo líquido.

Foi utilizada uma curva de calibração com cloridrato de ALA nas concentrações 2,5, 5, 10, 20 e 40 mg/mL.

A Cromatografia Líquida de Alta Performance (HPLC) foi realizada em coluna de fase reversa C18 (4,6 µm x 4,0 mm x 150 mm) com a fase móvel de acetonitrila/KH₂PO₄ 50 mM, pH 2,5 na proporção 20:80, fluxo de 1 mL/min, temperatura do forno de 40°C e detecção U.V. a 260 nm. O tempo de corrida foi de 20 min, o loop de 20 µL e o volume de injeção de 110 µL. Os picos cromatográficos referentes ao ácido δ-aminolevulínico foram detectados com o tempo de retenção de 8 min.

III.10 – ANÁLISE DOS INDICADORES CLÍNICOS

Além dos indicadores biológicos de exposição ao chumbo, foram realizados exames de rotina, urinálise e hemograma, para verificar possíveis alterações clínicas. Estes procedimentos seguiram protocolos de análise do Laboratório de Análises Clínicas do CSEGSF/ENSP/FIOCRUZ.

III.10.1 – Determinação de Cálcio urinário (Ca-U)

A determinação do cálcio urinário foi realizada pelo Setor de Metais do Laboratório de Toxicologia do CESTEHE (Anexo IV).

III.10.2 – Análise de creatinina

A creatinina foi analisada utilizando-se o kit fornecido pela Bioclin, que consiste na redução do ácido pícrico em meio alcalino, a ácido picrâmico, que apresenta cor alaranjada, a qual é medida em espectrofotômetro em 510 nm. Os valores de ALA-U, Pb-U e Ca-U foram corrigidos pelos valores obtidos com esta dosagem.

III.11 – ANÁLISE DOS RESULTADOS

O software estatístico SPSS 12.0 foi utilizado na análise dos resultados. Para tratar os dados foram utilizadas as estatísticas descritivas, média aritmética, valor mínimo, valor máximo e desvio padrão, das variáveis contínuas. Também foi verificada a dispersão dos dados através do teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis que não apresentaram distribuição normal foram logaritmizadas. Para as variáveis categóricas foram utilizadas proporções na análise.

As crianças foram divididas em grupos de acordo com suas características fisiológicas e nutricionais e a análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificar possíveis diferenças entre os grupos, através dos testes de Scheffe's, Bonferroni's e Tukey. Também foram feitas as correlações simples para avaliar a magnitude da associação das variáveis por determinação do coeficiente de correlação ao nível de significância de 95 %. Estas análises forneceram dados para a realização de modelos de regressão linear múltipla, onde os indicadores foram adicionados a modelos separados para testar sua capacidade em prever efeitos hematológicos como a redução dos níveis de hematócrito e hemoglobina, e efeitos na razão cálcio creatinina urinária. Além destes, outro modelo testado está relacionado à capacidade da ingestão de nutrientes prever os níveis dos indicadores de efeito.

IV – RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1 - PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA PARA DETERMINAÇÃO DE VITAMINA D (25-OHD₃) E DETERMINAÇÃO DOS SEUS NÍVEIS NA POPULAÇÃO.

Muitos esforços têm sido feitos para definir um valor de referência para a concentração de 25OHD necessária para o diagnóstico da sua deficiência, sendo estabelecido que são aceitáveis os valores acima de 20 ng/mL. Porém, vários estudos têm apontado a variabilidade interlaboratorial nas medidas de 25OHD como dificuldade para o estabelecimento deste valor de referência^{49, 62, 63}.

Para a padronização desta metodologia foram avaliadas: a repetitividade, a linearidade e os limites de detecção e determinação.

Tabela 1: Teste interensaio para padronização da metodologia de análise de 25OHD.

<i>Conc(ng/mL)</i>	<i>Curva 1</i>	<i>Curva 2</i>	<i>Curva 3</i>	<i>DP</i>	<i>Média</i>	<i>CV (%)</i>
9,7	2185	1664	1730	231,6	1859,6	12,4
19,4	3481	2114	2943	562,2	2846,0	19,8
38,8	6178	5484	5806	283,5	5822,6	4,9
77,6	9814	9646	11757	957,9	10405,6	9,2
155,2	19174	16234	19572	1488,6	18326,6	8,1

DP = Desvio-Padrão, CV(%) = Coeficiente de Variação.

Neste estudo, três curvas analíticas foram preparadas e analisadas em dias diferentes (interensaio). A tabela 1 mostra os desvios-padrões (DP), as médias das áreas obtidas, calculadas pelo equipamento, e os coeficientes de variação (CV%) obtidos no teste interensaio. As maiores concentrações apresentaram coeficientes de variação aceitáveis, inferiores a 10 %. Porém, as concentrações menores apresentaram coeficientes mais altos, possivelmente fruto da interferência da matriz, dada a sua complexidade, ou mesmo do processo de preparação da amostra. Aksnes (1992), encontrou uma variabilidade intraensaio de 6 %, porém não estudou a variabilidade interensaio. Turpeinen *et al* (2003) propôs um método para determinação de 25OHD, que também foi baseado no método de Aksnes, e obteve coeficientes de variação intraensaio de 4 a 17 %, e alerta que a concentração de metanol na fase móvel é crítica para a separação do analito.

Também foi calculada a linearidade do método através das curvas de calibração e respectivos coeficientes de correlação. Para isto, as concentrações

da substância em estudo e a resposta do equipamento (área) foram plotadas em uma reta, no eixo x e y, respectivamente (Figura 4). Como descrito anteriormente, a curva foi preparada para todos os dias de análise e utilizada para o cálculo das concentrações da vitamina nas amostras desconhecidas. Devido à variabilidade encontrada, é necessária a preparação de uma curva de calibração em todos os dias de análise.

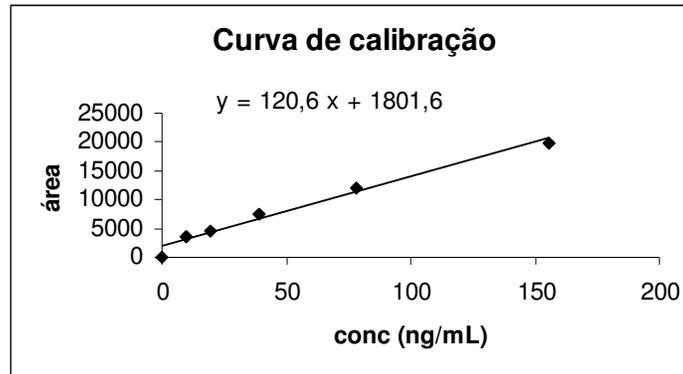


Figura 4: Curva de calibração com as médias das áreas das curvas ($r = 0,989$).

O limite de detecção calculado neste estudo foi de 0,6 ng/mL, através da análise das concentrações de dez indivíduos e uma curva, preparada no mesmo dia. Para este cálculo foi utilizada a relação entre três vezes o desvio-padrão e o ângulo da curva. O limite de determinação foi de 4,9 ng/mL calculado através de cinco repetições consecutivas ($CV = 12,8 \%$). Aksnes (1992), obteve um limite de detecção de 2 ng/mL. Tupeirnen *et al* (2003) obtiveram um limite de detecção de 1,2 ng/mL e um limite de quantificação de 4 ng/mL. Deste modo, o limite de detecção e de determinação calculados neste estudo são similares àqueles calculados em outros estudos baseados no mesmo protocolo analítico, sendo suficientes para detectar níveis de vitamina D insuficientes, ou seja, menores que 20 ng/mL.

No presente estudo, 55 crianças foram avaliadas quanto aos níveis de 25OHD, esta variável não apresentou distribuição normal e por isso, foi logaritmizada para a análise estatística. Para estas mesmas crianças foram determinados os níveis de paratormônio através da técnica de Quimioluminescência, metodologia padronizada no estudo mais amplo no qual esta dissertação está inserida. Assim como descrito na literatura, obteve-se uma correlação negativa significativa entre os valores de paratormônio e 25OHD (r

= - 0,332, $p = 0,018$, $n = 50$), mostrada na figura 5^{47, 48}. Isto demonstra que a metodologia padronizada é específica para a análise de 25OHD.

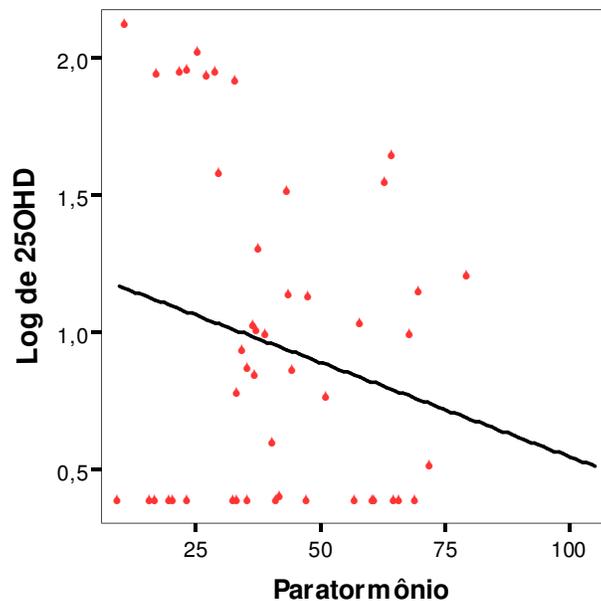


Figura 5: Correlação entre os níveis de 25OHD e Paratormônio.

Segundo Lips (2004), o valor mínimo necessário de 25OHD é de 20 ng/mL. Abaixo deste valor ele classifica as deficiências como: suave, de 10 a 20 ng/mL, moderada, de 5 a 10 ng/mL e grave, abaixo de 5 ng/mL.

As crianças avaliadas apresentaram valores médios de 18 ng/ml. Aquelas que obtiveram níveis abaixo do limite de determinação ($n=25$, 38,5 %) foram consideradas como o valor do limite (4,9 ng/mL), sendo caracterizadas como apresentando uma deficiência grave, dez crianças (15,4 %) apresentaram valores entre 5 e 10 ng/mL e foram caracterizadas como apresentando uma deficiência moderada, 11 crianças (16,9 %) com deficiência suave (valores entre 10 e 20 ng/mL) e 9 crianças (13,8 %) foram classificadas como apresentando níveis suficientes. A figura 6 mostra a distribuição do logaritmo da concentração de 25OHD pela classificação de Lips (2004).

A tabela 2 mostra as médias de 25OHD obtidas e classificadas segundo Lips (2004), além do consumo de vitamina D de acordo com a RDA (1989).

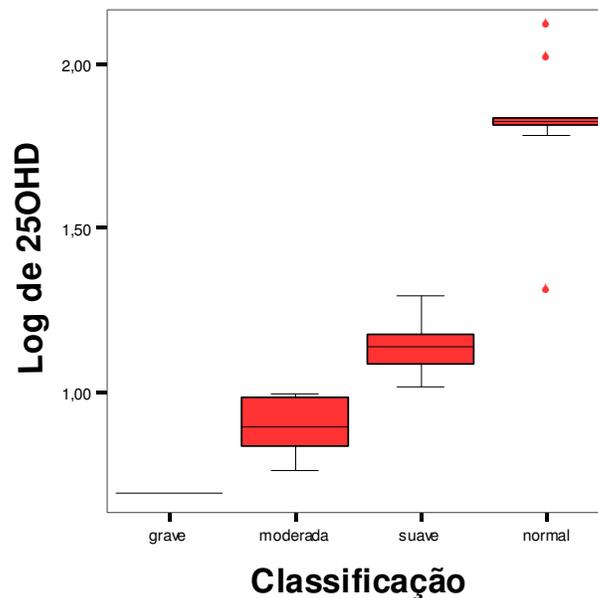


Figura 6: Distribuição do logaritmo da concentração de 25OHD pela classificação de Lips, 2004.

Através do questionário de frequência alimentar foi possível distinguir as deficiências grave e suave dos níveis normais, porém não foi possível distinguir a deficiência moderada dos níveis normais. Este tipo de questionário é suscetível a viés de informação, pois o entrevistado pode não ser o responsável pelos cuidados com a criança ou não ter atentado aos detalhes da alimentação.

A metodologia padronizada foi capaz de diferenciar os diferentes níveis de classificação da concentração de vitamina D no plasma, apresentando diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$).

Tabela 2: Níveis médios de 25OHD e consumo de vitamina D segundo a classificação de Lips (2004).

	25OHD			Consumo de vitamina D		
	N	Média*	DP	N	Média**	DP
Normal	9	71,8	29,7	9	11,6	24,2
Suave	11	13,8	2,7	10	7,4	14,3
Moderada	10	7,8	1,5	10	11,8	25,2
Grave	25	4,9	0,0	24	3,6	2,8

DP = Desvio-Padrão, ng/mL, * ng/mL, ** μ g.

A deficiência de vitamina D pode causar a desmineralização dos ossos devido a um aumento dos níveis de PTH. O sintoma mais comum nas crianças é o raquitismo. Este se caracteriza por formação contínua de matriz osteóide e cartilagem, que são inadequadamente mineralizadas, resultando em ossos moles e flexíveis. Os casos de deficiência de vitamina D que ocorrem são vistos mais frequentemente em grupos de baixa renda. Porém, também podem ocorrer em casos de má absorção de gordura ou em doenças graves do fígado e rim⁴¹. Dentre as crianças avaliadas neste estudo, aquelas que foram classificadas no grupo com deficiência grave de vitamina D não foram observados os sintomas acima descritos.

Foram encontrados valores acima de 100 ng/mL em duas crianças. Estes valores foram associados a um alto consumo de alimentos ricos nesta vitamina. A vitamina D pode apresentar toxicidade, que pode causar excessiva calcificação óssea e calcificação dos tecidos moles, como o rim (incluindo cálculos renais), pulmões e até mesmo a membrana timpânica do ouvido, o que pode resultar em surdez. O nível tóxico não foi estabelecido para todas as idades, mas lactentes e crianças pequenas são mais suscetíveis. Um consumo de 45 µg por dia tem sido associado a hipervitaminose em crianças pequenas. A toxicidade deve ser monitorada quando grandes quantidades de vitamina D (25 µg ou mais) são administradas por um longo período⁴².

IV.2 - CARACTERÍSTICAS SÓCIO-ECONÔMICAS E DEMOGRÁFICAS.

O Parque João Goulart apresenta topografia plana, sendo 96,2% das casas de alvenaria. O abastecimento da água é feito pela rede pública, sendo que 55,3% não têm tratamento intradomiciliar, e todas as residências apresentam encanamento de PVC. Quanto ao destino do esgoto, 67,4% das casas estão ligadas à rede geral, porém 32,6% são jogados a céu aberto. Quanto ao destino do lixo, todas as residências têm coleta do lixo domiciliar.

Participaram do presente estudo 23 famílias que foram contatadas pelos respectivos agentes de saúde do PSF responsáveis pelas cinco microáreas. As visitas foram feitas pela equipe do projeto e pelos agentes de saúde. Estas famílias residem em média há nove anos nesta comunidade. Dos domicílios participantes, 50% possuem dois cômodos, 25% têm 1 ou 3 cômodos

respectivamente. A maioria das casas apresenta piso de cerâmica (66,67%), sendo que os de cimento e vermelhão equivalentes (16,67%). A totalidade das casas nunca foi pintada durante o período de moradia no local. O tipo de piso da casa pode ser uma fonte de exposição, principalmente o tipo vermelhão. Possuem o hábito de limpar a poeira de casa mais de uma vez por dia 23%, uma vez por dia 61% e duas ou mais vezes por semana 15%. Os responsáveis declararam que ele ou alguém em sua casa trabalha ou já trabalhou em atividades relacionadas à exposição ao metal (67 %) tais como indústrias de plástico, cerâmica, pintura e soldagem, dentre outros.

Em relação aos responsáveis, 80% sabem ler e escrever, sendo que 13,3% possuem o ensino médio completo e incompleto, 7 % ensino fundamental completo e 53,3 % possuem ensino fundamental incompleto. Este nível de instrução expressa que esta comunidade está próxima ao nível de instrução funcional, embora ninguém tenha se declarado analfabeto⁶⁴.

Quanto ao estado civil, 40% relatam união livre, 13,3% como casados e o mesmo percentual como solteiros. Quanto ao número de filhos foi relatado que 40% tem 3 , 20% tem 7, 33,3% tem 2 e 6,7% apenas 1 filho, acarretando em taxas de fecundidade adequadas para a reposição demográfica. Quanto a escolaridade das crianças, 90,8% delas estão na escola.

A Tabela 3 apresenta algumas características dos participantes (n=65). Quanto aos hábitos importantes para a avaliação do risco da exposição ao metal, estas crianças apresentam os hábitos de comer: reboco (18,4%), terra (21,0%), areia (2,6%), lápis de cera (5,3%), lápis (23,7%), borracha (7,9%), plástico (5,3%) e outros (sabão, pasta de dente, giz e etc- 15,8%). Em relação ao hábito de chupar chupeta ou o dedo, 39,3% das crianças o apresentavam e 59% destas não apresentavam este hábito.

Tabela 3: Características das crianças e seus responsáveis.

Características		%
Sexo	Masculino	53,12
	Feminino	46,88
Idade	Grupo 1	0 a 3 anos 17,19
	Grupo 2	4 a 7 anos 37,50
	Grupo 3	8 a 16 anos 45,31
Escolaridade do responsável	Médio completo	13,30
	Médio incompleto	13,30
	Fundamental completo	7,00
	Fundamental incompleto	53,30
Trabalhou ou trabalha em Atividade relacionada ao metal?	Sim	67,69
	Não	23,08
Fuma regularmente?	Sim	41,54
	Não	58,46
Como é o piso da casa?	Cimento	16,67
	Vermelho	16,66
	Cerâmica	66,67
N° de cômodos	1	50
	2	25
	3	25
Estado civil	União livre	40
	Solteiro	13,3
	Casado	13,3
N° de filhos	1	6,7
	2	33,3
	3	40
	Mais de 3	20

IV.3 – DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CHUMBO EM MATRIZES AMBIENTAIS.

Apesar da principal via de exposição ser alimentar, o ambiente produz uma exposição adicional, que pode ser exemplificada pela poeira, água, solo ou ar contaminados. Em relação aos resultados da análise dos níveis de chumbo nas matrizes ambientais, foi utilizado o parâmetro de orientação estabelecido pela Academia Americana de Pediatria (Pb-solo até 200 ppm). Para análise do solo foram coletadas 50 amostras em profundidades diferentes (0-5cm e de 10-15 cm) num total de sete pontos (Anexo V). Três amostras analisadas apresentam concentração acima do referido, com 218,4 mg/Kg (ponto A); 238,2 mg/Kg e 280,3 mg/Kg (ambas no ponto D). As outras amostras ambientais demonstraram níveis baixos de contaminação dentro dos limites da EPA. Na Tabela 4 encontram-se os valores médios do chumbo nas matrizes ambientais estudadas.

Tabela 4: Valores médios do chumbo nas matrizes ambientais.

<i>Matriz</i>	<i>VR*</i>	<i>Fiocruz</i>	<i>João Goulard</i>
Solo ($\mu\text{g/g}$)	EPA – 400 AAP - 200	111,6	35,1
Água ($\mu\text{g/L}$)	EPA – 1,5	---	$5,6 \times 10^{-1}$
Ar ($\mu\text{g/m}^3$)	OMS – 0,5 EPA – 1,5	$9,6 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-1}$
Poeira ($\mu\text{g/m}^2$)	OMS – 5,38	1170,5	92,3

*VR = Valor de Referência.

A partir destes dados, foram conduzidos cálculos para a determinação da dose potencial e do fator de risco para as crianças para a avaliação da exposição ao chumbo através da ingestão e da via inalatória. Os valores da dose potencial para o solo ultrapassaram a dose de referência (DRf) preconizada pela EPA (2000). O fator de risco neurológico por ingestão foi 13 vezes superior a DRf e o fator de risco por inalação foi 1,2 vezes maior que a DRf (Tabela 5).

Tabela 5: Média da Dose Potencial e do Fator de Risco Neurológico estimado, considerando todas as coletas realizadas.

<i>Matriz</i>	<i>Dose Potencial (mg/Kg/dia)</i>	<i>Fator de Risco Neurológico (mg/Kg/dia)</i>
Solo	$9,9 \times 10^{-4}$	13,0
Água	$4,4 \times 10^{-5}$	0,56
Poeira	$1,7 \times 10^{-5}$	0,21
Ar	$8,7 \times 10^{-5}$	1,0
Solo + Água	$1,0 \times 10^{-3}$	13,2
Poeira + Ar	$1,0 \times 10^{-4}$	1,2

IV.4 - AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS NUTRICIONAIS.

Uma estimativa diária do consumo de nutrientes de interesse foi elaborada a partir da avaliação do questionário de frequência alimentar. O consumo individual diário de cálcio, ferro, vitamina D, proteínas e calorias totais (Kcal) foi comparado a RDA (Recomendação Diária Aceitável, 1989), e baseado nesta, os valores médios calculados para a ingestão de ferro, vitamina D e calorias se encontram abaixo dos recomendados. A Tabela 6 mostra a análise descritiva da estimativa do consumo alimentar. O questionário utilizado e a RDA (Recomendação Diária Aceitável, 1989) encontram-se no Anexo VI.

A maioria das crianças encontra-se abaixo da RDA para ferro (68,2 %), cálcio (74,2 %) e vitamina D (59,1 %), além do consumo total de calorias (75,8 %). Por outro lado grande parte das crianças estudadas encontra-se acima da RDA para proteínas (80,3 %), no entanto, é importante observar a contribuição para a estimativa desses valores, devido ao enriquecimento de certos alimentos (biscoitos recheados, salgadinhos e outros petiscos).

Tabela 6: Frequência alimentar das crianças comparada a RDA de 1989.

	Consumo Médio				
	N	Média	DP	Mínimo	Máximo
Calorias (Kcal)	63	1510	996	429	6789
Proteína (g)	63	56	35	13	251
Cálcio (mg)	63	570	493	130	3570
Ferro (mg)	63	8	6	0,97	42
Vitamina D (µg)	62	8	17	0,31	82

DP = Desvio Padrão

A tabela 7 apresenta o número e o percentual de crianças que não atingem nem 50 % da RDA, aquelas que atingem esse nível e as que excedem.

Tabela 7: Percentual de crianças com relação ao alcance da RDA.

	< 50 % RDA		= 50 % da RDA		> 50 % RDA	
	n	%	n	%	N	%
Calorias (Kcal)	21	32	39	60	3	5
Proteína (g)	6	9	28	43	29	45
Cálcio (mg)	31	48	29	45	3	5
Ferro (mg)	31	48	29	45	3	5
Vitamina D (µg)	18	35	26	50	6	12

RDA = Recomendação Diária Aceitável

O estado nutricional como causa de várias doenças forma a base de muitos programas de saúde pública. Os alimentos e a água vêm sendo há muito tempo suplementados com vitaminas ou minerais em quantidades traço para a prevenção de doenças. Estudos experimentais, avaliações clínicas e epidemiológicas foram usados para estabelecer a associação entre o estado nutricional e a suscetibilidade à toxicidade do chumbo³⁹.

Os experimentos com animais têm mostrado como os nutrientes modificam a toxicidade do chumbo e, mais recentemente como o chumbo modifica o metabolismo destes. Ratos alimentados com uma dieta pobre em cálcio têm concentrações de Pb-S cerca de quatro vezes maior que aqueles alimentados com uma dieta normal desse nutriente, quando as quantidades ingeridas de chumbo foram iguais. As concentrações de chumbo no osso também aumentam com uma dieta pobre em cálcio. As primeiras observações em roedores foram também confirmadas em muitas espécies incluindo a humana^{39, 66}.

As características da dieta humana são mais complexas, porém, estudos têm confirmado a associação entre um estado nutricional marginal e a suscetibilidade a toxicidade do chumbo, mas raramente mostra a magnitude dos efeitos identificados como nos experimentos em animais. Nos Estados Unidos, os níveis de Pb-S foram reduzidos durante as duas últimas décadas em aproximadamente 80 % das crianças, reflexo de intervenções primárias, como por exemplo, a remoção do metal da gasolina e de soldas das latas de alimentos, e por estratégias de prevenção secundária como intervenções nutricionais. A prevenção secundária esta focada na redução da carga corpórea de Pb e dos seus efeitos tóxicos decorrentes da absorção. Muitas características que reduzem a suscetibilidade à toxicidade do chumbo (refeições regulares, baixa ingestão de gorduras, adequada ingestão de ferro e cálcio) são as mesmas recomendadas para uma dieta saudável^{39, 67}.

IV.5. AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO AO CHUMBO

O monitoramento biológico foi definido como a medida e avaliação de agentes químicos ou seus metabólitos em tecidos, secreções, ar expirado, ou qualquer combinação destes para avaliar a exposição e o risco a saúde, comparado a referência apropriada⁶⁸. Os valores dos xenobióticos ambientais e

ocupacionais, ou os seus metabólitos em indivíduos não expostos são chamados valores de referência e nos permitem avaliar a existência e o grau de exposição para identificar e monitorar os indivíduos em situação de risco, correlacionando a dose do xenobiótico com efeitos específicos e desejavelmente reversíveis⁶⁹.

O Brasil é um dos países onde não foram implantados programas educacionais com relação à prevenção da intoxicação e ainda são realizados poucos estudos ambientais. Muitos dos valores de referência utilizados foram transcritos de legislações internacionais e estão muito acima dos valores recomendados atualmente.

A tabela 8 apresenta uma análise descritiva dos indicadores de exposição ao chumbo nas crianças de 0 a 16 anos. Para o indicador Pb-S, que é considerado o “padrão ouro” na avaliação da exposição ao chumbo, foram encontradas médias de 5,6 µg/dL para meninas (n=30) e 5,5 µg/dL para meninos (n=32). Embora a média de Pb-S para todas as crianças estudadas tenha sido de 5,5 µg/dL, 4,8% delas apresentaram níveis acima de 10 µg/dL, com média de 11,4 µg/dL, demonstrando uma exposição preocupante. O valor de referência (VR) atual do CDC para crianças menores de 6 anos é menor que 10 µg/dL, porque são particularmente vulneráveis a exposição ao Pb, como já relatado⁷⁰.

Tabela 8: Indicadores biológicos de exposição ao chumbo.

	N	Média	DP	Mínimo	Máximo	VR
Pb-S (µg/dL)	63	5,6	2,3	1,0	13,6	≤10
Pb-U (µg/g cr)	52	0,5	0,2	0,2	1,0	≤2,7
ALA-U (mg/g cr)	53	2,9	1,1	0,8	6,6	≤4,0
ZPP (µg/gHb)	65	3,2	5,9	1,1	47,7	≤3,6

DP = Desvio Padrão

Como relatado anteriormente, as crianças foram divididas em três grupos, de acordo com as características fisiológicas e nutricionais, assim distribuídas: **grupo 1** (1 a 3 anos), **grupo 2** (4 a 7 anos) e **grupo 3** (8 a 16 anos). Embora este estudo não tenha encontrado diferenças significativas para o Pb-S, o valor médio para o Grupo 1 (média 6,3 µg/mL n=12) é maior do que os outros grupos (Figura 7).

Neste estudo, 40,3 % (n = 25) das crianças avaliadas, apresentaram valores de Pb-S acima de 6 $\mu\text{g/dL}$ que foi adotado como ponto de corte. O valor médio deste indicador para estas crianças foi de 7,8 $\mu\text{g/dL}$.

Sexo e idade foram os principais fatores de risco encontrados para concentrações excessivas de Pb-S em crianças no “National Health and Nutrition Examination Surveys II” (NHANES II) e NHANES III nos Estados Unidos. O NHANES III conduzido durante 1988 a 1994 e o NHANES 1999 (publicado em 2002) indicaram que as concentrações de Pb-S na população americana continuam a cair. No entanto, a concentração em crianças com idade entre 1 e 5 anos parece ser mais alta entre a população que vive em grandes áreas metropolitanas ou em construções antigas⁷⁰.

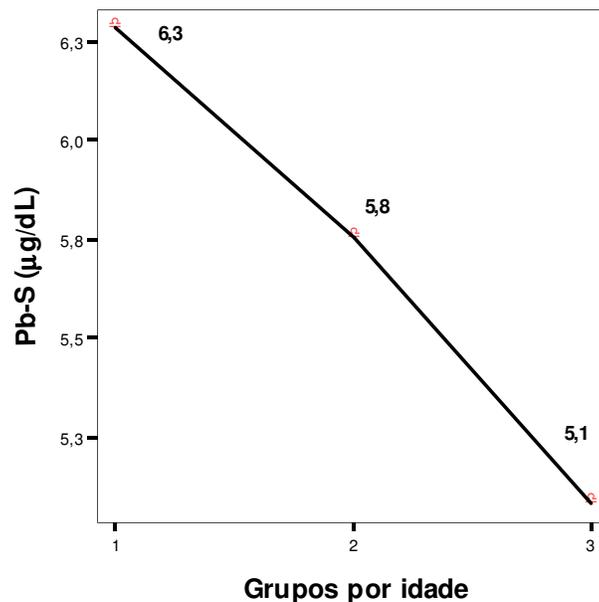


Figura 7: Valores médios de Pb-S por grupos de idade.

Um valor limiar, abaixo do qual o chumbo não produz efeito no desenvolvimento, ainda não foi identificado, portanto, este metal ainda não tem uma NOAEL definida. Em 1991, o CDC estabeleceu o valor de 10 $\mu\text{g/dL}$ de Pb-S em crianças como um “ponto sinalizador” para a investigação da exposição ao chumbo. Este nível de Pb-S foi estabelecido com a intenção de servir de ferramenta para o gerenciamento e avaliação do risco em diferentes comunidades. Geralmente tem sido interpretado como um limiar, assim o nível

menor que 10 µg/dL é visto como “seguro” e um nível maior como “tóxico”. Porém, um simples número não pode ser citado como um limiar, separado do contexto de fatores como o tempo e avaliação da exposição, a duração da elevação do Pb no sangue e características do ambiente onde a criança cresce.

Poucos dados estavam disponíveis sobre possíveis efeitos abaixo de 10 µg/dL e em 1991 o CDC declarou que efeitos adversos ocorrem nesta faixa. Dentre as crianças do estudo prospectivo de Boston, para aquelas que a média do nível de Pb-S na idade de 2 anos foi 7 µg/dL, foi encontrada uma associação significativa entre nível de Pb-S e QI⁷.

No NHANES III, entre 4853 crianças de 6 a 16 anos de idade, Pb-S foi inversamente associado a 4 medidas de função cognitiva, mesmo quando a amostragem foi restrita a crianças com níveis de Pb-S menores que 5 µg/dL. O histórico do Pb-S das crianças não estava disponível, todavia é possível que seus níveis tenham sido muito maiores em idade menor e que esses foram responsáveis por performance tardia nas crianças com altos níveis de Pb-S concorrente⁷.

Os níveis de Pb-U têm sido usados em exposições contínuas, particularmente no monitoramento biológico de exposições ocupacionais. Quando ocorre o aumento da exposição, as suas concentrações aumentam gradualmente, entrando em um estado de equilíbrio após semanas¹⁹. Os valores médios de Pb-U observados foram de 0,5 µg/dL para os meninos e 0,4 µg/dL para as meninas. Apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas entre os sexos e os grupos de idade, assim como para Pb-S, o grupo 1 apresentou os níveis de Pb-U maiores que os demais grupos (0,6 µg/dL, n=8).

Alguns autores sugerem a utilização da determinação dos níveis do ALA-U por HPLC como teste de ‘screening’ para estudar a exposição humana por chumbo, este método mostra maior especificidade, principalmente em baixas concentrações de Pb-S, caracterizando uma percentagem maior de indivíduos abaixo de 4,5 mg/g cr de ALA-U³². Estes autores encontraram uma correlação estatisticamente significativa entre Pb-S e ALA-U ($p = 0,01$, $r = 0,739$) em dois grupos de trabalhadores, cabistas da companhia telefônica e trabalhadores de fábricas de baterias, localizadas no Rio de Janeiro.

Ainda com relação ao ALA-U, as crianças estudadas neste trabalho apresentaram valores médios de 2,9 mg/g cr, sendo que 11 % (n = 7) delas apresentaram valores acima de 4,5 mg/g cr, com média de 5,0 mg/g cr. Caracteriza-se exposição ambiental ao metal nesta percentagem da população, visto que o VR estabelecido pela legislação brasileira para adultos é de até 4,5 mg/g cr e a NR-7 do Ministério do Trabalho preconiza 10 mg/g cr como Índice Biológico Máximo Permitido (IBPM) para trabalhadores expostos ao chumbo. Ogata & Taguchi (1987) encontraram o valor médio de 1,2 mg/g cr em adultos saudáveis não expostos ocupacionalmente. Este indicador também mostrou diferença significativa ($p < 0,01$) entre os grupos de idade 1 e 3 (Figura 8). O grupo 1, que é constituído pelas crianças de 1 a 3 anos, é aquele que apresentou valores médios de Pb-S maiores, demonstrando que as crianças nesta faixa de idade estão mais propensas a exposição devido ao seu comportamento e características fisiológicas já comentadas. Deste modo, ao contrário do Pb-S, este indicador foi capaz de diferenciar o grupo mais suscetível dos demais, permitindo a identificação da exposição.

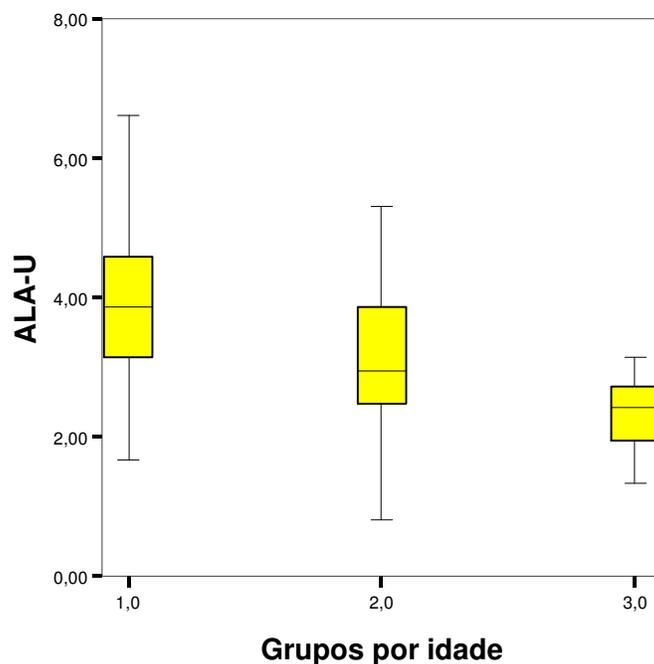


Figura 8: Distribuição dos indicadores biológicos ALA-U por grupos de idade.

A média de ZPP encontrada para as meninas foi de 93 $\mu\text{mol/mol}$ heme (3,6 $\mu\text{g/g}$ Hb) e a média para meninos foi de 72,4 $\mu\text{mol/mol}$ heme (2,8 $\mu\text{g/g}$ Hb). O valor médio de ZPP para todas as crianças foi de 87,7 $\mu\text{mol/mol}$ heme (3,2 $\mu\text{g/g}$ Hb). Esta variável não apresentou distribuição normal e foi logaritimizada para comparação entre os grupos de idade e sexos, não apresentando diferenças significativas. Os valores de ZPP apresentaram uma distribuição de valores ampla pois uma criança apresentou um valor muito alto de 47,70 $\mu\text{g/g}$ Hb (1232 $\mu\text{mol/mol}$ heme), encontrado somente em trabalhadores com exposição muito elevada⁷¹. Soldin *et al.* (2003) conduziu um estudo com 6478 crianças de 0 a 17 anos para estabelecer valores de referência para ZPP; foram encontradas médias de 44,7 $\mu\text{mol/mol}$ heme para meninas e 44,3 $\mu\text{mol/mol}$ heme para meninos. No presente estudo, 78,5 % (n=51) das crianças tiveram valores de ZPP acima de 44 $\mu\text{mol/mol}$ heme. Este percentual elevado deve-se às deficiências nutricionais encontradas, especialmente de ferro, porém a exposição ao chumbo pode estar contribuindo para os elevados índices de ZPP.

Em 1985, o CDC recomendou a utilização da ZPP como teste de “screening” para a exposição ao chumbo em crianças. Em 1991 a recomendação foi revogada, pois a ZPP não é específica para a exposição ao chumbo, por sofrer interferência com a deficiência de ferro. Porém, é sensível para indicar os efeitos adversos a saúde em decorrência da exposição por chumbo⁷³.

Os valores de hematócrito e de hemoglobina são utilizados no diagnóstico de anemia, que na maioria das vezes está associada à deficiência de ferro. Entretanto, a queda do estoque de ferro é um sintoma que antecede o aparecimento da anemia e hematócrito e hemoglobina não são tão sensíveis e nem específicos quanto os níveis de ZPP para diagnosticar a deficiência de ferro⁷⁴.

A manutenção dos estoques de ferro é de grande importância em crianças durante o crescimento e desenvolvimento, pois baixos níveis desse micronutriente podem levar a prejuízos no desenvolvimento motor e cognitivo, assim como um aumento da exposição ao chumbo³⁶. Labbé, Vreman & Stevenson (1999) estipularam que uma variação dos níveis de ZPP de 60 a 80 $\mu\text{mol/mol}$ heme, mesmo que os valores de hemoglobina e hematócrito estejam normais, está associada à queda dos estoques de ferro em crianças, podendo ser

causada pela a ingestão insuficiente ou doenças crônicas. No presente estudo, 26,2 % (n=17) das crianças apresentaram anemia microcítica, diagnosticada através dos valores de hemoglobina e hematócrito. Porém o número de crianças que apresentaram uma ingestão insuficiente deste micronutriente passa de 60 % e 78,5 % apresentaram valores superiores aos de referência para a ZPP.

IV.6. AVALIAÇÃO DOS INDICADORES CLÍNICOS

Além dos indicadores biológicos de exposição ao chumbo, foram realizados exames clínicos de rotina, urinálise e hemograma.

O valor médio da razão cálcio/creatinina urinária foi de 0,12 mg/g cr (n=49) com valor mínimo de 0,01 mg/g cr e máximo de 0,40 mg/g cr. Dentre estas crianças, 12 % (n=6) apresentaram valores médios de 0,27 mg/g cr, acima dos VR (0,21 mg/g cr), que é um indicativo de hipercalcúria e pode estar relacionado com a de ingestão de cálcio, proteína, fósforo e sacarose, como também a fatores genéticos, atividade física, idade, sexo e ou até devido ao status da vitamina D^{75, 76, 77}.

O EAS realizado mostrou que 38,5 % das análises não apresentaram alterações e 47,7 % apresentaram alterações. Dentre estas alterações a presença de cristais de oxalato de cálcio foi verificada em 21,5 % (n = 14) das crianças, a presença de cristais de urato em 10,8 % (n =7) e a presença de cristais de fosfato em 3,1 % das crianças (n =2). Além da presença de cristais foi verificada a presença de bactérias no sedimento urinário de 12,3 % (n = 8) das crianças (Figura 9). Os cristais indicam distúrbios metabólicos relacionados ao metabolismo de cálcio e fosfato e a presença de bactérias, infecções no trato urogenital.

O valor médio da creatinina foi de 1,3 g/L (n=53), com valor mínimo de 0,2 G/L e valor máximo de 3,3 g/L. A creatinina é um metabólito formado espontaneamente, provém do metabolismo muscular da creatina e da creatina-fosfato. A sua taxa de formação é constante com cerca de 2 % da creatina do corpo sendo convertida em creatinina durante 24 hs, é totalmente filtrada pelos rins, mas sua excreção pode variar devido a fatores genéticos e a idade. A creatinina é utilizada para a correção da diluição da urina na monitorização biológica da exposição a diversas substâncias químicas. A OMS recomenda que, caso uma amostra seja muito diluída (< 0,03 g/L), outra amostra deve ser

coletada. Um estudo recente analisou os valores de creatinina dos participantes do NHANES III para a obtenção de valores de referência por faixa etária, obtendo os valores de 1,3 g/L para todos os participantes do estudo, na faixa etária de 6 a 70 anos, 1,0 g/L para a faixa etária de 6 a 11 anos e 1,6 g/L para a faixa etária de 12 a 19 anos⁷⁸.

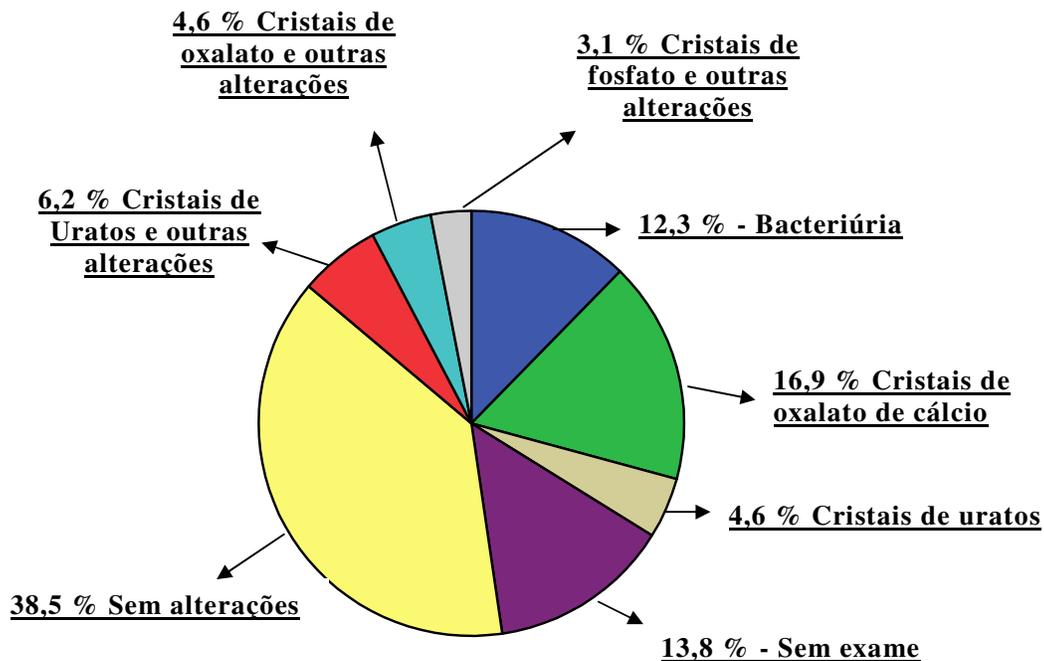


Figura 9: Relação em porcentagem dos exames de urinálise.

A tabela 9 apresenta os resultados encontrados no exame hematológico. Com relação ao hematócrito (média de 37 %), em 6 % das crianças foram encontrados valores abaixo de 36 %, sendo o menor valor encontrado 27 %. Quanto à hemoglobina (média de 12 g%), em 30% (n = 19) das crianças foram encontrados valores abaixo de 12 g% com média de 10,8 g%. Na análise específica dos glóbulos vermelhos foram encontrados os seguintes parâmetros: 26 % anemia microcítica e 9 % policitemia com macrocitose.

Tabela 9: Tabela descritiva dos índices hematimétricos encontrados nas crianças.

	N	Média	DP	Mínimo	Máximo
Hemoglobina *	63	12	1,3	8	15
Hematócrito **	64	37	3,5	27	45

DP = Desvio-Padrão, *g%, **%

Os estudos epidemiológicos utilizam o valor de 11 g% de hemoglobina como característico de anemia, exceto para recém-nascidos. A deficiência de ferro é a causa mais comum de anemia, mas não é a única, outras causas seriam as infecções crônicas, hemoglobinopatias hereditárias, deficiência de ácido fólico e também a exposição ambiental ao chumbo. Estas causas devem ser avaliadas segundo a realidade epidemiológica local e dados individuais⁷⁴.

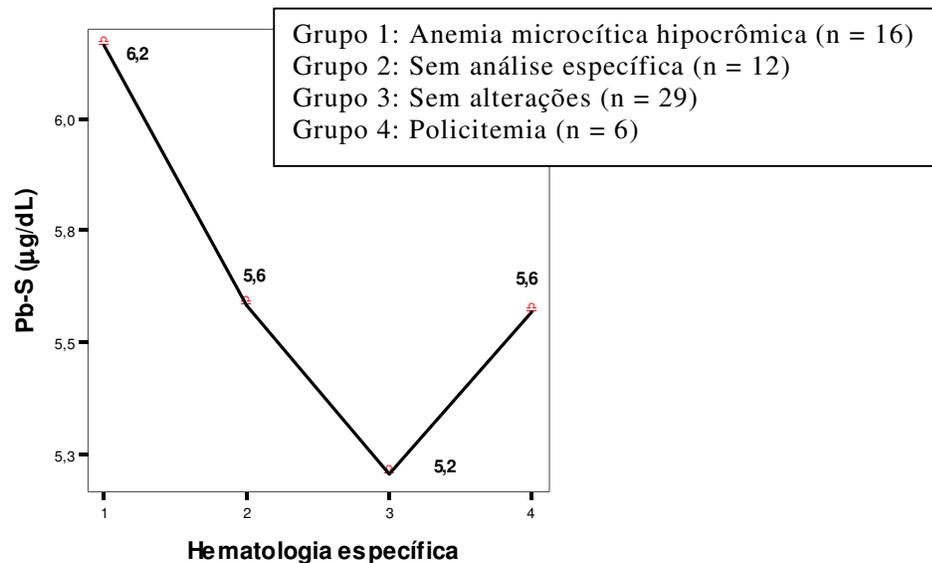


Figura 10: Distúrbios hematológicos distribuídos segundo valores de Pb-S (µg/dL).

A figura 10 mostra a relação entre os níveis de Pb-S e os distúrbios hematológicos encontrados. Como discutido anteriormente, o grupo 1 apresentou maior média de Pb-S (6,2 µg/dL), porém não houve diferença significativa entre os grupos.

IV.7. ANÁLISE DA INTERAÇÃO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS E NUTRICIONAIS COM INDICADORES DE EXPOSIÇÃO AO CHUMBO.

Foram realizadas correlações com o objetivo de avaliar a aplicabilidade dos indicadores de dose interna e de efeito nesta situação de exposição ao chumbo. Para tanto, os parâmetros nutricionais e clínicos foram correlacionados com os indicadores biológicos.

O indicador de efeito ALA-U apresentou correlação negativa e significativa com o hematócrito ($p = 0.003$, $r = - 0,399$, $n = 52$) e com a hemoglobina ($p = 0,034$, $r = - 0,295$, $n = 52$) indicando a relação entre a exposição ao chumbo e seu efeito sobre o sistema hematopoiético. Além destas, apresentou correlação positiva e significativa com os valores da razão Ca/cr urinária ($p = 0,001$, $r = - 0,443$, $n = 49$) podendo indicar que o aumento da exposição ao chumbo leva a maior excreção de cálcio devido a competição existente entre estes cátions divalentes.

A ingestão de vitamina D foi correlacionada negativamente com os níveis de Pb-S ($p = 0.002$, $r = - 0, 403$, $n = 57$) (Figura 11). Sua forma ativa ($1,25\text{OH}_2\text{D}$), é conhecida por estimular a formação de proteínas que se ligam ao cálcio e estimulam a sua absorção. Estudos epidemiológicos têm revelado que a baixa ingestão deste nutriente, e baixos níveis séricos de 25OHD foram associados a níveis elevados de Pb-S em crianças que também possuíam deficiência na ingestão de cálcio⁵⁴. Outros estudos não encontram essa associação quando o estado nutricional é adequado^{58, 79}. Cheng *et al* (1998) relataram ainda que idosos com baixa ingestão de vitamina D têm um aumento dos níveis de chumbo na tíbia e patela quando comparados a idosos com ingestão suficiente desta vitamina (Figura 11).

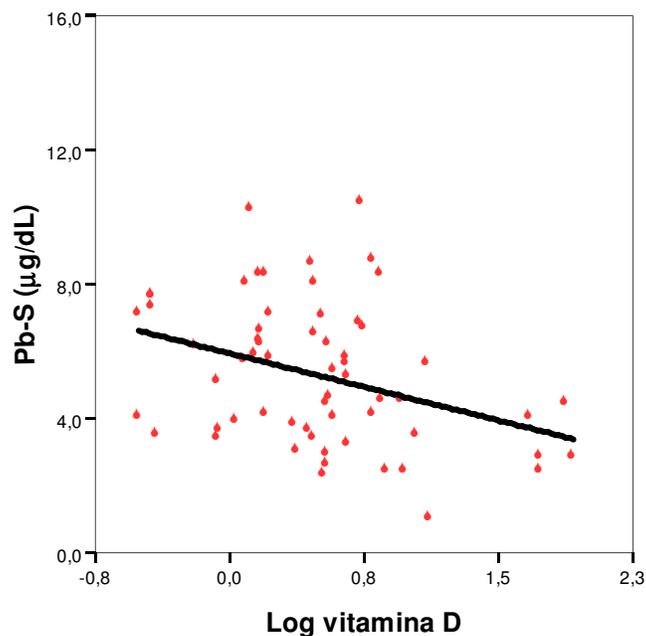


Figura 11: Correlação entre a ingestão de vitamina D e Pb-S.

IV.7.1 – Modelos de regressão linear múltipla.

Foram construídos modelos de regressão linear, controlados pela idade, para verificar qual indicador pode prever alterações nos níveis de hemoglobina, hematócrito e cálcio urinário. A variável Log da recuperação de ALA-D que foi analisada para o projeto amplo do qual este trabalho faz parte, também foi incluída nestes modelos.

No modelo com a hemoglobina como variável dependente (Tabela 10), as variáveis Pb-S, Log de ZPP e ALA-D são preditivas ($p = 0,04$) em 31,3 %, com valor de β negativo.

Tabela 10: Modelo de regressão linear com a hemoglobina como variável dependente.

Variáveis	R	Sig R	R ²	Sig R ²	β	Sig β
Independentes						
Pb-S					- 0,128	0,162
Log ZPP	0,559	0,001	0,313	0,040	- 3,517	0,003
% ALA-D*					- 0,055	0,040

*percentual de recuperação da ALA-D

No modelo com o hematócrito (Tabela 11) como variável dependente, as variáveis ALA-U e Pb-S são preditivas em 19,4 % ($p = 0,024$). Considerando somente o ALA-U este é capaz de prever em 9 % ($p = 0,042$) o hematócrito.

Tabela 11: Modelo de regressão linear com o hematócrito como variável dependente.

Variáveis	R	Sig R	R ²	Sig R ²	β	Sig β
Independentes						
ALA-U	0,440	0,010	0,194	0,024	- 1,082	0,021
Pb-S					- 0,398	0,024

No modelo com cálcio urinário como variável dependente, o Logaritmo de Pb-U foi preditivo em 10,8 %, com β positivo (Tabela 12).

Tabela 12: Modelo de regressão linear com o cálcio urinário como variável dependente.

Variáveis Independentes	R	Sig R	R²	Sig R²	β	Sig β
Pb-U	0,329	0,031	0,108	0,031	0,103	0,031

Estes indicadores têm ampla utilização na prática ocupacional. Porém, nas avaliações ambientais sua aplicação ainda vêm sendo investigada. Estes modelos citados acima demonstram que existe uma relação entre os indicadores, a exposição desta população e os distúrbios encontrados.

Tabela 13: Modelo de regressão linear com o Pb-S como variável dependente.

Variável Independente	R	Sig R	R²	Sig R²	B	Sig β
Vitamina D	0,291	0,028	0,084	0,028	- 1,058	0,028

Outro modelo foi criado com o Pb-S como variável dependente (Tabela 13) e os nutrientes, variáveis independentes. A vitamina D ingerida foi capaz de prever 8,4 % ($p = 0,028$) dos níveis de Pb-S, com valor de β negativo.

V – CONCLUSÕES

- ✓ A metodologia padronizada para a quantificação de 25OHD₃ demonstrou ser específica, por obter uma correlação negativa significativa entre os valores de paratormônio e 25OHD como citado em literatura. O limite de detecção desta metodologia foi suficiente para identificar deficiências, classificando-as em suave, moderada e grave, pois apresentou diferença significativa entre os grupos de classificação. Para estas mesmas crianças foram determinados os níveis de paratormônio.
- ✓ As crianças avaliadas apresentaram valores médios de 18 ng/mL de 25OHD. Sendo caracterizadas como portadoras de uma deficiência grave 38,5%; 15,4 % apresentaram valores entre 5 e 10 ng/mL e foram caracterizadas como deficiência moderada, 16,9 % com deficiência suave e 13,8 % como apresentando níveis suficientes.
- ✓ A população estudada pode ser considerada sócio-economicamente desfavorecida, com boa parte das crianças demonstrando comportamento considerado de risco quanto à exposição ao metal. Seus pais apresentam nível educacional baixo, próximo ao do funcional, que também é considerado um fator de risco para a exposição.
- ✓ Os valores da dose potencial para o solo ultrapassaram a dose de referência (DRf) preconizada pela EPA (2000). O fator de risco neurológico por ingestão foi 13 vezes superior a DRf e, por inalação, 1,2 vezes maior configurando uma situação de risco para estas crianças.
- ✓ A população apresentou um estado nutricional abaixo do recomendado, com grande deficiência dos micronutrientes cálcio, ferro e vitamina D, além de baixo consumo de calorias. Através do questionário de frequência alimentar foi possível distinguir as deficiências grave e suave dos níveis normais para a ingestão de Vitamina D. Entretanto, não foi possível distinguir a deficiência moderada dos níveis normais, pois este tipo de questionário é suscetível a viés de informação.
- ✓ Cerca de 5 % das crianças apresentaram níveis de Pb-S acima de 10 µg/dL e 11 % valores de ALA-U acima de 4,5 mg/g cr, caracterizando exposição ambiental ao metal.

- ✓ O indicador de efeito ALA-U, ao contrário do Pb-S, foi capaz de identificar o grupo de crianças mais suscetível à exposição, devido a diferença significativa encontrada entre os grupos 1 e 3. Além disto, foi observada uma correlação negativa significativa com os índices hematimétricos (hemoglobina e hematócrito), mostrando que este indicador é adequado para a avaliação da exposição ambiental.
- ✓ Quanto ao indicador de efeito ZPP, 78,5 % (n=51) das crianças tiveram valores acima dos VR. Este alto percentual de análises com alteração está relacionado à deficiência nutricional em ferro, podendo também estar sob influência da exposição ao chumbo, levando ao quadro de anemia.
- ✓ A ingestão de vitamina D foi correlacionada negativamente com os níveis de Pb-S, que pode indicar uma exposição mais elevada nesta população devido à característica alimentar deficiente do nutriente, com implicações para o desenvolvimento ósseo.
- ✓ A presença de cristais de oxalato de cálcio foi verificada em 21,5 % das crianças. Estes cristais indicam distúrbios relacionados ao metabolismo de cálcio e fosfato. No entanto, apenas 12 % excederam o valor de referência para a razão cálcio/creatinina urinária.
- ✓ Os modelos de regressão linear mostram que ALA-U e ZPP podem ser utilizados como indicadores de exposição ao chumbo, pois são capazes de prever alterações relacionadas à exposição. A determinação de ZPP, junto ao Pb-S e ALA-D é capaz de prever em 31,3 % os níveis de hemoglobina, e o ALA-U junto ao Pb-S é capaz de prever em 19,4 % os níveis de hematócrito. Somente o ALA-U é capaz de prever em 9 % os níveis de hematócrito, o que indica a existência de uma relação entre os indicadores, a exposição desta população e os distúrbios encontrados.
- ✓ No modelo criado com os nutrientes avaliados e os indicadores de exposição, o consumo de vitamina D foi capaz de prever 8,4 % dos níveis de Pb-S, mostrando que o estado nutricional é um fator importante e poderá servir como forma de prevenção desta exposição.

VI – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. TONG, S., SCHIMDING, Y. E., PRAPAMONTOL, T., 2000. *Environmental Lead Exposure: a Public Health Problem of Global Dimensions*. *Bulletin of World Health Organization*. 78 (9): 1068-1077.
2. ROTHENBERG, S. J. & ROTHENBERG, J. C., 2005. *Testing the Dose-Response Specification in Epidemiology: Public Health and Policy Consequences for Lead*. *Environmental Health Perspectives*. 9: 1190-1195.
3. GOLDSBERG, M., LEVIN, S. M., DOUCETTE, J. T., GRIFFIN, G., 1997. *A Task-based Approach to Assessing Lead Exposure Among Iron Workers Engaged in Bridge Rehabilitation*. *Am. J. Ind. Med.* 32 (3):310-318.
4. CANDELA, S., FERRI, F., OLMI, M., 1998. *Lead Exposure in the Ceramic Tile Industry: Time Trends and Current Exposure Level*. *Ann. Inst. Super Sanita*. 34 (1): 137-143.
5. PATRIARCA, M., MENDITTO, A., ROSSI, B., LYON, T. D. B., FELL, G. S., 2000. *Environmental Exposure to Metals of Newborns, Infants and Young Children*. *Microchemical Journal* 67: 351-361.
6. ONG, C. N., CHIA, S. E., FOO, S. C. et al., 1993. *Concentrations of Heavy Metals in Maternal and Umbilical Cord Blood*. *Biological Metals*. 6: 61-66.
7. BELLINGER, D. C., 2004. *Lead*. *Pediatrics* 113 (4):1016-1022.
8. ROSCOE, R J., GITTLEMAN, J. L., DEDDENS, J. A., PETERSEN, M. R., HALPERIN, W. E., 1999. *Blood lead levels among children of lead-exposed workers: a meta-analysis*. *American Journal of Industrial Medicine* 36:475-481.
9. ATSDR. *Toxicological Profile for Lead*, 1999. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
10. SAKAI, T., 2000. *Biomarkers of Lead Exposure*. *Industrial Health*. 38:127-142

11. GURER, H & ERCAL, N., 2000. *Can Antioxidants be Beneficial in the Treatment of Lead Poisoning? Free Radical Biology and Medicine*. 29 (10): 927-945.
12. De MICHELE, S. J., 1984. *Nutrition of Lead. Complied of Biochemistry and Physiology*. 78A (3): 401-408.
13. AHAMED, M., VERMA, S., KUMAR, A., SIDDIQUI, M. K. J., 2005. *Environmental exposure to lead and its correlation with biochemical indices in children. Science of the Total Environment*, 346: 48-55.
14. SITHISARANKUL, P. 2001. *Molecular Epidemiology and Lead Poisoning. Intern. Med. J. Thai.*, vol 17:2, 147-158.
15. MATTOS, R. C. O. C., 2001. *Estratégias para a Avaliação da Exposição ao Chumbo: Estudos Comparativos dos Indicadores Biológicos e Efeitos Relacionados. Tese de Doutorado. Rio de Janeiro. Instituto Oswaldo Cruz. Fundação Oswaldo Cruz.*
16. STEWART, W. F., SCHWARTZ, B. S., SIMON, D., KELSEY, K., TOOD, A. C., 2002. *ApoE genotype, past adult lead exposure, and neurobehavioral function. Environmental Health Perspect*, 110 (5): 501-505.
17. TANDON, S. K., CHATTERJEE, M., BHARGAVA, A., SHUKLA, V., BIHARI, V., 2000. *Lead Poisoning in Indian Silver Refiners. The Science and the Total Environment*. 281 (1-3): 177-182.
18. BONASSI, S. 2002. *Biomarkers in Molecular Epidemiology Studies for Health Risk Prediction. Mutat. Res*. 511 (1): 73-86.
19. SKERFVING, S. 1993 - *Inorganic Lead. In: Criteria Documents from the Nordic Expert Group*, pp. 125-238. Sweden:Ed. Brita Beije Och Per Lundberg.
20. SCHUTZ, A., BERGDAHL, I. A., EKHOLM, A., SKERFVING, S., 1996. *Measurement by ICP-MS of Lead in Plasma and Whole Blood of Lead*

- Workers and Controls. Occupational Environment Medicine. 53: 736-740.*
21. IKEYA, Y., SAKAI, T., TAKEUCHI, Y., ARAKI, T., USHIO, K., 1987. *Plasma Lead Concentration as a Direct Indicator of Current Exposure to Lead. Japanese Journal of Traumatology and Occupational Medicine. 35: 834-838.*
 22. WETMUR, J. G., LEHNERT, G. & DESNICK, R. J., 1991. *The δ -aminolevulinate Dehydratase Polymorphism: Higher Blood Lead Levels in Lead Workers and Environmental Children with the 1-2 and 2-2 Isozymes. Environmental Research. 56: 109-119.*
 23. ASTRIN, K. H., BISHOP, D. F., WETMUR, J. G., KAUL, B. C. et al., 1987. *Aminolevulinic Acid Dehydratase Isozymes and Lead Toxicity. Ann NY Acad Sci. 514: 23-29.*
 24. ERSKINE, P. T., NEWBOLD, R., BRINDLEY, A. A., WOOD, S. P., et al. 2001. *The X-ray Structure of 5-Aminolevulinic Acid Dehydratase from Escherichia Coli Complexed with Inhibitor Levulinic Acid at 2,0 Å Resolution. Biochemistry. 38: 4266-4276.*
 25. ONALAJA, A. O. & CLAUDIO, L., 2000. *Genetic Susceptibility to Lead Poisoning. Environ. Health Perspect. 108 (1): 23-28.*
 26. SAKAI, T., Y., ANAGHARA, S. & USHIO, K., 1980. *Restoration of lead-inhibited δ -aminolevulinate dehydratase activity in whole blood by heat, zinc ion, and (or) dihydrothreitol. Clinical Chemistry. 26: 625-628.*
 27. WIGFIELD, D. C., FARANT, J. P., 1981. *Assay of δ -Aminolevulinate Dehydratase in 10 μ l of Blood. Clin. Chem. 27 (1): 100-103.*
 28. GOERING & FOWLER, 1984. *Regulation of Lead Inhibition of Ala-D by a Lower Molecular Weight, High Affinity Renal Lead-binding Protein. J. Pharm. Exp. Ther. 231 (1): 66-71.*
 29. IPCS, 1999 – *International Programme on Chemical Safety. Environmental*

Health Criteria for Inorganic Lead.

30. HUDÁK, A., NARAY, M. J., SÜNEGES, E., 1992. *Clinical Relevance of Urinary δ -Aminolevulinic Acid/Logarithm of Creatinine Ratio in Screening for Occupational Lead Exposure. Am. J. Ind. Med., 21: 673-680.*
31. SATA, F. & ARAKI, S., 1996. *Adjustmante of creatinine-adjusted value to urine flow rate in lead workers. Archives of Environmental Health, 51/4: 329-334.*
32. CALDEIRA, C., MATTOS, R.C., MEYER, A. & MOREIRA, J. C., 2000. *Limites de aplicabilidade da determinação do ácido aminolevulínico urinário como teste "screening" na avaliação da intoxicação profissional pelo chumbo. Cadernos de Saúde Pública, volume 16, número 1: 225-30*
33. FUKUI, Y., MIKI, M.; UKAI, H.; OKAMOTO, S.; TAKADA, S.; HIGASHIKAWA, K.; IKEDA, M., 1999. *Urinary lead as a possible surrogate of blood lead among workers occupationally exposed to lead. Int Archives of Occupational and Environmental Health, 72: 516-520.*
34. CALDEIRA, C. s., 1998. *Determinação do Ácido δ -Aminolevulínico Urinário como um Teste de Screening na Avaliação da Intoxicação Profissional pelo Chumbo. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro. Escola Nacional de Saúde Pública. Fundação Oswaldo Cruz.*
35. ALEXANDER, B. H., CHECKOWAY, H., COSTA-MALLEN, P., FAUSTMAN, E. M., WOODS, J. S., KELSEY, K. T. et al., 1998. *Interaction of blood lead and δ -aminolevulinic acid dehydratase genotype on markers of heme synthesis and sperm production in lead smelter. Environmental Health Perspect. 106 (4):213-216.*
36. LABBÉ, R. F., VREMAN, H. J. & STEVENSON, D. K., 1999. *Zinc Protoporphyrin: A Metabolite with a Mission. Clin. Chem. 45 (12): 2060-2072.*
37. MITRI, S., 2003. *Padronização e Aplicação de uma Metodologia para*

Determinação do Polimorfismo da Enzima Ácido δ -aminolevulínico Desidratase na Avaliação da Exposição ao Chumbo. Dissertação de Mestrado. Rio de Janeiro. Escola Nacional de Saúde Pública. Fundação Oswaldo Cruz.

38. CHUANG, H. Y.; YU, K. T.; HO, C. K.; WU, M. T.; LIN, G. T.; WU, T. N., 2004. *Investigations of vitamin D receptor polymorphism affecting workers' susceptibility to lead. Journal of Occupational Health* 46: 316-321.
39. MAHAFFEY, K. R., 1995. *Nutrition and lead. Strategies for Public Health. Environmental Health Perspective (Supplements 6)* 103: 191-196.
40. GUYTON, A. C. & HALL, J. E., 2000 – *Tratado de Fisiologia Médica*, 10ª edição. Ed. Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro.
41. DEVLIN, THOMAS M., 1997. *Manual de Bioquímica com Correlações Clínicas* Ed. Edgar Blucher-4ª Edição, p.936-940.
42. MAHAN, L. K. E STUMP, S. E., 1998. *Alimentos, nutrição e dietoterapia*. 9ª edição. Editora Roca.
43. HOLICK, M. F., 2004. *Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. American Journal of Clinical Nutrition*, 80: 1678S-1688S.
44. OMDAHL, J. L.; MORRIS, H. A.; MAY, B. K., 2002. *Hydroxylase Enzymes of the vitamin D. Annu. Ver Nutr.*, 22: 139-166.
45. SIBERNAGL & DESPOPOULOS, 2003. *Fisiologia Texto e Atlas* Ed. Artmed 5ª Edição pp 290-293.
46. HOLLIS, B. W., 2004. *Editorial: The determination of circulating 25-hydroxyvitamin D: No easy task. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89 (7): 3149-3151.
47. KRALL, E. A., SAHYOUN, N., TANNENBAUM, S., DALLAL, G., DAWSON-

- HUGHES, B., 1989. *Effect of vitamin D intake on seasonal variations in parathyroid hormone secretion in postmenopausal women. New Eng. J. Med.*, 321: 1777-1783.
48. ZEGHOUD, F., VERVEL, C., GUILLOZO, H., WALRANT-DEBRAY, O., BOUTIGNON, H., GARALBEDIAN, M., 1997. *Subclinical vitamin D deficiency in neonates: definition and response to vitamin D supplements. American Journal of Clinical Nutrition*, 65: 771-778.
49. TSUGAWA, N.; SUHARA, Y.; KAMAO, M.; OKANO, T., 2005. *Determination of 25-hydroxyvitamin D in human plasma using HPLC-tandem mass spectrometry. Analytical Chemistry*, 77 (9): 3001-3007.
50. LEITE, F. *Validação em análise química*, 1998. Campinas. São Paulo. Editora Átomo.
51. BERGLUND, M. B. L., SÖRENSEN, S., VAHTER, M., 2000. *Impact of soil and dust lead on children's blood lead in contaminated areas of Sweden. Archives of Environmental Health March/April [Vol. 55 (No. 2)]*, 93-97.
52. LONG, G. J., POUNDS, J. G., ROSEN, J. F., 1992. *Lead intoxication alters basal and parathyroid hormone-regulated cellular calcium homeostasis in rat osteosarcoma (ROS 17/2.8) cells. Calcif. Tissue Int*; 50: 451-458.
53. SORRELL, M.; ROSEN, J. F.; ROGINSKY, M., 1977. *Interactions of lead, calcium, vitamin D, and nutrition in lead-burdened children. Archives of Environmental Health*, 78 (3): 401-408.
54. ROSEN, J. F.; CHESNEY, R. W.; HAMSTRA, A.; DELUCA, H. F.; MAHAFFEY, K. R., 1980. *Reduction in 1,25-dihydroxyvitamin D in children with increased lead absorption. The New England Journal of Medicine*, 302 (20): 1128-1131.
55. MAHAFFEY, K. R., ANNEST, J. L., ROBERT, J., MURPHY, R. S., 1982. *National estimates of blood lead levels: United States 1976-1980. New England Journal of Medicine*, 307: 573-579.

-
56. ELDESTAIN, S., FULLMER, C. S., WASSERMAN, R. H., 1984. *Gastrintestinal absorption of lead in chicks: involvement of the cholecalciferol endocrine system. J. Nutr. 114: 692-700.*
57. FULLMER, C. S., 1997. *Lead-calcium interactions: involvement of 1,25-Dihydroxyvitamin D. Environmrntal Research, 72: 45-55.*
58. KOO, W. W. K.; SUCCOP, P. A.; BORNSCHEIN, R. L.; KRUG-WISPE, S. K.; STEINCHEN, J. J.; TSANG, R. C.; BERGER, O. G., 1991. *Serum vitamin D metabolites and bone mineralization in young children with chronic low moderate lead exposure. Pediatrics, 87 (5): 680-687.*
59. AKNESS, L, 1992. *A simplified HPLC method for determination of vitamin D3, 25-OHD2 and 25OHD3 in human serum. Scand J Clin Lab Invest (520): 177-182.*
60. LOURO, M. O. & TUTOR, J. C., 1994. *Hematofluorometric Determination of Erythrocyte Zinc Protoporphyrinic: Oxigenation and Derivatization of Hemoglobin Compared. Clin. Chem. 40 (3): 369-372.*
61. OGATA, M.; TAGUCHI, T., 1987. *HPLC procedure for quantitative determination of urinary delta-aminolevulinic acid as indices of lead exposure. International Archives of Occ and Environ Health, 59: 385-391.*
62. TURPEINEN, U., 2003. *Determination of 25-hydrocyvitamin D in serum by HPLC and Immunoassay. Clinical Chemistry, 49 (9): 1521-1524.*
63. LIPS, P., 2004. *Which circulating level of 25-hydroxyvitamin D is appropriate? Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology (89): 611-614.*
64. RIPSА (REDE INTERAGENCIAL DE INFORMAÇÃO PARA A SAÚDE) (2002) – *Indicadores Básicos de Saúde no Brasil: Conceitos e Aplicações. Brasília. Organização Pan-Americana da Saúde. Cap: 3, pág 84-97.*
65. EPA – U.S. Environmental Protection Agency – *Lead (1989). Protection*

Human Health.

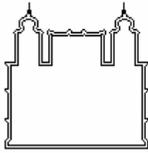
66. HEARD, M. J. AND CHAMBERLAM, A. C., 1982. *Effects of minerals and food on uptake of lead from the gastrointestinal tract in humans. Human Toxicology, 1: 411-415.*
67. BRODY, D. J., PIRKLE, J. L., KRAMER, R. A., FLEGAL, K. M., MATTE, T. D., GUNTER, E. V., FASCHAL, D. C., (1994). *Blood lead levels in the U. S. population phase I of the third national health and nutrition examination survey (NHANES III, 1988 to 1991). Journal of America Medical Association, 272: 277-283.*
68. BERLIN, A., YODAIKEN, R. R., HENMAN, B. A., 1984. *Assessment of the toxic agents at the work place. Roles of ambient and biological monitoring. Boston: Hague Nijhoft.*
69. APOSTOLI, P., BAJ, A., BAVAZZANO, P., GANZI, A., NERI, G., RONCHI, A., SOLEO, L., DiLORENZO, L., SPINELLI, P., VALENTE, T., MINOIA, C., 2002. *Blood lead reference values: the results na Italian polycentric study. The Science of the Total Environment, 287: 1-11.*
70. SOLDIN, O. P.; HANAK, B.; SOLDIN, S. J., 2003. *Blood lead concentrations in children: new ranges. Clinica Chimica Acta, 327: 109-113.*
71. OKAYAMA, A., FUJI, S., MIURA, R., 1990. *Optimized fluorimetric determination of urinary δ -aminolevulinic acid by using pré column derivatization, and identification of the derivative. Clinical chemistry, 36/8: 1494-1497.*
72. SOLDIN, O. P.; MILLER, M.; SOLDIN, S. J., 2003. *Pediatric reference ranges for zinc protoporphyrin. Clinical Biochemistry, 36: 21-25.*
73. SITHISARANKUL, P.; CADORETTE, M.; DAVOLI, C. T.; SERWINT, J. R.; CHISOLM, J. J.; STRICKLAND, P. T. 1999. *Plasma 5-aminolevulinic acid concentration and lead exposure in children. Environmental Research, 80:*

41-49

74. SISVAN (2002) – *Instrumento para o Combate aos Distúrbios Nutricionais em Serviços de Saúde – O Diagnóstico Nutricional*. Organizado por Elyne Montenegro Engstron. 2ª ed. Rio de Janeiro. FIOCRUZ. Páginas 126-128.
75. MANZ, F., KEHRT, R., LAUSEN, B. e MERKEL, A. (1999) – *Urinary Calcium Excretion in Healthy Children and Adolescents*. *Pediatrics Nephrology*. 13: 894-899.
76. ALCONCHER, L.F., CASTRO, C., QUITANDA, D., ABT, N., MORAN, L., GONZALES, L. et al. (1997) – *Urinary Calcium Excretion in Healthy School Children*. *Pediatrics Nephrology*. 11: 186-188.
77. SO, N.P., OSORIO, A.V., SIMON, S.D. e ALON, U.S. (2001) – *Normal Urinary Calcium/Creatinine Ratios in African-American and Caucasian Children*. *Pediatrics Nephrology*. 16: 133-139.
78. BARR, D. B., WILDER, L. C., CAUDILL, S. P., GONZALEZ, A. J., NEEDHAM, L. L., PIRKLE, J. L., 2005. *Urinary creatinine concentrations in U. S. population: Implications for urinary biologic monitoring measurements*. *Environmental Health Perspectives*, 113 (2): 192-200.
79. LARAQUE, D., McCORMICK, M. NORMAN, M., TAYLOR, A., WELLER, S. C., KARP, J., 1990. *Blood lead, calcium status, and behavior in preschool children*. *Am. J. Dis. Child*, 144: 186-189.
80. CHENG, Y.; WILLETT, W. C.; SCHWARTZ, J.; SPARROW, D.; WEISS, S.; HU, H., 1998. *Relation of nutrition to bone lead and blood lead levels in middle-aged to elderly men*. *American Journal of Epidemiology*, 147 (12): 1162-1174.
81. FOOD AND NUTRITION BOARD (FNB), National Research Council. *Recommended Dietary Allowances (1989)*. Ed. 10ª. Washington, DC: National Academy Press. *Environmental Research Section A*. 76: 120-130.

VII – ANEXOS

ANEXO I - Questionário de Avaliação de Exposição ao Chumbo.



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ – FIOCRUZ
Escola Nacional de Saúde Pública

Centro de Estudos Saúde do Trabalhador e
Ecologia Humana



1- Número: _____

2-CESTEH número: _____

A) Dados Gerais

1. Data de hoje: ___/___/___ Hora do início: _____
2. Nome do voluntário (criança ou grávida): _____
3. Nome do responsável (quando for o caso): _____
4. Endereço: _____
5. CEP: _____ -9-Faltando
6. Telefone de contato: _____ -9-Faltando
7. Sexo da criança: 1 - M 2 - F
8. Estado Civil (responsável/grávida):
1- Casado 2- Solteiro 3- União Livre 4- Separado 5- Viúvo
9. Data de nascimento da criança/grávida: ___/___/____
10. Idade da criança/grávida: _____anos
11. *Grávidas*: Há quanto tempo você está grávida (em semanas)? _____
12. *Grávidas*: Quantas vezes você ficou grávida? _____
13. Quantos filhos você (responsável/grávida) tem? _____
14. Você tem mais crianças na sua casa? 1- sim 2- não 9- Faltando
Quantas? _____
15. Deseja que as outras crianças participem desta avaliação? 1- sim 2- não 9- Faltando
16. Você (responsável/grávida) sabe ler e escrever? 1- sim 2- não 9- Faltando
17. Até que ano você (responsável/grávida) estudou na escola?
1- não foi à escola 2- ensino fundamental completo 3- ensino fundamental incompleto
4- ensino médio completo 5- ensino médio incompleto 6- mais que o ensino médio.
Cite:_____ 9- Faltando
18. A criança está na escola? 1- sim 2- não 9- Faltando
19. Em que período escolar a criança se encontra? 1- pré-escolar (creche) 2- fundamental
3- médio 9- Faltando
20. Há quanto tempo você mora nesta comunidade? _____ anos_____ meses 9-Faltando
21. Quantas pessoas moram permanentemente em sua residência? _____ pessoas
22. Quantos cômodos (quartos e salas) têm a sua casa ?_____ peças
23. Como é o piso da sua casa? 1- “vermelhão” 2- cimento 3- madeira (taco)
4- cerâmica 5- outros. Especifique: _____ 9- Faltando
24. Quantas vezes você precisa limpar a poeira da sua casa? 1- mais de uma vez por dia
2- uma vez por dia 3- duas ou mais vezes por semana 4 - uma vez por semana 5- -Outras
freqüências:_____9- Faltando

25. Quando sua casa foi pintada pela última vez? ____ anos ____ meses

1- nunca foi pintada 9- Faltando

26. Na ocasião da pintura foi usada lixa para o preparo das paredes?

1- sim 2- não 9- Faltando

27. A sua casa possui água encanada? 1- sim 2- não 9- Faltando

28. Em caso positivo, os encanamentos da sua casa são de:

1- plástico 2- metal 3- outros. Especifique: _____ 9- Faltando

29. Qual o destino do lixo da sua casa? 1- recolhido pelo lixeiro 2- colocado na caçamba 3- enterrado 4- queimado 5- deixado a céu aberto

6- outros. Especifique: _____ 9- Faltando

B) Atividades do entrevistado ou de alguém que more em sua casa relacionadas ao metal estudado no projeto

30. Você ou alguém que more na sua casa **já trabalhou ou trabalha** em: (incluindo: atividade principal e outras atividades (“biscate”)): 1- sim 2- não 9- Faltando

- 1- Indústria de produtos de borracha 2- Indústria de plásticos 3- Indústria de cerâmica
 4- Gráfica 5- Fábrica de tintas 6- Construção ou renovação de casas
 7- Jateamento de areia 8- Pintor 9- Concerto de radiadores 10- Soldagem
11- Fábrica de bateria ou recarregadores 12- Atividade de derreter metal
13- Incineração de Lixo 14- Atividade de contato com gasolina
 15- Outros. Especifique: _____

31. **OBS:** Se a resposta for **NÃO** pule para a pergunta número 40.

32. Há quanto tempo trabalha ou trabalhou nesta ocupação? ____anos ____ meses. 9- Faltando

33. Qual é a sua carga horária semanal nessa ocupação? ____hs/semana. 9- Faltando

34. Há quanto tempo você ou alguém que more na sua casa saiu desse “emprego” (quando for o caso)?
 _____ anos _____ meses 9- Faltando

35. Qual era a sua carga horária semanal nessa ocupação? ____hs/semana. 9- Faltando

36. Você tem uma nova ocupação? 1- sim. Especifique: _____ 2- não 9- Faltando

37. Há quanto tempo exerce esta outra atividade (“biscate”)? ____ anos ____ meses

38. Você ou alguém que more na sua casa usa equipamentos de proteção individual durante o seu trabalho tais como máscara e/ou luva e/ou avental? 1- sempre- Especifique: _____ 2- não 3- raramente- Especifique: _____ 8- não se aplica 9- Faltando

39. Onde é lavada a sua roupa de trabalho e a das outras pessoas da sua casa? 1- em casa 2- a empresa manda lavar 3- em lavadeira 4- outros. Especifique: _____

C) Fontes de emissão e sua localização em relação a residência do entrevistado

40. Você mora ou morou em algum lugar que fosse próximo a:

1- sim. Especifique: _____ 2- não 9- Faltando

- 1- Indústria de produtos de borracha 2- Indústria de plásticos 3- Indústria de cerâmica
 4- Gráfica 5- Fábrica de tintas 6- Construção ou renovação de casas
 7- Jateamento de areia 8- Pintor 9- Concerto de radiadores 10- Soldagem
11- Fábrica de bateria ou recarregadores 12- Atividade de derreter metal
13- Incineração de Lixo 14- Atividade de contato com gasolina
 15- Outros. Especifique: _____

D) Hábitos

41. Você ou alguma pessoa em sua casa fuma cigarro regularmente?

1- sim. Especifique quem: _____ 2- não 9- Faltando

42. Você ou esta pessoa fumam cigarro perto da criança?

1- sim 2- não. Especifique aonde fuma: _____ 9- Faltando

43. Quantos cigarros fuma por dia? ____ cigarros/dia _____ maços 9- Faltando

44. Há quanto tempo você ou esta pessoa fuma? ____ anos ____ meses 8- não se aplica (nunca fumou) 9- Faltando

45. Há quanto tempo você ou esta pessoa parou de fumar? ____ anos ____ meses
8- não se aplica (nunca fumou ou ainda fuma) 9- Faltando46. *Grávidas*: Você consome bebida alcoólica? 1- sim 2- não 9- Faltando47. *Grávidas*: Com que frequência você toma bebidas alcoólicas? 1- 4 ou mais vezes por semana 2- até 3 vezes por semana 3- pelo menos 1 vez por mês 4- menos 1 vez por mês 5- parei de beber 6- não sabe 8- não se aplica (nunca bebei) 9- Faltando48. *Grávidas*: Durante a última semana, na última ocasião em que você tomou bebidas alcoólicas, o que bebeu e em que quantidade?

1- não bebeu 2- não sabe 8- não se aplica 9- Faltando

Bebida	Quantidade				
	Copos	Latas	Cálices	Doses	Garrafas
1- Cerveja ou chopp	1 - <input type="checkbox"/>	2 - ____	3 - ____	4 - ____	5 - ____
2- Vinho	1 - <input type="checkbox"/>	2 - ____	3 - ____	4 - ____	5 - ____
3- Destilados (cachaça, rum, vodca, conhaque, batidas, uísque, etc).	1 - <input type="checkbox"/>	2 - ____	3 - ____	4 - ____	5 - ____
4- Licores	1 - <input type="checkbox"/>	2 - ____	3 - ____	4 - ____	5 - ____

49. *Responsável*: A criança chupa dedo ou chupeta?

1- sim. Especifique: _____ 2- não 9- Faltando

50. *Responsável*: A criança tem o hábito de comer:

1- reboco 2- terra 3- areia 4- lápis cera 5- massinha 6- borracha

7- plástico 8- lápis 9- papel 10- Outros. Especifique: _____

51. *Responsável*: Onde a criança brinca? _____

ATENÇÃO: ESTA PARTE DO QUESTIONÁRIO DEVE SER RESPONDIDA PELO ENTREVISTADOR

➤ Atenção do Entrevistado

1- Orientado e Atencioso

2- Pouco atencioso

3- Mal informado

4- Muito mal informado

5- Muito mal informado e confuso

➤ Veracidade e exatidão das respostas

1- Absolutamente franca e exatas

2- Provavelmente francas e exatas

3- Nem sempre francas e exatas

4- Poucas vezes francas e exatas

5- Não foram francas e exatas

➤ Hora do término da entrevista: _____ minutos

➤ Duração da entrevista: _____ minutos

➤ Observação: Este questionário possui 06 páginas.

ATENÇÃO: ESTA PARTE DO QUESTIONÁRIO DEVE SER RESPONDIDA PELO ENTREVISTADO. CASO O ENTREVISTADO NÃO SAIBA LER, O ENTREVISTADOR DEVE FAZER AS PERGUNTAS.

➤ O que achou do entrevistador?

1- Seguro

2- Distraído

3- Confuso

➤ Atitude do Entrevistador?

1- Atencioso

2- Indiferente

3- Impaciente

ANEXO II - Parâmetros utilizados na Avaliação Ambiental.

Para a determinação da Dose Potencial e do Fator de Risco, os seguintes parâmetros foram considerados:

$$\text{Dose potencial para ingestão: } \frac{\text{concentração (mg/kg ou L/ dia)} \times \text{Ti} \times \text{Ta}}{\text{PC (kg)}}$$

onde:

Ti – Taxa de ingresso para solo: 100, 200, 400 mg/dia;

Ti – Taxa de ingresso para água: 1,7 L/ dia;

Ta – Taxa de absorção (70%)

Peso Corpóreo – 15 kg

$$\text{Dose potencial no ar: } \frac{\text{concentração (mg/m}^3\text{)} \times \text{Ti} \times \text{Ta}}{\text{PC (kg)}}$$

onde:

Ti – Taxa de ingresso (10m³/dia)

Ta – Taxa de absorção (90%)

Peso Corpóreo – 15 kg

$$\text{Dose potencial na poeira: } \frac{\text{concentração (mg/m}^2 \times \text{Ti)} \times \text{Ta}}{\text{PC (kg)}}$$

onde:

Ti – Taxa de ingresso (10 mg/m²)

Ta – Taxa de absorção (90%)

PC - Peso Corpóreo – 15 kg

$$\text{FR} = \frac{\text{DP}}{\text{DRf}}$$

DRf

onde:

FR – Fator de Risco

DP – Dose Potencial

DRf – Valor de Referência (7,85 x 10⁻⁵ mg/kg/dia)

ANEXO III – Determinação de chumbo em sangue (Pb-S) e chumbo em urina (Pb-U).

As alíquotas das amostras de sangue ou urina para determinação de Pb-S e Pb-U foram estocadas a 20°C por, no máximo, 15 dias. Toda a vidraria utilizada nesta análise foi tratada previamente com ácido nítrico 10% a fim de evitar possíveis contaminações por metais.

Após descongelado, a amostra foi diluída em Triton X-100 0,1% na proporção 1:20 e os padrões de controle interno foram preparados na proporção 1:10. A seguir, foram adicionados 10µL da matriz modificada (modificador: Pd/Mg 150 µL de Pd 1%, 100 µL de Mg(NO₃)₂ 1% e 750 µL de HNO₃ 0,2%). Após este procedimento, 10 µL foram analisados em Espectrômetro de Absorção Atômica, em 283,3 nm com a fenda ajustada a 0,7 nm.

As curvas de calibração abrangeram as faixas de concentração de 0-50 µg/dL utilizando a matriz, com concentração baixa de chumbo. As curvas analíticas das amostras foram construídas a partir de diluições 1:10 de sangue em Triton X-100 e pela adição de padrões de Pb nas concentrações 5, 10, 25 e 50 µL/dL. Nestas condições, os parâmetros determinados foram: L.D. (1,88 µL/dL); C.V. (13 µL/dL) 5,9%, fator de conversão de µg/L para nmol/L (x 1/207,19).

ANEXO IV – Determinação de Cálcio Urinário (Ca-U)

A determinação do cálcio urinário foi realizada através de espectrometria de absorção atômica por chama utilizando o equipamento Analyst 800 (Perkin Elmer). Para a determinação de cálcio em urina, as amostras foram diluídas 200 vezes em uma solução de ácido clorídrico 3% (v/v) e lantânio 1% (m/v), e lidas diretamente na chama. Foi realizada ainda uma curva analítica na urina utilizando o mesmo fator de diluição das amostras, nas seguintes concentrações: 0,5 mg/L, 2,5 mg/L e 5,0 mg/L. Os resultados foram determinados por regressão linear e corrigidos pela creatinina urinária (valor de referência 0,21 mg/g cr).

ANEXO V – Localização dos pontos de coleta de amostras no Campus da FIOCRUZ e no Parque João Goulard.



Legenda:

- Pontos A e D: FIOCRUZ - Av. BRASIL
- Pontos B: FIOCRUZ - Beira Rio
- Pontos C e E: FIOCRUZ- Av. Leopoldo Bulhões
- Ponto F: Campo de Futebol (João Goulard)
- Ponto G: Lixão Profundo (João Goulard)

ANEXO VI – Questionários de frequência alimentar e RDA.**FREQUÊNCIA ALIMENTAR:**

NOME: _____ DATA: __/__/__ D.N.: __/__/__

ALIMENTO	PORÇÃO POR VEZ	DIÁRIA	SEMANAL	15/15 DIAS	MENSAL	NÃO CONSUME
Leite						
Queijos						
Iogurtes						
Manteiga/ Margarina						
Óleo						
Ovos/gema						
Carne de boi						
Miúdos						
Fígado						
Sardinha/Atum						
Frango						
Carne de porco						
Leguminosas						
Veg Verdes Esc						
Arroz						
Feijão						
Pães						
Macarrão						
Frutas						
Biscoitos						
Balas/Guloseimas						
Refrigerante						
Café						
Sucos						
Bebidas alcoólicas						
Enlatados/Embutidos						
Sopas						

- ALMOÇA E JANTA () ALMOÇA E LANCHA ()
- TEM ALGUM ALIMENTO QUE VOCÊ CONSUMA COM FREQUÊNCIA E NÃO FOI PERGUNTADO?

FREQÜÊNCIA ALIMENTAR (0-3 Anos)

NOME: _____ DATA: __/__/__ D.N.: ____/____/____
RESPONSÁVEL: _____

- Até que idade a criança mamou exclusivamente no peito? _____meses
() Nunca mamou no peito () Ainda está mamando no peito
- Por que a criança parou de mamar no peito / Porque nunca mamou no peito?
() pouco leite () a criança não queria () mãe não queria () mãe ficou doente
() criança ficou doente () problema no peito () mãe trabalhava / estudava
- A criança recebeu outro tipo de alimento enquanto mamava exclusivamente peito? () Sim () Não () Não sabe
- Qual(s) tipo(s) de alimento(s)? () MINGAU () ÁGUA () CHÁ () SUCOS Outros: _____ Que tipo de leite? _____

Pós-ceia	Café	Colação	Almoço	Lanche	Jantar	Ceia

Anotações: _____

