

ANEXO V

PROTOCOLO PARA A UTILIZAÇÃO DE INDICADOR BIOLÓGICO DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO BENZENO

1. Do objetivo

Estabelecer a utilização de indicadores biológicos para detecção de possível exposição ocupacional ao benzeno, que possuam características de aplicabilidade, especificidade e sensibilidade para exposição a baixas concentrações de benzeno em ambiente de trabalho compatíveis com o valor de referência tecnológico preconizado no Brasil, podendo, portanto, ser utilizado como ferramenta de acompanhamento de Higiene do Trabalho e da Vigilância da Saúde do Trabalhador.

2. Do indicador biológico de exposição

2.1 Conceito

Indicador biológico de exposição é uma substância química, elemento químico, atividade enzimática ou constituintes do organismo, cuja concentração (ou atividade) em fluido biológico (sangue, urina, ar exalado) ou em tecidos, possui relação com a exposição ambiental a determinado agente tóxico. A substância ou elemento químico determinado pode ser produto de uma biotransformação ou alteração bioquímica precoce decorrente da introdução deste agente tóxico no organismo. Para os agentes químicos preconizados na NR 07, é definido o índice biológico máximo permitido (IBMP), que é "o valor máximo do indicador biológico para o qual se supõe que a maioria das pessoas ocupacionalmente expostas não corre risco de dano à saúde. A ultrapassagem deste valor significa exposição excessiva". Este valor do índice biológico máximo permitido deve ter correlação com a concentração do agente químico no ambiente de trabalho, definida como limite de tolerância ou limite de exposição ocupacional.

A adoção do Valor de Referência Tecnológico traz a necessidade de reavaliar o conceito de o índice biológico máximo permitido para o indicador biológico de exposição ao benzeno. O Valor de Referência Tecnológico é baseado principalmente na exequibilidade tecnológica e foram estabelecidos valores distintos para diferentes ramos industriais. O cumprimento do Valor de Referência Tecnológico é obrigatório, mas não exclui risco à saúde. Por isso, para o benzeno não faz sentido o estabelecimento de índice biológico máximo permitido. Na Alemanha, onde se utiliza Valor de Referência Tecnológico, valor técnico de concentração ambiental para substâncias carcinogênicas, base conceitual do Valor de Referência Tecnológico, não se estabelecem valores limite para indicador biológico de exposição de substâncias carcinogênicas ou mutagênicas. São apresentadas, no entanto, listas de concentrações dos indicadores biológicos de exposição em fluidos biológicos equivalentes a diferentes valores de concentração ambiental, para que sirvam de guia na investigação da exposição do trabalhador a esses agentes.

No Brasil, também está sendo adotado este conceito. Deverão ser estabelecidas concentrações equivalentes dos indicadores biológicos de exposição com a concentração ambiental do benzeno.

Portanto, este protocolo não trata somente da introdução de um novo indicador biológico de exposição para o benzeno, mas também da modificação da maneira de se interpretar os resultados obtidos.

2.2 Objetivo

O indicador biológico de exposição deve ser utilizado como ferramenta de higiene do trabalho e como instrumento auxiliar de vigilância à saúde. Poderá, portanto, ser utilizado para:

PORTARIA N.º 672, DE 08 DE NOVEMBRO DE 2021
(DOU de 11/11/2021 - Seção 1)

- (1) correlação com os resultados de avaliações da exposição ocupacional na zona respiratória do trabalhador, obtidas pela higiene ocupacional;
- (2) dedução, a partir dos resultados obtidos, da parcela de benzeno absorvida após exposição do trabalhador;
- (3) verificação de mudanças qualitativas do perfil de exposição do grupo homogêneo estudado (mudanças de processo, de procedimentos ou de equipamentos);
- (4) verificação de outras vias de penetração do benzeno no organismo, que não a inalatória; pela pele, por exemplo; e,
- (5) verificação indireta da eficácia dos dispositivos de proteção usados.

3.3 Metodologia de aplicação

O indicador biológico de exposição só deve ser utilizado quando se têm bem definidos os objetivos de sua determinação e estabelecidos os critérios de interpretação dos resultados. Pode ter pouco significado a determinação do indicador biológico de exposição em datas pré-agendadas, como nos exames periódicos, por exemplo, que podem coincidir com períodos em que o trabalhador não executou nenhuma atividade relacionada com o benzeno.

Quando se pretende atingir qualquer um dos três primeiros objetivos relacionados no item 2.2, deve-se, de preferência, avaliar o indicador biológico de exposição em grupos de no mínimo vinte trabalhadores (Buschinelli & Kato, 1989) ou em todo o grupo homogêneo de exposição, se este for em número menor do que vinte, em conjunto com as avaliações da exposição ocupacional na zona respiratória do trabalhador.

Para os dois últimos objetivos, a análise deve ser realizada em grupos de qualquer número de trabalhadores que estiveram em situações de exposições aguda e sujeitos a outras vias de penetração.

A interpretação dos resultados do grupo homogêneo de exposição deve ser feita levando-se em consideração os dados de todo o grupo avaliado, segundo Buschinelli & Kato. Esta forma de interpretação permite avaliar o nível de exposição e fazer inferência do potencial de agravo à saúde ou eficácia dos dispositivos de proteção respiratória.

Resultados individuais do grupo homogêneo muito discrepantes do conjunto não devem ser tratados como provável dano à saúde e devem ser expurgados estatisticamente da análise grupal, procedimento de rotina em estudos estatísticos. Devem, no entanto, ser investigados visando desencadear ações corretivas de higiene industrial e de vigilância à saúde individual, específicas para a ocorrência.

Em casos de investigação de exposições potencialmente excessivas, ou não rotineiras, tais como emergências ou vazamentos, qualquer valor deve ser avaliado individualmente para verificação de possível sobre-exposição.

4. Da indicação do ácido trans, trans-mucônico

A monitorização biológica da exposição ao benzeno pode ser realizada através de diferentes indicadores, que vão desde aqueles com meia vida biológica curta, como o benzeno no ar exalado ou seus metabólitos urinários, até os adutores formados a partir de proteínas do sangue e moléculas de DNA, que podem persistir por meses no organismo humano.

O desenvolvimento de metodologias analíticas vem oferecendo a possibilidade de avaliar uma série de indicadores biológicos de exposição. Dentre os mais estudados, podemos destacar: os ácidos trans, trans-mucônico e fenil mercaptúrico urinários e o benzeno inalterado no ar exalado, na urina e no sangue.

A concentração do metabólito urinário corresponde a um valor médio ponderado, em relação ao

PORTARIA N.º 672, DE 08 DE NOVEMBRO DE 2021
(DOU de 11/11/2021 - Seção 1)

período da exposição, ao momento da coleta e ao tempo de biotransformação da substância. Sendo a urina um fluido biológico que pode ser coletado através de processo não invasivo, e recomendada neste protocolo.

Entre os indicadores biológicos urinários preconizados para avaliar a exposição ocupacional ao benzeno em baixos níveis de concentração no ar, o ácido trans, trans-mucônico é o de mais fácil determinação analítica, e por isto foi decidido pela Comissão Nacional Permanente do Benzeno (CNP-Bz) recomendá-lo como indicador biológico de exposição ao benzeno.

4.1 Características do Ácido trans, trans-mucônico

A primeira etapa no processo de biotransformação do benzeno ocorre com a formação do epóxido de benzeno, através de uma oxidase microssomal de função mista, mediada pelo citocromo P-450. A partir daí, duas vias metabólicas se apresentam: a hidroxilação do anel aromático ou a sua abertura com a formação do ácido trans, trans-mucônico (Barbosa, 1997).

Para a avaliação da exposição ocupacional de indivíduos com turnos de trabalho de seis a oito horas, a biotransformação do benzeno em ácido trans, trans-mucônico fornece uma concentração máxima do produto a partir de aproximadamente 5,1 horas após o início da exposição, sendo que cerca de 2 a 3,9% do benzeno absorvido é excretado pela urina na forma de ácido trans, trans-mucônico (Coutrim et al., 2000; Boogaard & Sittert, 1995)

4.2 Procedimentos de coleta

As amostras de urina devem ser coletadas em coletores universais de plástico, de 50 ml, no término da jornada de trabalho. Para jornadas de seis a oito horas diárias de trabalho, coletar a urina a partir do terceiro dia seguido de exposição. Os frascos devem ser imediatamente fechados e mantidos sob refrigeração (4 °C), até no máximo uma semana. Em situações de jornadas diferentes das anteriores ou situações de acidentes, deverão ser definidos critérios específicos de coleta, tecnicamente justificados.

4.3 Transporte das amostras

As amostras devem ser mantidas refrigeradas e devem ser enviadas o mais rápido possível ao laboratório.

4.4 Armazenagem

Barbosa (1997) mostrou a estabilidade das amostras refrigeradas a -20 °C por um período de até dez semanas. Costa (2001) indicou que a amostra não sofre alteração por um mês, a esta temperatura. De acordo com os achados de Martins, I - (1999) em estudos de estabilidade do ácido trans, trans-mucônico, os resultados mostraram que no intervalo analisado (0,2 - 2,0 mg/L) a concentração de 0,2 mg/L mostrou-se estável somente por seis semanas; a partir da sétimasemana, o valor já se encontrava fora do gráfico de controle. Já para a concentração de 2,0 mg/L, a estabilidade foi de quinze semanas, permanecendo o analito estável. Este autor também examinou a estabilidade por um período de dez dias em amostras conservadas a 4° C e os resultados mostraram que o analito permaneceu estável durante este período para as concentrações estudadas. Destes fatos, julgamos prudente que se armazene a amostra de urina a 4° C por um período de no máximo sete dias antes da análise. Se não for possível a análise das amostras, no prazo de uma semana, elas devem ser refrigeradas a -20° C, por no máximo um mês.

4.5 Análise química

Recomenda-se a determinação do ácido trans, trans-mucônico, segundo metodologia cromatográfica baseada nos procedimentos metodológicos desenvolvidos por Ducos et al. (1990), podendo se introduzir modificações, como apresentado por Costa (2001).

PORTARIA N.º 672, DE 08 DE NOVEMBRO DE 2021
(DOU de 11/11/2021 - Seção 1)

O laboratório deve ter um método padronizado, validado e participar de programa de controle de qualidade interlaboratorial e intralaboratorial, para garantia da confiabilidade analítica de seus resultados.

4.6 Interferentes

O ácido trans, trans-mucônico é um indicador sensível, mas de especificidade média. A sua concentração é influenciada pelo hábito de fumar, quando ocorre exposição simultânea ao tolueno ou pela ingestão de ácido sórbico e seus sais presentes na alimentação (Ducos et al., 1990; Inoue et al., 1989; Ruppert et al., 1997; Maestri et al., 1996; Kok & Ong, 1994). Há suspeitas que hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) também interferem nesta avaliação (Kivistö et al., 1997). Em trabalhadores não ocupacionalmente expostos ao benzeno, a concentração do ácido trans, trans-mucônico está abaixo de 0,5 mg/g creatinina. A presença do ácido trans, trans-mucônico (abaixo de 0,5 mg/g creatinina) em pessoas não ocupacionalmente expostas é atribuída, geralmente, à ampla poluição ambiental pelo benzeno que surge de fontes, tais como, hábito de fumar e outros processos de combustão, poluição urbana pelos automóveis e, provavelmente, contaminação de alimentos pelo ácido sórbico, um preservativo e agente fungistático muito comum em alimentos (queijo, carnes, peixe desidratado, vegetais em conserva, bebidas, etc.), que é também convertido ao ácido trans, trans-mucônico, embora em quantidades traços. Nesta situação, sugere-se a coleta de urina muitas horas após a última refeição, o que permitiria ignorar um possível efeito aditivo do ácido trans, trans-mucônico decorrente da ingestão do ácido sórbico.

4.7 Correção de resultados

Os resultados deverão ser ajustados pela concentração de creatinina na urina, e expressos em miligramas por grama de creatinina.

5. Interpretação dos resultados

Os valores de ácido trans, trans-mucônico acima dos valores de referência obtidos a partir de uma amostragem de uma população sadia, não ocupacionalmente exposta ao benzeno, podem indicar provável exposição do trabalhador a esta substância. Desta forma, deve-se investigar o local de trabalho e como estão sendo realizadas as tarefas, para identificar as possíveis causas de sobre exposição. Valores acima dos correspondentes aos Valor de Referência Tecnológico indicam que o ambiente de trabalho não está em conformidade com o preconizado no Anexo 13-A da Norma Regulamentadora nº 15 (NR-15).

Os resultados de muitos trabalhos realizados em ambientes onde não há exposição ocupacional ao benzeno, têm mostrado dados bastante variados de ácido trans, trans-mucônico em populações de fumantes e não fumantes. A tabela abaixo demonstra esta situação:

Tabela - Dados encontrados na literatura para concentração de ácido trans, trans-mucônico, em fumantes e não fumantes, de população não exposta ao benzeno

Ácido trans, trans-mucônico Fumantes Não Fumantes	Referência bibliográfica	
0,075 mg/g* (0,025-0,175)	0,025 mg/g*	Javelaud et al. (1998)
0,09 mg/g*	0,05 mg/g*	Ruppert et al. (1995)
0,25 mg/l** (0,06-0,43)	0,13 mg/l** (0,03-0,33)	Lee et al. (1993)
0,207 mg/g* (média 20 cigarros)	0,067 mg/g*	Maestri et al. (1995)
0,19 mg/g*	0,14 mg/g*	Ong et al. (1994a)

* mg/g = miligrama de ácido trans,trans mucônico por grama de creatinina

** mg/l = miligrama de ácido trans,trans mucônico por litro de urina

PORTARIA N.º 672, DE 08 DE NOVEMBRO DE 2021
(DOU de 11/11/2021 - Seção 1)

Para se fazer as correlações dos resultados das análises de ácido trans,trans mucônico com a concentração de benzeno no ar, deverão ser utilizados os valores de correlação abaixo com alteração dos resultados em mg/l para mg/gramas de creatinina, que foram feitas admitindo-se uma concentração média de 1,2 grama de creatinina por litro de urina.

Tabela - Correlação das concentrações de ácido trans, trans mucônico com benzeno no ar corrigidos para grama/grama de creatinina (admitida concentração média de 1,2 grama de creatinina por litro de urina)

Benzeno no Ar (ppm)	Benzeno no Ar (mg/m ³)	Ac. t, t mucônico (urina) (mg/l)	Ac. t, t mucônico (urina) (mg/grama creatinina)
0,3	1,0	—	—
0,6	2,0	1,6	1,3
0,9	3,0	—	—
1,0	3,3	2	1,6
2	6,5	3	2,5
4	13	5	4,2
6	19,5	7	5,8

6. Bibliografia

- Barbosa, E. M.,- 1997, "Exposição Ocupacional ao Benzeno: o ácido trans-trans mucônico como indicador biológico de exposição na indústria de refino de petróleo", Dissertação de Mestrado. CESTEH, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz..
- Boogaard, P.J.; Van Sittert, N.J.; 1995, "Biological monitoring of exposure to benzene: a comparison between s-phenylmercapturic acid, trans,trans-muonic acid and phenol", Occup. Environ. Med., 52: 611.
- Brugnone, F.; Perbellini, L.; Romeo, L.; Cerpelloni, M.; Cecco, A.; Leopard Barra, E.; Moro, G.; Marchiori, L.; Ferracin, A.; 1997; "Environmental exposure and blood levels of benzene in gas station attendants. Comparison with the general population"; Med. LaV - 88(2): 131-147
- Buschinelli, J. T. P.;Kato, M., 1989, " Monitoramento biológico de exposição a agentes químicos", São Paulo, FUNDACENTRO.
- Carvalho, A.B.; Arcuri, A.S.A.; Bedrikow, B.; Augusto, L.G.S.; Oliveira, L.C.C.; Bonciani, M.; Kato, M.; Gramacho, M.I -P.; Freitas, N.B.B.; & Novaes, T.C.P, 1995, - BENZENO Subsídios Técnicos à Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho (SSST/MTb); 2. ed. - São Paulo: FUNDACENTRO: FUNDUNESP, 86p..
- Costa, M. F. B.; "Machado, J. M. H.; Moreira, J. C.; Brickus, L. S. R., 2000, "Aplicabilidade do ácido trans,trans-mucônico urinário como indicador biológico na avaliação da exposição ocupacional ao benzeno", Revista Brasileira de toxicologia,13:63-68.
- Costa. M.F.B. 2001. "Estudo da Aplicabilidade do ácido trans,trans-mucônico urinário como Indicador Biológico de Exposição ao Benzeno", Tese de Doutorado, Rio de Janeiro, Escola Nacional de Saúde Pública.

PORTARIA N.º 672, DE 08 DE NOVEMBRO DE 2021
(DOU de 11/11/2021 - Seção 1)

- Coutrim, M.X -; Carvalho, L.R.F.; Arcuri, A. S. A ; 2000, "Avaliação dos métodos analíticos para a determinação de metabólitos do benzeno como potenciais biomarcadores de exposição humana ao benzeno no ar", Química Nova, 23(5): 653.
- Coutrim, M.X -; Jager, A.V -; Carvalho, L.R.F.; Tavares, M.F.M.; 1997, "Capillary electrophoresis determination of urinary muconic acid as a biological marker for benzene in cigarette smoke", J. Capillary Electrophor. 44:39.
- Coutrim, M.X -; 1998, "Desenvolvimento de metodologia analítica para a determinação de indicador biológico de exposição ao benzeno", Tese de doutorado. Instituto de Química, USP.
- DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft), 1996, "List of MAK and BAT Values, do, Report n° 32", página 156, item IX Carcinogenic Substances
- Drummond, L. R.; Luck, R.; Afacan, A.S.; Wilson, H. K. 1988, "Biological monitoring of workers exposure to benzene in the coke oven industry"; Br. J. Ind. Med. 45:256-261
- Ducos, P.; Gaudin, R.; Robert, A.; Francin, J.M.; Maire, C.; 1990, Improvement in HPLC Analysis of Urinary trans,trans-Muconic Acid, a Promising Substitute for Phenol in the Assessment of Benzene Exposure., Int. Arch. Occup. Environ. Health, 62: 529-534.
- Ducos, P.; Gaudin, R.; Bel, C.; Maire, C.; Francin, J.M.; Robert, A.; Wild, P.; 1992, "trans,trans-muconic acid, a reliable biological indicator for the detection of individual benzene exposure down to the ppm level", Int. Arch. Occup. Environ. Health, 64: 309-313.
- Freitas, N. B. B., Arcuri, A. S. A., 1997, "Valor de referência tecnológico (VRT) - a nova abordagem de controle da concentração de benzeno nos ambientes de trabalho", ReV –