

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

Departamento de Biologia Animal



Condensado do ar exalado como bioindicador humano de exposição ocupacional a chumbo

Cristiana Maria Viana Franco

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

Departamento de Biologia Animal



Condensado do ar exalado como bioindicador humano de exposição ocupacional a chumbo

Cristiana Maria Viana Franco

Orientadores:

Doutora Teresa Pinheiro (Instituto Tecnológico e Nuclear)

Doutora Ana Maria Crespo (Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa)

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

2009

Agradecimentos

À Doutora Teresa Pinheiro, orientadora externa deste trabalho, agradeço a disponibilidade, apoio em todas as situações e a autonomia que, após os primeiros passos, me incutiu e que permitiu uma aprendizagem muito mais rica.

À Doutora Ana Crespo, orientadora interna, pelas palavras sempre atenciosas e a preocupação.

À Doutora Marta Almeida, pela forma informal como me inseriu no projecto e nas amostragens do ar ambiente que posteriormente utilizei neste trabalho, as explicações e análises de amostras no Reactor.

À Doutora Alexandra Barreiros, pela simpatia e disponibilidade na análise das amostras por TXRF, permitindo a validação do nosso método, apesar das dores de cabeça provocadas pelas partículas.

O trabalho de laboratório não seria possível sem a Rute Pinheiro, que mantém a *casa* organizada, os *stocks* actualizados, conhece tudo como as palmas das mãos e não deixa que nos falte nada.

Ao (mestre) Pedro Félix por todo o apoio ao longo deste ano. As lições de estatística, a ajuda no laboratório, o conhecimento simultâneo dos pontos fortes e fracos do trabalho, as conversas durante o almoço (*grey's!*) e, principalmente, a companhia, mesmo quando ambos somos de poucas palavras.

Á (sôtora) Marta Santos por tornar os dias de ICP-MS muito mais agradáveis, além de produtivos. O pacto da Milli-Q não ficou esquecido e é incrível a ciência que se produz quando estamos as duas e o mestre Pedro no laboratório. Não há programa não *user-friendly* que nos resista!

Aos colegas, pela partilha de dúvidas existenciais, em especial à Bruna, por fazer parte deste projecto com o seu emblemático 'aguenta! aguenta!' e pela ajuda nas recolhas. À Andreia por ser a minha revisora e por aturar os desabafos. Ao físico Sérgio Nuno pelas polémicas conversas pós-almoço.

Não posso esquecer os motoristas do ITN (Sr. Carlos e Sr. João) pela disponibilidade, bem como os responsáveis das fábricas e os próprios trabalhadores, voluntários neste projecto. Sem a sua colaboração nada disto seria possível.

Aos Amigos, por me ajudarem a manter os níveis mínimos de sanidade mental, mesmo ouvindo repetidamente falar do trabalho, das análises e do tempo que escasseia. Os mais presentes, porque a vida assim o permite: a Patrícia dos golfinhos, o Bruno da genética, o Nabais da farmácia e a Patrícia dos curativos. Os lanches, jogos, cinemas e jantares tornaram-se quase indispensáveis.

O agradecimento à Família fica para o fim por ser o que dispensa mais facilmente as palavras. A paciência e o apoio incondicional fazem de mim uma privilegiada.

Ao Hugo, por tudo. Porque não faria sentido de outra forma (*o que se segue? o mundo?*).

Este trabalho foi realizado no âmbito do projecto PTDC/AMB/65828/2006 "Condensado do Ar Exalado: um indicador não invasivo da exposição individual a poluentes?" financiado pela Fundação para a Ciência e Tecnologia.

Resumo

A recolha do condensado do ar exalado (EBC, do inglês *exhaled breath condensate*) é um método não invasivo que pode fornecer informações sobre as vias respiratórias.

O presente trabalho pretendeu avaliar se a análise da composição do EBC poderia constituir um procedimento não invasivo de avaliação da exposição individual a poluentes em ambiente industrial.

Foi estudada a qualidade do EBC como bioindicador de exposição a poeiras e gases de chumbo no ambiente de trabalho em duas fábricas em que este metal é utilizado.

Foi recolhido EBC dos trabalhadores expostos para determinação dos níveis de chumbo e de outros metais em fases sucessivas da semana de trabalho, no início e no fim do turno. Os trabalhadores tiveram ainda uma avaliação funcional respiratória, por espirometria. O nível de partículas inaláveis no ambiente de trabalho foi avaliado com amostradores pessoais e os seus níveis de metais foram registados com amostradores fixos em locais seleccionados.

A análise elementar das partículas em suspensão no ar foi efectuada por INAA e PIXE, e do EBC por espectrometria de massa (ICP-MS). As metodologias de recolha, armazenamento e análise do EBC foram avaliadas tendo em conta o tempo de recolha, a homogeneidade da amostra e contaminações resultantes do manuseamento e armazenagem. A determinação elementar no EBC foi validada por inter-comparação dos resultados com a técnica certificada de TXRF.

Verificou-se que as concentrações elementares no EBC de trabalhadores expostos aumentaram ao longo da semana de trabalho (com excepção do zinco) nas duas fábricas, embora os níveis de concentração diferissem significativamente nas duas instalações fabris, reflectindo as diferenças entre os dois ambientes de trabalho. Verificou-se também uma correlação positiva entre as concentrações de chumbo no EBC e no sangue dos trabalhadores expostos.

Este trabalho contribuiu para o estabelecimento de uma metodologia de recolha e análise do EBC como bioindicador de exposição ocupacional.

Palavras-Chave

EBC, Chumbo, Bioindicador, Exposição ocupacional

Abstract

The collection of exhaled breath condensate (EBC) samples is a noninvasive method that can provide information about the respiratory pathways.

This work intended to evaluate if the analysis of the EBC composition may be applied as a noninvasive procedure to assess the individual exposure to pollutants in an industrial environment.

Therefore, the exhaled air quality was studied as a bioindicator of exposure to lead dust and aerosols in the working environment, where this metal is used.

The EBC was collect from exposed workers to assess the levels of lead and other metals at different stages of the work week, according to their shifts. The workers' respiratory function was also assessed by spirometry. The level of inhalable airborne particulate matter (APM) was evaluated at the work place by personal samplers and their metal concentration was assessed through steady samplers in selected places.

The elemental analysis of APM was performed by INAA and PIXE, and the EBC was studied by mass spectrometry (ICP-MS). The EBC sampling methodologies, storage and analysis were evaluated regarding the collection time, samples' homogeneity and contaminations resulting from the handling and storage. The elemental determination of EBC was validated by an inter-comparison of results with TXRF (a certified technique).

It was verified that the elemental concentrations of EBC in exposed workers tended to increase throughout the work week (except for zinc) in both industries, although the concentration levels were significantly different. This reflects the differences between the two working environments. It was also found a positive correlation between the concentrations of lead in EBC and in blood, in the exposed workers.

This work contributed to the establishment of a sampling and analysis methodology of EBC as a bioindicator of occupational exposure.

Key words

EBC, Lead, Bioindicator, Occupational exposure

Índice

AGRADECIMENTOS	iii
RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos gerais	2
1.2 Biomonitorização	3
1.3 Metais pesados e a Saúde	5
1.3.1 Chumbo e a Saúde	10
1.3.1.1 Consequências da exposição ao Chumbo	11
1.4 O sistema respiratório	13
1.5 Condensado do ar exalado: a nova abordagem	15
1.6 Análise da qualidade do ar: um complemento	18
1.7 Técnicas analíticas	20
1.7.1 ICP-MS	20
1.7.1.1 O equipamento	21
1.7.1.2 Interferências	24
1.7.1.3 Métodos de quantificação	25
1.7.1.4 Aplicações	26
1.7.2 TXRF	27
2 OBJECTIVOS	29
3 METODOLOGIAS	31
3.1 Trabalho preliminar	32
3.1.1 Seleccção dos indivíduos	32
3.1.2 Grupos de estudo	32
3.2 Métodos de estudo preliminar para definição da estratégia de recolha	33
3.3 Definição dos procedimentos de amostragem do EBC	34
3.3.1 Recolha e manuseamento do EBC	34

3.3.2	Tempo de recolha	36
3.3.3	Influência do ambiente exterior	36
3.3.4	Controlo das condições de recolha: temperatura	37
3.4	Métodos analíticos elementares	38
3.4.1	ICP-MS	38
3.4.2	TXRF	39
3.5	Material e reagentes	40
3.5.1	Controlo de contaminações em análise de elementos ultra-vestigiais	41
3.6	Preparação das amostras	43
3.7	Avaliação de Higiene Industrial	43
3.8	Qualidade do ar	44
3.9	Análise Estatística	45
4	RESULTADOS	46
4.1	Trabalho preliminar	47
4.1.1	Análise da Qualidade do ar	47
4.1.1.1	Amostradores estacionários	47
4.1.1.2	Amostradores pessoais	50
4.1.2	Validação e estabelecimento da metodologia	51
4.2	Caracterização elementar do EBC	54
4.2.1	Fábrica 1	54
4.2.2	Fábrica 2	56
4.2.3	Comparação das duas fábricas	58
4.3	Caracterização demográfica e clínica	58
4.3.1	Factores de risco: hábitos tabágicos	60
5	DISCUSSÃO	61
6	REFERÊNCIAS	67
7	ANEXOS	81

Índice de Figuras

Figura 1.1	Representação esquemática do sistema respiratório humano.	14
Figura 1.2	Representação esquemática de um amostrador Gent.	19
Figura 1.3	Representação esquemática do percurso da amostra no equipamento.	22
Figura 1.4	Representação esquemática do percurso dos iões através do detector.	23
Figura 1.5	Representação esquemática do percurso do feixe de raios-X, e das várias etapas, na geometria de reflexão total.	28
Figura 3.1	Equipamento EcoScreen completo, durante uma recolha de EBC (<i>esquerda</i>); Pormenor do sistema de válvulas unidireccionais (<i>direita</i>); a) sistema de válvulas unidireccionais; b) câmara de recolha arrefecida; c) sistema de refrigeração; d) bocal descartável; e) válvula unidireccional de inspiração; f) válvula unidireccional de expiração; g) tubo de recolha.	34
Figura 3.2	Equipamento de ICP-MS (ELAN DRC-e, PerkinElmer) (<i>esquerda</i>); Pormenor do nebulizador e da câmara de arrefecimento com sistema Peltier (<i>direita</i>).	38
Figura 3.3	Unidade de filtros em cascata (SFU) e impactador colocados no piso 1 da fábrica (<i>esquerda</i>); Trabalhador junto a um dos fornos (<i>direita</i>).	45
Figura 4.1	Valores médios das concentrações mássicas do material particulado (PM) na indústria (fábrica 1), em espaço <i>indoor</i> (escritórios, local controlo) e no ambiente (<i>outdoor</i>) (valores em $\mu\text{g}/\text{m}^3$).	47
Figura 4.2	Concentrações elementares (ng/m^3) obtidas por análise do material particulado $\text{PM}_{2,5}$, por INAA e PIXE.	48
Figura 4.3	Concentrações elementares (ng/m^3) obtidas por análise do material particulado $\text{PM}_{2,5-10}$ por INAA e PIXE.	49
Figura 4.4	Fotografias microscópicas de suportes utilizados em análise por TXRF, com amostra (ampliação: 100x-200x).	53
Figura 4.5	Concentração de Pb no EBC, em cada fase da semana de trabalho (a, b, c, d) para todos os indivíduos (N = 13) e grupo controlo (N = 22), na fábrica 1.	54
Figura 4.6	Concentração de Pb no EBC, em cada fase da semana de trabalho (a, d) para todos os indivíduos (N = 12) e grupo controlo (N = 22), na fábrica 2.	56
Figura 4.7	Comparação geral das diferenças (em percentagem) entre as concentrações elementares obtidas nas fases de recolha mais representativas (<u>a</u> e <u>d</u>).	58
Figura 4.8	Representação gráfica da relação entre a concentração de Pb no EBC e os hábitos tabágicos dos indivíduos expostos na fábrica 1 (1), na fábrica 2 (2) e dos controlos (3).	60

Índice de Tabelas

Tabela 3.1	Informações demográficas e clínicas dos indivíduos expostos e não expostos, representadas por médias, ou percentagens, e desvio padrão. FEV1 representa a percentagem média do Volume Expiratório Forçado (Forced Expiratory Volume) no primeiro segundo; as queixas incluem tosse ocasional, expectoração e pieira.	33
Tabela 3.2	Concentrações de Pb, obtidas por TXRF, em alíquotas de uma amostra de EBC, não filtradas e filtradas. Os valores são as concentrações obtidas em cada replicado, as respectivas médias e o desvio padrão.	35
Tabela 3.3	Concentrações elementares, obtidas por TXRF, em alíquotas de uma amostra de EBC, não filtradas e filtradas. Os valores são médias, desvios padrão e desvios padrão relativos, baseados em 9 alíquotas.	35
Tabela 3.4	Concentrações de Pb (ug/L) obtidas na determinação da influência do ambiente externo na recolha de EBC em dois ambientes distintos: não controlado (sala comum) e controlado (laboratório limpo, classe C ISO 7), com dois dos indivíduos anteriormente estudados como controlos. Os valores apresentados são médias e desvio-padrão.	36
Tabela 3.5	Controlo das condições de recolha com EcoScreen: controlo de temperatura	37
Tabela 3.6	Análise de tubos Eppendorf™ e de polipropileno, contendo apenas água ultrapura Milli-Q com 1% HNO3 65% Suprapur® (MERCK), por ICP-MS. Os valores apresentados são contagens, obtidas directamente pelo <i>software</i> do equipamento.	42
Tabela 4.1	Valores obtidos na caracterização da exposição ocupacional a chumbo, através de amostradores pessoais. Dados fornecidos pelo ISQ.	50
Tabela 4.2	Concentrações elementares médias no EBC (ng/mL) obtidas por TXRF e ICP-MS, para as diferentes fases de recolha dos indivíduos expostos (N=13) e para os controlos (N = 22). Os valores apresentados são médias e erros-padrão.	51
Tabela 4.3	Concentrações médias de Mn, Zn, Cu, Ni, Pb (ng/mL) e respectivos erros padrão obtidas por ICP-MS no material de referência certificado NIST1643e. São também indicadas as diferenças para o valor certificado expressas, em percentagem, obtidas para as técnicas de ICP-MS e de TXRF.	52
Tabela 4.4	Concentrações elementares no EBC, em cada fase da semana de trabalho (a, b, c, d) para todos os indivíduos (N = 13) e grupo controlo (N = 22), na fábrica 1. Os valores apresentados são médias e erro-padrão.	55
Tabela 4.5	Concentrações elementares no EBC, em cada fase da semana de trabalho (a, d) para todos os indivíduos (N = 12) e grupo controlo (N = 22), na fábrica 2. Os valores apresentados são médias e erro-padrão.	57
Tabela 4.6	<i>P-values</i> da relação entre as fases de amostragem na fábrica 2 (<u>a</u> e <u>d</u>) e o grupo controlo (CTR).	57
Tabela 4.7	Correlações entre antiguidade, FEV1 (%), concentração de Pb no sangue e concentrações elementares no EBC, nos indivíduos expostos na fábrica 1. Os valores apresentados são coeficientes de correlação de Spearman (r_s) com <i>p-value</i> <0.05.	59

1 | Introdução

1.1 Aspectos Gerais

Podemos estar expostos a agentes químicos, físicos e biológicos potencialmente perigosos que estejam presentes no ar, águas superficiais e solos. No entanto, a exposição não resulta apenas da presença do agente no ambiente. A palavra-chave na definição de exposição é contacto. Tem que haver contacto entre o agente e a barreira exterior do corpo humano, como as vias respiratórias, a pele ou a boca. A exposição é muitas vezes definida como uma função da concentração e do tempo: 'um evento que ocorre quando existe contacto na fronteira entre o humano e o ambiente com um contaminante de concentração específica durante um intervalo de tempo'. (Järup, 2003; Barbosa *et al.*, 2005)

As emissões atmosféricas tendem, então, a ser as mais preocupantes em termos de saúde humana, devido às quantidades envolvidas, à vasta dispersão e ao potencial de exposição que daí advém. (Järup, 2003; Mishra *et al.*, 2006)

Esta questão torna-se mais pertinente quando falamos em exposição ocupacional. Nas sociedades actuais, as pessoas passam cada vez mais tempo nos locais de trabalho, o que torna o estudo dos ambientes ocupacionais extremamente importante. Isto é válido para instalações fabris, mas também para edifícios de escritórios, apesar dos agentes potencialmente perigosos serem de natureza diferente.

Uma vez que as emissões antropogénicas afectam, primeiramente, quem está directamente em contacto com a fonte, fará sentido estudar trabalhadores nas instalações fabris onde passam, pelo menos, um terço do seu dia, e os agentes aos quais estão expostos. Em termos de monitorização biológica, o estudo da exposição a metais pesados na indústria metalúrgica tem aumentado, devido ao seu carácter potencialmente nocivo.

A evolução das técnicas analíticas tem permitido a exploração de novos meios biológicos a utilizar, de modo a permitir uma maior facilidade de recolha, de preferência de forma não invasiva e que torne mais exequível o acompanhamento dos trabalhadores expostos.

É, então, a junção da biomonitorização ocupacional e a pesquisa de novos bioindicadores, metais pesados e as técnicas analíticas apropriadas que se pretende desenvolver neste trabalho.

1.2 Biomonitorização

No nosso dia-a-dia, estamos constantemente expostos a substâncias que ocorrem naturalmente (encontradas no solo ou produzidas por plantas, animais ou outros organismos) e substâncias sintéticas (*p.e.* fármacos, detergentes, produtos de combustão, etc) no ambiente. Alguns químicos são gerados nos nossos corpos, outros são absorvidos através da alimentação, respiração e contacto com o que nos rodeia. Apesar da comunidade científica já ter verificado há muito tempo que o nosso organismo absorve quantidades muito pequenas de substâncias químicas simplesmente por haver interacção com o ambiente, a tecnologia actual permite detectar e medir concentrações vestigiais de muitas substâncias ambientais no organismo. Assim, essa medição de compostos vestigiais nos humanos é denominada de monitorização biológica, ou biomonitorização. (Amorim, 2003; Viau, 2005; Paustenbach & Galbraith, 2006)

Este termo é usado há muito tempo, e de forma mais alargada nas últimas duas décadas, para descrever a exposição e dose interna de metais, por medições em amostras biológicas como sangue ou urina, por exemplo. (Amorim, 2003; Viau, 2005; Aitio, 2006; Paustenbach & Galbraith, 2006)

O primeiro artigo científico sobre biomonitorização – análise do chumbo (Pb) na urina em trabalhadores expostos como forma de diagnóstico de doença industrial induzida por este metal – foi publicado em 1927. (Aitio, 2006; Angerer *et al.*, 2007; Boogaard 2007) No entanto, e apesar da biomonitorização ter a sua origem e mais vasta área de aplicação na determinação de exposição a químicos no local de trabalho, também tem feito importantes contribuições para a determinação de riscos para a saúde devidos a exposição ambiental. (Menezes *et al.*, 2004; Aitio, 2006; Markert, 2007)

Durante mais de um século, médicos ocupacionais e higienistas industriais monitorizaram populações de trabalhadores no que diz respeito à exposição a várias substâncias perigosas. A medicina clínica tem registado, ao longo dos séculos, a importância da medição de componentes de fluidos corporais como indicadores de risco para a saúde. (Corradi & Mutti, 2005; Albertini, 2006)

No início dos anos 1960 começaram a surgir técnicas analíticas que permitiam medir concentrações muito baixas de substâncias químicas no sangue e na urina. A título de exemplo, pode referir-se a espectrometria de absorção atómica que permitiu descobrir que a população geral dos países industrializados estava exposta a Pb num grau que requeria acções imediatas. Como consequência, o conteúdo de Pb da gasolina foi reduzido e pela primeira vez a biomonitorização humana foi usada em estudos populacionais alargados para determinar níveis de Pb no sangue e para controlar o sucesso das medidas tomadas. (Angerer *et al.*, 2007)

Assim, na determinação de exposição a metais, indicadores de efeito e indicadores de exposição têm sido considerados em vários documentos, publicados desde os anos 1970 pelo Comité Científico de Toxicologia de Metais da Comissão Internacional de Saúde Ocupacional (ICOH). (Aitio, 2006) No início dos anos 80 foi preparada a directiva europeia 80/1107/EEU, que fornecia a primeira base legal para a biomonitorização em cenário ocupacional a nível europeu. Em 1982 surgiu uma directiva que, a partir da anterior, regulamentava as concentrações de Pb no sangue (82/605/EEC). (Boogaard, 2007)

Um biomarcador é, então, um indicador que assinala um evento ou condição num sistema biológico ou amostra, dando uma medida de exposição, efeito ou susceptibilidade (IUPAC, 2004).

Enquanto um biomarcador de exposição relaciona a exposição a um xenobiótico (i.e., um metal ou composto metálico) aos níveis desta substância ou seus metabolitos, ou o produto de uma interacção entre a substância e uma molécula-alvo ou célula que pode ser medida num compartimento do organismo, um biomarcador de efeito é aquele que, dependendo da sua magnitude, pode ser reconhecido como associado a uma doença ou problema de saúde possível ou já estabelecido. (IUPAC, 2004; Aitio, 2006; Amorim & Cardeal, 2007; Angerer *et al* 2007; Markert, 2007)

Os biomarcadores de exposição podem então ser usados para identificar indivíduos ou grupos expostos, quantificar a exposição, determinar os riscos para a saúde ou assistir no diagnóstico de doença ocupacional (ou ambiental). (Menezes *et al.*, 2004; Aitio, 2006; Paustenbach & Galbraith, 2006; Markert, 2007)

Os biomarcadores de exposição reflectem a variação da exposição, e ao mesmo tempo a exposição de todas as fontes, estando assim mais próximos da concentração que é mais importante do ponto de vista toxicológico, relativamente ao químico no local alvo. (Amorim, 2003; Aitio, 2006)

Os biomarcadores não diferenciam entre fontes de exposição e, para diminuir o risco do químico, poderá ser necessário considerar (e analisar) separadamente os diferentes locais (trabalho, ambiente em geral, *hobbies*, entre outros aspectos que possam ser considerados relevantes).

Em cenário ocupacional, a quantificação da exposição normalmente refere-se a uma comparação da quantidade absorvida pelo corpo humano com a exposição equivalente ao limite de exposição ocupacional em vez de um derivado da dose (*p.e.* em mg/kg peso corporal). (Menezes *et al.*, 2004; Aitio, 2006)

Idealmente, os dados de biomonitorização ambiental, ocupacional e clínica seriam suportados pelo controlo da qualidade, padronização analítica, disponibilidade de grupos controlo e outros mecanismos de limitação de incerteza e variabilidade. (Aitio, 2006; Albertini, 2006; Boogaard, 2007) Para isso, no início dos anos 80, a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OCDE) avançou os princípios de boas práticas laboratoriais. Quase ao mesmo tempo, várias organizações em diversos países estabeleceram programas de controlo da qualidade para análises químicas para várias substâncias em meios biológicos. (Aitio, 1994; Angerer *et al* 2007)

Estas iniciativas tiveram efeitos profundos na validação de medições de biomarcadores, e um exemplo disso é a determinação do Pb no sangue. Desde a implementação dos programas de controlo da qualidade (QC/QA), os desempenhos analíticos dos laboratórios participantes apresentaram melhorias evidentes. Em 1979, dos 200 laboratórios participantes, apenas 45 (23%) apresentaram valores de Pb no sangue dentro dos limites de tolerância estabelecidos. 20 anos depois, dos 272 laboratórios participantes, 255 (94%) reportaram valores aceitáveis. (Aitio, 1994)

Os investigadores que trabalham nesta área sabem que é mais difícil obter resultados analíticos reproduzíveis e precisos nas concentrações mais baixas da gama em estudo. Como exemplo, as variações toleráveis dos valores de referência do chumbo no sangue vão desde 12% a 30%, enquanto as concentrações alvo se movimentam de 700 a 50µg/L. De forma geral, está reportado que os intervalos toleráveis de variações vão de 7.5-43.5% para substâncias inorgânicas e de 12-48% para substâncias orgânicas. É importante sublinhar que estes intervalos são estabelecidos apenas com base na variabilidade analítica do laboratório e não têm em conta a variabilidade biológica. (Aitio, 1994; Angerer *et al* 2007)

Uma característica que distingue a biomonitorização de químicos de, por exemplo, análises químicas clínicas é o facto da concentração do químico depender da cinética e do padrão de exposição. No local de trabalho, a exposição dura, no máximo, 8 horas diárias e muitas vezes até limitada a pequenos períodos de tempo durante as horas de trabalho. Alguns químicos, ou os seus metabolitos, têm tempos de meia-vida muito curtos no corpo humano, especialmente no sangue, baixando a concentração muito rapidamente logo após a exposição – e a concentração medida pode reflectir mais o período de tempo entre a exposição e a recolha da amostra do que a concentração original durante a exposição. (Menezes *et al.*, 2004; Aitio, 2006; Paustenbach & Galbraith, 2006)

No entanto, existem diferentes possíveis mecanismos de absorção, retenção e excreção de substâncias tóxicas pelo corpo humano, dependendo do elemento e as suas associações a outros elementos ou compostos (*p.e.* Fay & Mumtaz, 1996; Iavicoli *et al.*, 2007). Existem várias formas de determinar concentrações elementares no corpo humano mas, uma vez que eles não estão distribuídos igualmente por todos os órgãos, a utilização de amostras/tecidos diferentes deverá produzir resultados diferentes. Fluídos biológicos (urina, sangue, leite, suor, saliva) reflectem exposição a curto-prazo, enquanto os tecidos moles e duros (fígado, rins, placenta, tecido adiposo, ossos, dentes, cabelo e unhas) são melhores indicadores de exposição prolongada (Iyengar *et al.*, 1998; Hac *et al.*, 2000; Petersen *et al.*, 2000; Apostoli, 2002; Gomes *et al.*, 2004; Iavicoli *et al.*, 2007).

Os maiores desafios da biomonitorização incluem o desenvolvimento de métodos de monitorização, que sejam suficientemente acessíveis para serem aplicados com uma frequência que torna possível uma biomonitorização significativa de químicos com um curto tempo de meia-vida e o desenvolvimento de valores-guia de biomarcadores de exposição específicos para espécies individuais de diferentes metais. (Aitio, 2006; Paustenbach & Galbraith, 2006)

1.3 Metais pesados e a Saúde

Os metais (do grego '*metallon*') são elementos com propriedades físicas e químicas que dependem do seu reduzido número de electrões nas órbitas externas e com a tendência para formarem iões positivos. Nos não-metais (como o flúor, iodo, cloro, selénio, fósforo), poucos electrões faltam para completar a camada externa, enquanto que os metalóides (boro, arsénio, antimónio) apresentam características intermédias. Entre os 103 elementos da tabela periódica, 79 podem ser incluídos no

grupo dos metais, que podem ainda ser classificados como 'leves' ou 'pesados'. No entanto, e apesar de não haver uma definição clara de metal pesado, na maior parte dos casos a densidade é o factor determinante, sendo assim definido como aquele que tem uma massa específica de mais de 5g/cm³. (Apostoli, 2002; Järup, 2003)

Alguns metais representam um campo de interesse tradicional e bastante extenso no âmbito da medicina ocupacional e ambiental. Isto deve-se a exposições prolongadas, evidências de doenças específicas e, mais recentemente, à possibilidade de estudar de forma mais precisa a sua dose e efeitos. (Apostoli, 2002)

Os metais pesados têm sido usados em muitas áreas diferentes durante milhares de anos. A título de exemplo, pode referir-se que o chumbo é usado há pelo menos 5000 anos, sendo que as aplicações iniciais incluíam materiais de construção, pigmentos para cerâmica e canalização para transporte de água. O mercúrio era alegadamente usado pelos romanos como um bálsamo para as dores de dentes em crianças e foi posteriormente (entre 1300 e o final de 1800) usado como remédio para a sífilis. Claude Monet usava pigmentos de cádmio em meados do século XIX, mas a escassez do material limitou o uso em materiais artísticos até ao início do século XX. (Barry, 1975; Christensen, 1995; Hernberg, 2000; Apostoli, 2002; Järup, 2003)

Desde meados do século XIX, o processamento de metais pesados aumentou bastante, com emissões concomitantes para o meio ambiente. No entanto, no final do século XX, as emissões de metais pesados começaram a diminuir em países desenvolvidos por imposição legislativa (*p.e.* no Reino Unido, diminuíram mais de 50% entre 1990 e 2000). (Tong *et al.*, 2000; Apostoli, 2002; Järup, 2003; Barbosa *et al.*, 2005)

A exposição a metais (nomeadamente em cenário ocupacional) pode resultar num vasto leque de implicações para a saúde humana. Instalações industriais, como metalurgias, fundições, de plásticos ou de baterias, entre outras, apresentam-se como fontes potenciais de exposição perigosa para os seus trabalhadores (revisto por Waalkes *et al.*, 1992). Existem diversos elementos presentes nestes locais de trabalho industriais, normalmente sob a forma de particulado, e que se sabe apresentarem riscos para a saúde humana, como o arsénio, crómio, cobalto, níquel, cobre, níquel, zinco, manganês, além dos referidos anteriormente. Alguns são conhecidos carcinogénicos, enquanto que para outros as evidências são limitadas (Sunderman, 1978, 1984; Kazantzis; 1981; Ishinishi *et al.*, 1986; Kazantzis & Lilly, 1986; Peters *et al.*, 1986; Norseth, 1988; IARC, 2003), mas todos apresentam riscos para a saúde dos indivíduos expostos (*p.e.* Sunderman, 1978; Kazantzis, 1981; Kazantzis & Lilly, 1986; Peters *et al.*, 1986; Reeves, 1986; Tsuchiya, 1986; Chia *et al.*, 1989; Waalkes & Oberdorster, 1990; Kasprzak, 1991; WHO, 1991; Stohs & Bagchi, 1995; Beckman & Ames, 1998; Hartwig, 2000; Hernberg, 2000; NRC, 2001; Wasowicz *et al.*, 2001; Antonini *et al.*, 2005).

Apesar dos efeitos adversos dos metais pesados serem conhecidos há muito tempo, a exposição da população a estes metais continua a ser um problema relevante em saúde. (Tong *et al.*, 2000; Järup, 2003; Brodtkin *et al.*, 2007)

Dentro desse âmbito, muitos estudos têm focado a toxicidade induzida pelos metais, enfatizando o seu papel na geração de espécies reactivas de oxigénio e de azoto em sistemas biológicos. A formação de radicais livres mediada por metais pode causar várias modificações nas bases de DNA, aumentando a peroxidação lipídica, bem como alterações na homeostase de diversos elementos essenciais. (Valko *et al.*, 2006) Por exemplo, a maioria dos elementos do quarto grupo é carcinogénica, podendo assumir-se que esse efeito está relacionado com a estrutura electrónica dos metais de transição (Ho *et al.*, 2002).

Segundo Valls e de Lorenzo (2002), podemos classificar os metais em três categorias, do ponto de vista fisiológico:

- i) essenciais não-tóxicos, *p.e.* Ca e Mg;
- ii) essenciais mas nocivos acima de determinada concentração, *p.e.* Fe, Mn, Zn, Cu, Co, Ni;
- iii) tóxicos, quando prejudicam o crescimento ou o metabolismo de um organismo, *p.e.* Hg, Pb e Cd. (Fasim *et al.*, 2002)

Os metais e os compostos metálicos podem ser absorvidos por ingestão, inalação e por vezes até através da pele. Uma vez absorvidos, os iões metálicos e os compostos entram no sangue e ligam-se principalmente aos glóbulos vermelhos e/ou às proteínas do plasma. Através da corrente sanguínea, os metais são então distribuídos pelo organismo. O fígado e os rins têm uma elevada capacidade de ligação a metais. Os ossos e outros tecidos mineralizados como os dentes, podem funcionar como órgãos de armazenamento para os metais (Mallinckrodt & Meissner, 1994) Em termos de vias de excreção, a urina e as fezes são as principais vias, dependendo muitas vezes do tipo de absorção.

Os metais essenciais que são requeridos para o funcionamento celular de tecidos e órgãos, e cujas concentrações são reguladas por processos fisiológicos específicos, podem apresentar-se em concentrações acima das quais se tornam tóxicos, sobretudo por inalação.

Como exemplo podemos referir o cobre que, integrando várias enzimas, acima de determinadas concentrações se torna tóxico. O excesso de cobre acumula-se no fígado, sendo a sua forma mais tóxica o ião Cu^+ . Existem evidências epidemiológicas, nomeadamente a elevada incidência de cancro entre os caldeireiros, que sugerem um efeito carcinogénico do cobre. Nos seres humanos não estão descritos casos de envenenamento crónico por este metal, mas existem registos de envenenamento agudo por ingestão, com sintomas que incluem danos no fígado e rins, e febre com sintomas de gripe. (Sze *et al.*, 1996).

O cobalto pode ser encontrado na natureza, nomeadamente no solo em baixas concentrações, mas normalmente é recuperado em fundições, e já foram registados efeitos respiratórios adversos. (Merck Index, 1989) As vias de absorção descritas são a inalação e a ingestão, sendo que esta última está dependente de outros factores, como a presença de ferro, aminoácidos e proteínas. A vitamina B12 (cianocobalaminas) contém cobalto e é necessária para o crescimento de tecidos. Grande parte do

Co presente no organismo incorpora-se nas cobalaminas ou liga-se a proteínas de baixo peso molecular, enquanto que o restante se acumula nos ossos. Em termos de toxicidade, os casos agudos apresentam como manifestações edema pulmonar, alergia, náuseas, enquanto que a toxicidade crónica pode originar síndromas pulmonares, irritação gastrointestinal, cardiomiopatia e lesões na tiróide. (Smith *et al.*, 1972; Wehner & Craig, 1972; Weinzierl & Web, 1972; Barnes *et al.*, 1976; Leboulanger, 1977; Tailor & Marks, 1978; Barton *et al.*, 1981)

No que diz respeito ao manganês, é o 12º elemento mais abundante na crosta terrestre e, apesar do manganês metálico puro não ser muito utilizado, os seus compostos são usados em fertilizantes, rações de animais, produtos farmacêuticos, tintas, entre outros. A principal via de absorção é a ingestão, e a sua importância no desenvolvimento cerebral e do sistema nervoso central foi já reconhecida. A via de excreção do Mn tem sido um ponto de controvérsia entre autores, dependendo do tipo de estudos realizados. O tempo de meia-vida do ⁵⁴Mn no organismo humano pode ir desde 4 dias a 39 dias. (Mahoney & Small, 1968; Crerar *et al.*, 1980; Benko & Cikrt, 1984)

O ferro é o 4º elemento mais abundante na crosta terrestre, mas raramente se apresenta como metal livre. É o metal mais barato e o mais utilizado, principalmente na forma de aço (ferro endurecido com carbono). É um micronutriente essencial utilizado em quase todos os aspectos do funcionamento normal de uma célula. A principal via de absorção do Fe é o tracto gastrointestinal e acumula-se principalmente no sangue (hemoglobina). As suas concentrações no organismo devem ser estáveis, sendo importante perceber que tanto o excesso como a deficiência podem ser bastante prejudiciais. Existem proteínas (transferrina, lactoferrina e ferritina) que mantêm o Fe numa forma solúvel e biodisponível, enquanto previnem que este catalize reacções que produzem produtos oxidativos perigosos. (Alexander, 1994; Ghio *et al.*, 2006; Gutteridge *et al.*, 2006)

Também o zinco é um elemento vestigial essencial ao organismo humano. A sua absorção ocorre essencialmente a nível do intestino delgado. No sangue, o zinco absorvido é distribuído pelos glóbulos vermelhos, plasma e glóbulos brancos; no entanto, diferentes factores influenciam a absorção do Zn²⁺, como as proteínas animais, ácidos gordos insaturados, elevados níveis de cobre e compostos minerais ferrosos que competem com o Zn pela absorção e até a idade do indivíduo. (Fisher, 1975) Os músculos armazenam a maior parte do Zn presente no organismo, seguidos pelos ossos. O Zn é necessário para várias funções fisiológicas, incluindo o crescimento e multiplicação de células, integridade da pele, metabolismo ósseo, fertilidade, sistema imunitário, entre muitas outras. É relativamente pouco tóxico mas doses elevadas podem originar problemas, como sintomas a nível gastrointestinal, uma diminuição na síntese do grupo heme ou hiperglicemia. (Neve & Perets, 1988; Kruse-Jarres, 1989)

Em termos de elementos não essenciais, e do ponto de vista ecotoxicológico, os metais mais perigosos são, como já foi referido, o mercúrio, o chumbo, o cádmio e o crómio na sua forma hexavalente (Ahluwalia & Goyal, 2007).

O mercúrio tem vindo a requerer menos atenção pois está a cair em desuso nos processos industriais fruto da introdução de novas tecnologias (Volesky & Holan, 1995). Ainda assim, as formas mais

importantes de exposição humana a Hg são a inalação e a ingestão (através da dieta) (WHO, 1990, 1991), sabendo-se que cerca de 80% do vapor de mercúrio inalado é retido nos pulmões e subsequentemente na corrente sanguínea. (Hursh *et al.*, 1980) O mercúrio pode ter um tempo de meia-vida de poucas semanas até vários anos, dependendo do tipo de compostos (Cherian *et al.*, 1978; Kershaw *et al.*, 1980; Sherlock *et al.*, 1984; Clarkson *et al.*, 1988; Järup, 2003). Estima-se que menos de 10% do Hg inorgânico originado pela dieta seja absorvido (Hursh *et al.*, 1976; Elinder *et al.*, 1988; WHO, 1991). Em contraste, o metilmercúrio na alimentação pode ter uma taxa de absorção até 95% (Clarkson, 1972). Este tempo de resiliência resulta da acumulação em diferentes órgãos como os rins, fígado, baço, cérebro, mas também as glândulas tireóide e pituitária, o pâncreas e os órgãos reprodutivos (Bidstrup, 1972; Nylander *et al.*, 1987, 1989; WHO, 1991; Drasch *et al.*, 1992; Järup, 2003), sendo principalmente eliminado através da urina em casos de exposição elevada (WHO, 1991).

O cádmio é muito utilizado em baterias recarregáveis de níquel-cádmio, em pigmentos, revestimentos, ligas e componentes para electrónica (Järup, 2003; Zouboulis *et al.*, 2004), estando também presente em fertilizantes e fungicidas (Adamis *et al.*, 2003). A exposição crónica a elevados níveis de cádmio pode provocar disfunções renais, degeneração dos ossos, danos no fígado e no sangue, sendo o cádmio e os seus compostos considerados carcinogénicos para o Homem (Järup, 2003; Sheng *et al.*, 2004).

A concentração de Cd pode ser determinada no sangue (onde se encontra parcialmente acumulado nos eritrócitos – 70%) no que diz respeito à intensidade da exposição (Herber *et al.*, 1988; Herber, 1994). As principais formas de eliminação são as fezes (que representam o Cd ingerido) e a urina (WHO, 1992). Tanto o Cd no sangue como na urina são usados em biomonitorização, mas o último mostra melhores resultados no que diz respeito a exposições recentes, apesar de reflectir alguma acumulação de Cd nos rins, enquanto que o sangue apresenta resultados mais fiáveis para exposições prolongadas (Nordberg & Nordberg, 1988, Janup *et al.*, 1997; Norseth & Cecutti, 1979; WHO, 1979).

A urina também pode ser um bom meio de testar a exposição ao níquel (McNeely *et al.*, 1972; Domingo *et al.*, 2001), que é acumulado principalmente nos rins, mas também nas glândulas endócrinas, pulmões, fígado e cérebro. (Sarkar, 1980; Schaller *et al.*, 1994)

A estimativa para a meia-vida do Ni (incluindo testes em animais) pode variar desde algumas horas até vários meses, dependendo do composto e da via de absorção (Tossavainen *et al.*, 1980; Christensen & Lagesson, 1981; Raithel *et al.*, 1982; Tanaka *et al.*, 1985, 1988). Yoshioka *et al.* (2008) registou as concentrações de Ni e Cd na urina de trabalhadores em baterias de Ni-Cd durante uma semana de trabalho e os níveis de Ni aumentaram ao longo da semana, enquanto que os níveis de Cd se mantiveram estáveis, o que pode sugerir que o organismo tende a ser mais conservativo em relação ao Cd.

Outro potencial poluente bastante descrito na literatura é o crómio. Este metal ocorre normalmente em dois estados oxidativos, Cr(III) e Cr(VI). O Cr(VI) é o agente mais perigoso associado a efeitos

tóxicos agudos e crónicos, bem como ao cancro (Herold & Fitzgerald, 1994; ATSDR, 2000; De Flora, 2000). A absorção ocorre principalmente através dos pulmões, por inalação de material particulado e fumos (ATSDR, 2000; Caglieri *et al.*, 2006). No entanto, o Cr é também absorvido através do tracto gastrointestinal e pele (O'Flaherty *et al.*, 2001). A urina é a principal forma de excreção e nas primeiras duas horas após a absorção (Herold & Fitzgerald, 1994), mas o sangue parece ser mais adequado como indicador de exposições prolongadas, como demonstrado por Sheepers *et al.* (2008).

Dada a relevância do Pb na saúde humana, bem como a sua utilização industrial actual, é um excelente candidato a estudos em cenário ocupacional, pelo que seguidamente se fará uma descrição mais pormenorizada das suas implicações na saúde.

1.3.1 Chumbo e a Saúde

O chumbo foi um dos primeiros metais a ser processado pelo Homem, tendo sido encontrado em artefactos do antigo Egipto, que datam de 3500 a.C.. (Hernberg, 2000; Tong *et al.*, 2000; Järup, 2003; Gidlow, 2004; Toscano & Guilarte, 2005; Stoleski *et al.*, 2008).

Existem evidências da utilização do Pb metálico na China (ca 3000 a.C.), e de explorações Fenícias na Península Ibérica, em 2000 a.C.. No século V a.C os Romanos fizeram uma exploração extensiva (uma média de 60 000 toneladas de Pb, ao longo de 400 anos) dos depósitos de chumbo em toda a Península Ibérica. O envenenamento por Pb era, então, comum na Roma Antiga, devido às mais variadas utilizações deste metal. Diz-se até que este envenenamento era 'epidémico' e poderá ter contribuído para a decadência e posterior queda do império Romano. (Gilfillan, 1965; Hernberg, 2000; Voleski 2001).

Até há poucas décadas a população, em geral, estava significativamente exposta a chumbo devido às loiças de cerâmica fracamente vidradas, o uso de solda de chumbo nas latas de alimentos, níveis elevados de chumbo na água de consumo em grande parte resultante da utilização de chumbo nas canalizações na rede de distribuição, o uso de compostos de chumbo em tintas e cosméticos, deposição nas culturas, as poeiras de fontes industriais, gasolina, etc.. Foi uma importante causa de morbidade e mortalidade durante a Revolução Industrial e o controlo efectivo de trabalhadores em chumbo só ocorreu em meados do século XX. (Tong *et al.*, 2000; Gidlow, 2004; Toscano & Guilarte, 2005)

Durante o século passado, as emissões de chumbo que mais contribuíram para a poluição do ar ambiente, provinham do petróleo (combustíveis / gasolina) estimando-se em cerca de 50%, sendo sem dúvida as mais importantes. Nas últimas décadas, no entanto, as emissões de chumbo nos países desenvolvidos têm diminuído drasticamente devido à introdução de gasolina sem chumbo, tendo-se verificado também uma diminuição dos níveis sanguíneos de chumbo na população. (Järup, 2003; Barbosa *et al.*, 2005)

A exposição ocupacional a chumbo inorgânico ocorre em minas e fundições, bem como em fábricas

de soldadura de metal pintado com chumbo e fábricas de baterias e reciclagem. O chumbo transportado pelo ar pode ser depositado no solo e na água, atingindo assim os humanos através da cadeia alimentar. Até 50% do chumbo inalado pode ser absorvido nos pulmões. Cerca de 78% do Pb absorvido concentra-se no ossos, enquanto que apenas 2% do Pb do organismo se encontram no sangue (Barry, 1975). No sangue, o Pb liga-se aos eritrócitos, tendo um tempo de meia-vida de 1 mês, pelo que apenas uma reduzida percentagem se dissemina no plasma (Christensen & Kristiansen, 1994). A sua eliminação é relativamente lenta e através da urina. Acumula-se preferencialmente no esqueleto libertando-se lentamente (o tempo de meia-vida ronda os 20-35 anos), embora a acumulação no fígado e nos rins também possa ser relevante. (Hernberg, 2000; Tong *et al.*, 2000; Järup, 2003; Toscano & Guilarte, 2005; Mishra *et al.*, 2006; Stoleski *et al.*, 2008)

Tendo em conta a longa história da toxicidade do chumbo e as extensas publicações (é, provavelmente, a toxina ocupacional mais estudada), poderíamos pensar que a exposição a este metal é controlada e que o envenenamento por chumbo era apenas uma entidade histórica, mas não é isso que acontece. A exposição ao chumbo é actualmente bem controlada nas maiores indústrias de chumbo, como fundições e manufactura de baterias. No entanto, existem indústrias (particularmente na indústria da demolição) onde ainda persiste o envenenamento por chumbo. Apesar da produção de alquios de chumbo (agora apenas chumbo tetraetilado) estar em rápido declínio com o aumento mundial do uso de gasolina sem chumbo, também o envenenamento com chumbo orgânico é ainda ocasionalmente verificado em funcionários de limpeza de tanques (armazenamento de gasolina que continha chumbo). (Tong *et al.*, 2000; Gidlow, 2004; Toscano & Guilarte, 2005; Mishra *et al.*, 2006; Stoleski *et al.*, 2008)

1.3.1.1 Consequências da exposição ao chumbo

No que diz respeito aos efeitos mais directos no Homem, nos adultos o chumbo inorgânico é rapidamente absorvido pelos sistemas gastrointestinal e respiratório, mas não penetra significativamente na barreira hematoencefálica. No entanto, as crianças são especialmente susceptíveis à exposição ao chumbo e ao subsequente dano cerebral, devido ao elevado *uptake* gastrointestinal e à barreira hematoencefálica mais permeável, por se encontrar ainda pouco desenvolvida. (Hernberg, 2000; Järup, 2003; Gidlow, 2004; Toscano & Guilarte, 2005)

Existem também evidências de que certos factores genéticos e ambientais podem aumentar os efeitos deletérios do chumbo no desenvolvimento neurológico, confirmando a vulnerabilidade das crianças à neurotoxicidade do chumbo. (Järup, 2003; Toscano & Guilarte, 2005)

A controvérsia mantém-se e os estudos sucedem-se, havendo autores que afirmam que os estudos realizados não fornecem dados adequados para retirar conclusões firmes acerca dos efeitos biológicos dos níveis actuais de exposição. (Gidlow, 2004)

Em indivíduos expostos na sua actividade laboral, alguns estudos demonstraram um abrandamento

no tempo de reacção sensorial e motora em homens que trabalham com chumbo e algum distúrbio da função cognitiva em trabalhadores com níveis de chumbo no sangue superiores a $40\mu\text{g}/100\text{mL}$. Têm sido observadas alterações subtis na função neuropsicológica de indivíduos que trabalham com chumbo inorgânico, tais como a *performance* visual e motora, memória, atenção, com níveis de chumbo no sangue superiores a $50\mu\text{g}/100\text{mL}$. (Hernberg, 2000; Gidlow, 2004)

Exposições prolongadas e níveis sanguíneos da ordem de $60\mu\text{g}/100\text{mL}$ podem originar sintomas nos nervos periféricos com redução na velocidade de condução do nervo e redução da sensibilidade dérmica. Se a neuropatia for severa, a lesão pode ser permanente. (Järup, 2003; Toscano & Guilarte, 2005)

Outra área que tem vindo a ser explorada é a toxicologia reprodutiva, uma vez que, a níveis muito elevados de chumbo no sangue, o metal é um poderoso 'abortivo'. A níveis mais baixos, tem sido associado com abortos espontâneos e baixos pesos ao nascimento. (Gidlow, 2004; Bellinger, 2005)

A toxicidade reprodutiva do chumbo em trabalhadores masculinos tem sido estudada mas, até à data, os resultados têm sido inconsistentes. Alguns estudos mostraram reduzida contagem de espermatozóides e reduzida mobilidade, mas existem poucos dados que demonstrem um efeito na capacidade reprodutiva. Além disso, muitos desses estudos não tiveram em consideração potenciais factores de interferência como outras exposições ocupacionais (*p.e.* calor e solventes) ou factores sociais, como o consumo de álcool, o tabaco ou o uso de medicação. (Gidlow, 2004; Bellinger, 2005)

A informação disponível actualmente indica que efeitos significativos na capacidade reprodutiva não são observados em concentrações de chumbo no sangue inferiores a $50\mu\text{g}/100\text{mL}$, mas concentrações superiores a $40\mu\text{g}/100\text{mL}$ podem afectar a morfologia e função dos espermatozóides. (Gidlow, 2004; Bellinger, 2005)

Foi também descrita uma associação entre exposição a baixos níveis de chumbo e o aumento da pressão sanguínea, mas os resultados não são suficientemente consistentes, nem consideraram a influência de factores como a obesidade, o tabaco e o consumo de álcool. (Järup, 2003; Gidlow, 2004)

O chumbo pode influenciar a função renal quando os níveis de chumbo no organismo se mantiverem acima do valor limite de exposição (VLE = $150\mu\text{g}/\text{m}^3$, DL 274/89 de 21 de Agosto). Os estudos realizados até agora chegam a mostrar algumas correlações interessantes, mas continua tudo em aberto para discussão, uma vez que ainda não se sabe se os resultados obtidos são clinicamente significativos, se representam pequenas modificações celulares ou alterações funcionais significativas, ou até se deficiências renais pré-existentes poderão levar a níveis mais elevados de chumbo no sangue. Ainda não existem dados fiáveis sobre a influência dos níveis actuais de exposição a chumbo nas afecções renais mas, uma vez que já foi sugerido que estas alterações estejam relacionadas com a dose acumulada de chumbo e não com a concentração de chumbo no sangue (que reflecte fundamentalmente exposição recente a este metal), as medições de acumulação do metal, no osso por exemplo, podem dar uma correlação mais aproximada. (Järup, 2003; Gidlow, 2004)

Em estudos experimentais efectuados em animais, o chumbo pode reduzir a imuno-resistência e aumentar a mortalidade. No entanto, não existem estudos que permitam retirar conclusões similares em humanos. (Gidlow, 2004)

Não se poderia estudar o impacto do chumbo na saúde humana sem mencionar os seus efeitos carcinogénicos. No entanto, estudos epidemiológicos coordenados pela *International Agency for Research on Cancer* (IARC) para avaliação da capacidade cancerígena do Pb (IARC 1980) quer nas suas formas orgânicas ou inorgânicas (IARC 2006) não têm sido conclusivos.

Apesar do valor dos estudos científicos realizados ao longo dos anos sobre os efeitos tóxicos do chumbo, ainda existem falhas no conhecimento e incertezas sobre os efeitos na saúde de exposições a baixos níveis de chumbo. Não existem dúvidas de que estamos perante uma estreita margem de segurança entre os actuais limites ocupacionais de chumbo no sangue e a evidência de efeitos clínicos. A pressão na indústria irá continuar para que seja reduzida a exposição ocupacional, quer por implementação de medidas de higiene mais restritas quer por instalação de equipamentos que limitem o nível de poeiras e fumos no local de trabalho. (Hernberg, 2000; Gidlow, 2004)

Assim, a principal forma de exposição ao chumbo, a nível ocupacional, é através da inalação. Como tal, faz sentido percebermos, de forma geral, como funciona o sistema respiratório e de que forma as trocas gasosas a nível alveolar podem favorecer a absorção de chumbo pelos tecidos pulmonares.

1.4 O Sistema Respiratório

Como se sabe, o sistema respiratório dos humanos e outros mamíferos é responsável pela entrada, filtração, aquecimento, humidificação e saída de ar do organismo. Permite as trocas gasosas com o meio ambiente, oxigenando o sangue e possibilitando a respiração celular. O processo de troca gasosa no pulmão (oxigénio por dióxido de carbono) é denominado hematose pulmonar.

Os órgãos do sistema respiratório (representados na figura 1.1), além dos dois pulmões, incluem as fossas nasais, boca, faringe (nasofaringe), laringe, traqueia, brônquios (e as suas subdivisões), bronquíolos (e as respectivas subdivisões), os alvéolos pulmonares reunidos em sacos alveolares e o diafragma. (Guyton, 1988; Jacob, Francone & Lossow, 1990; Mallinckrodt & Meissner, 1994)

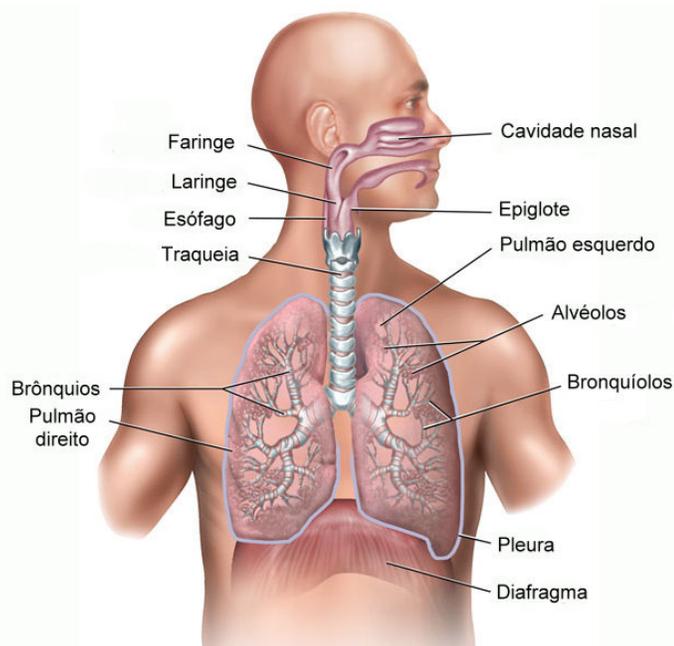


Figura 1.1: Representação esquemática do sistema respiratório humano (adaptado de <http://www.cponline.org/>)

Em condições normais de respiração, o ar passa pelas fossas nasais onde é filtrado por pêlos e muco, e aquecido pelos capilares sanguíneos do epitélio respiratório (tecido altamente vascularizado). Passa então pela faringe, laringe, traqueia, brônquios, bronquíolos, depois alvéolos, onde ocorre a hematose. (Guyton, 1988; Jacob, Francone & Lossow, 1990; Mallinckrodt & Meissner, 1994)

A função do sistema respiratório é basicamente garantir as trocas gasosas com o meio (hematose), mas também ajuda a regular a temperatura corporal, o pH do sangue e a liberação de água.

A inspiração e a expiração são processos passivos do pulmão já que este não se movimenta, ficando essa função a cargo do diafragma, dos músculos intercostais e da expansibilidade da caixa torácica, que garante a conseqüente expansão do pulmão graças à coesão entre a pleura parietal (fixa na caixa torácica) e a pleura visceral (fixa no pulmão). (Jacob, Francone & Lossow, 1990; Mallinckrodt & Meissner, 1994)

Muito do ar que é transportado para as vias respiratórias a cada respiração, nunca atinge os alvéolos, por encher as passagens como o nariz, a faringe, a traqueia e os brônquios. Em seguida, esse ar é expirado, sem nunca ter entrado nos alvéolos. Do ponto de vista da oxigenação do sangue, esse ar é completamente inútil. Por isso, as vias respiratórias constituem o 'espaço morto'. O volume total desse espaço é, normalmente, de 150mL, o que quer dizer que, durante a inspiração de um volume corrente normal de 500mL, apenas 350mL de ar novo chegam aos alvéolos. (Guyton, 1988)

Desta forma, a medida mais importante da eficiência da respiração de uma pessoa é a sua ventilação alveolar, definida como a quantidade total de ar 'novo' que chega aos alvéolos a cada minuto. Se a cada inspiração, apenas 350mL de ar novo entram nos alvéolos e a frequência de respiração é de 12 por minuto, a ventilação alveolar tem um valor médio de 4200mL/min. Durante o esforço respiratório

máximo, esse valor pode ser aumentado até ao máximo de 120L/min e, no extremo oposto, uma pessoa pode permanecer viva, pelo menos por algumas horas, com ventilação alveolar de apenas 1200mL/min. (Guyton, 1988)

Após cada expiração, em termos aproximados, permanecem 2300mL de ar nos pulmões, sendo esse volume denominado capacidade funcional residual. A cada inspiração, 350mL de ar novo são adicionados a esse ar e, a cada nova expiração, igual volume de ar é removido. Foi através da espirometria (medição do volume de ar trocado durante a respiração) que se tornou possível conhecer estes volumes e obter mais informações acerca da capacidade respiratória (Guyton, 1988)

Na ventilação alveolar normal, de 4200mL/min, cerca de metade dos gases alveolares é trocada por ar novo a cada 23 segundos. Essa renovação lenta do ar nos alvéolos impede que as concentrações gasosas alveolares variem de forma acentuada a cada respiração. (Guyton, 1988)

Estas trocas gasosas e volumes de ar inspirado e expirado têm tido um papel mais relevante a nível clínico e ocupacional nos últimos anos.

1.5 Condensado do ar exalado: a nova abordagem

A análise da respiração tem sido usada em medicina ocupacional desde 1930, quando surgiram os primeiros relatórios de estudos sobre exposição humana a compostos orgânicos voláteis. O desenvolvimento de métodos de análise mais sensíveis, com novas técnicas de extracção e detecção permite a determinação de substâncias químicas em quantidades vestigiais no ar exalado e tem contribuído para o melhoramento da análise do ar exalado como biomarcador de monitorização de exposição biológica (ambiental e ocupacional) a vários agentes químicos voláteis. (Effros *et al.*, 2004; Amorim & Cardeal, 2007)

Em 1980 foi publicado um artigo piloto, em russo, sobre o ar exalado com o título 'Propriedades da superfície activa do condensado do ar exalado: um novo método de estudo da função pulmonar' por Sidorenko *et al.* (1980).

Além da função pulmonar, cujo estudo é extremamente importante e pertinente, o ar exalado deverá ainda conter informação acerca do ar inalado pelo indivíduo e dos materiais acumulados na superfície das vias respiratórias e nos pulmões. Partindo desse princípio, e uma vez que é o maior mecanismo de perda insensível de água do nosso organismo, foi sugerida a análise do ar exalado, tendo em conta o volume expirado. No entanto, a análise de pequenas amostras gasosas de composição praticamente desconhecida não seria uma tarefa simples. Uma vez que é a partir dos problemas que surgem as soluções, o passo seguinte foi encontrar uma forma de condensar o ar exalado pelos indivíduos em estudo, normalmente num cenário clínico, obtendo-se assim um condensado (em inglês, *exhaled breath condensate*, EBC), por arrefecimento do ar exalado sob condições de respiração espontânea. (Scheideler *et al.*, 1993; Kharitonov, 2001; Hunt, 2002; Effros *et al.*, 2004; Goldoni *et al.*, 2004; Muller *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2008)

Sabe-se agora que o EBC, apesar de conter predominantemente vapor de água, tem dissolvidos compostos não voláteis, incluindo citocinas, lípidos, surfactante, iões, produtos de oxidação e pequenas moléculas, tais como adenosina, histamina, acetilcolina e serotonina, entre muitos outros compostos. Além disso, o EBC retém compostos hidrossolúveis potencialmente voláteis, incluindo amónia, peróxido de hidrogénio, etanol e outros compostos orgânicos. (Hunt, 2002; Corradi & Mutti, 2005; Horvath *et al.*, 2005; Corradi *et al.*, 2008; Gergelova *et al.*, 2008)

Inicialmente, o EBC foi explorado para avaliar diversas patologias pulmonares e processos fisiológicos (através da determinação de componentes inflamatórios e bioquímicos), uma vez que os métodos existentes eram bastante invasivos para o paciente, como a broncoscopia, o que tornava ainda mais complicados os exames em crianças.

A grande variedade de compostos biologicamente relevantes presentes no fluido e as suas alterações previsíveis durante processos patológicos levantam a possibilidade de novas descobertas resultantes da expansão do uso de ensaios com EBC para investigação de mecanismos de doenças pulmonares, principalmente quando se trata de determinar alterações agudas de doenças como a asma ou doença pulmonar obstrutiva crónica (DPOC), para as quais os métodos invasivos não se aplicam. (Hunt, 2002; Corradi & Mutti, 2005; Cao & Duan, 2006; Cáp *et al.*, 2008; Epton *et al.*, 2008; Gergelova *et al.*, 2008)

Na maioria dos trabalhos publicados até 2002, os investigadores usaram o EBC em estudos essencialmente populacionais e descritivos, comparando médias de grupos. Estes trabalhos descrevem alterações nos mediadores inflamatórios e produtos de espécies redox de oxigénio e azoto associadas a patologias do sistema respiratório fornecendo, no entanto, algumas informações adicionais acerca dos mecanismos da asma, fibrose quística e DPOC. (Kharitonov 2001; Hunt, 2002; Cao & Duan, 2006; Muller *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2008; Gergelova *et al.*, 2008)

Nos últimos anos têm sido descritos métodos de utilização em diferentes cenários, como em ambiente ocupacional, onde o carácter não invasivo do método é de extrema importância. (Hunt, 2002; Effros *et al.*, 2004; Goldoni *et al.*, 2004; Chan *et al.*, 2008; Gergelova *et al.*, 2008; Broding *et al.*, 2009)

No estudo de Goldoni *et al.* (2004), possivelmente um dos primeiros trabalhos a utilizar a análise do EBC em cenário ocupacional, foi demonstrado que o EBC pode ser uma matriz adequada não só para determinar os biomarcadores de stress oxidativo em trabalhadores expostos a diversas substâncias, como também para quantificar os níveis de alguns compostos pneumotóxicos, como os metais (chumbo, zinco, crómio, cobre, entre muitos outros) (Caglieri *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2008)

Considerando que o EBC é praticamente livre de solutos interferentes, representa uma matriz biológica ideal para caracterização elementar. Os dados publicados sugerem que vários metais tóxicos e elementos vestigiais são detectados no EBC, levantando a possibilidade da utilização deste fluido para quantificar a dose de substâncias pneumotóxicas no tecido pulmonar em cenários ocupacionais. (Corradi & Mutti, 2005; Gergelova *et al.*, 2008)

Até há pouco tempo, o sangue e a urina eram usados para a monitorização biológica de trabalhadores expostos a metais pesados e constituem as matrizes de referência para a determinação desta exposição. No entanto, fornecem pouca informação acerca dos níveis pulmonares, que não estão necessariamente relacionados com a dose total absorvida, mas poderão ser responsáveis por inflamações e afecções locais no tracto respiratório. (Goldoni *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2005; Corradi & Mutti, 2005; Caglieri *et al.*, 2006; Gergelova *et al.*, 2008)

Assim, o EBC surge como uma nova abordagem à monitorização biológica, permitindo-nos estimar níveis de dose interna de metais inalados e determinar níveis de biomarcadores, como por exemplo a produção de radicais livres, uma vez que há evidências que o stress oxidativo causado por um desequilíbrio na geração de radicais livres nos meios intra- ou extra-celular e as defesas antioxidantes pode ter um papel importante na resposta celular induzida pelos metais e na carcinogénese. (Corradi & Mutti, 2005; Caglieri *et al.*, 2006; Cao & Duan, 2006; Epton *et al.*, 2008)

O crescente interesse no estudo do EBC tem conduzido ao aperfeiçoamento dos aparelhos de recolha. Inicialmente, era usado um instrumento quase rudimentar, constituído por material descartável (bocal, tubo de polipropileno acoplado a um recipiente de recolha em ambiente refrigerado). Hoje já existem pelo menos duas marcas a fabricar um equipamento mais preciso, sendo que a parte mais importante do processo é a refrigeração, que permite a recolha do ar condensado mas também mantém a amostra líquida, aspecto fundamental para algumas proteínas, que podem alterar a sua estrutura quaternária e perder a imunoreactividade se não forem mantidas no mesmo estado. (Goldoni *et al.*, 2004, 2005; Corradi & Mutti, 2005)

A recolha do EBC é um método simples e não invasivo, o que o torna relevante em estudos de exposição ocupacional. (Goldoni *et al.*, 2004; Corradi & Mutti, 2005; Tufvesson & Bjermer, 2005; Caglieri *et al.*, 2006; Cao & Duan, 2006; Corradi *et al.*, 2008)

No entanto, vários aspectos metodológicos, como padronização das recolhas das amostras, validação de técnicas analíticas mas principalmente a validação do valor do bioindicador (por comparação com bioindicadores já estabelecidos), devem ser revistos antes que a análise do EBC possa ser recomendada para determinação de risco ocupacional em testes de rotina no ambiente de trabalho. (Corradi & Mutti, 2005; Broding *et al.*, 2009)

A análise de metais nas amostras de EBC recolhidas deverá ser efectuada por técnicas multielementares, capazes de analisar pequenas quantidades de amostra e de elevada sensibilidade, além de ser necessário ter em conta o volume de amostra para cada análise. As técnicas de espectrometria de massa, como por exemplo a de ICP-MS (do inglês, *Inductively coupled plasma mass spectrometry*), e as técnicas de espectrometria de raios X com incidência rasante (TXRF) permitem determinar com rapidez e simultaneamente um grande número de elementos com elevada sensibilidade analítica, com limite de detecção tipicamente na ordem de $1/10^{12}$ em soluções ou suspensões aquosas sem requerer tratamento prévio da amostra. Por estas razões, estas técnicas são as mais adequadas para a determinação das concentrações elementares em amostras de EBC.

1.6 Análise da qualidade do ar: um complemento

Antes do estudo do ar exalado, já o ar ambiente, exterior e interior, era amostrado na investigação de poluição atmosférica. Uma vez que o ar é uma matriz homogénea e relativamente simples, a preparação de amostras é relativamente fácil e directa, além de que os métodos analíticos também são acessíveis. (Aitio, 2006)

Os poluentes do ar afectam a saúde do Homem a nível global. A grande maioria dos estudos investiga a relação entre os efeitos na saúde (morbilidade e/ou mortalidade) e as concentrações de partículas e gases. As concentrações mássicas de material particulado com diâmetro aerodinâmico inferior a 10 μ m e 2,5 μ m (PM₁₀ e PM_{2,5}, respectivamente) são normalmente medidas no exterior, onde as pessoas estariam mais expostas a poluentes, mas estas medições não têm em conta as fontes (naturais e/ou antropogénicas), uma vez que os resultados obtidos apresentam a soma dos diversos tipos de partículas. (Janssen *et al.*, 2001; Almeida *et al.*, 2007; Molnar *et al.*, 2007; Crist *et al.*, 2008; Fromme *et al.*, 2008)

Em 1999, e devido às evidências demonstradas nos diversos trabalhos realizados no âmbito dos efeitos adversos da poluição do ar, a Comissão da União Europeia (Directiva EU 1999/30/EC) definiu valores limite para as concentrações de PM₁₀ no ar ambiente. Além disso, também é enfatizada a importância das PM_{2,5}, uma vez que os estudos epidemiológicos têm mostrado que a fracção de PM_{2,5} pode ser responsável pelos efeitos adversos das PM₁₀. (Almeida *et al.*, 2007; Crist *et al.*, 2008)

Nos últimos anos, também a qualidade do ar interior no local de trabalho ou nas habitações tem sido focada pelos investigadores. Muitos trabalhos encontraram níveis mais elevados de poluentes no interior do que no exterior e, tendo em conta que as pessoas passam a maior parte do seu tempo em casa ou no local de trabalho, uma boa qualidade do ar interior é extremamente importante. (Lee & Chang 2000; Stranger *et al.*, 2007)

Em geral, existem diversas fontes de poluição nos locais de trabalho industriais mas existem poucos registos do nível de concentração de metais no ar ambiental das indústrias, bem como poucos registos do nível de contaminação dos trabalhadores. Os questionários para fins estatísticos sobre doenças ocupacionais normalmente referem acidentes de trabalho, mas não as doenças ocupacionais desenvolvidas ao longo de exposições prolongadas a condições de trabalho perigosas. Além disso, muitos processos demoram algum tempo a produzir efeitos na saúde e, como resultado, a torna-se difícil detectar a contaminação. (Menezes *et al.*, 2004)

No entanto, as concentrações dos químicos no ar do local de trabalho raramente são estáveis e variam com o tempo, além de que diferem consoante o local. A quantidade de um químico que atinge a região alveolar do tracto respiratório está directamente relacionada com a sua dimensão, com o volume de respiração e, assim, com a carga de trabalho. (Menezes *et al.*, 2004; Aitio, 2006)

Assim, ao estudarmos o EBC em cenário ocupacional, como é o caso deste trabalho, torna-se útil amostrar também o ar no ambiente em que os trabalhadores se movem, em locais representativos.

Isto poderá permitir encontrar algum tipo de relação entre as concentrações encontradas através dos dois meios.

As recolhas de ar são feitas recorrendo a equipamentos relativamente simples, que se baseiam num sistema de bombas e filtros, semelhante ao representado na figura 1.2. De forma muito geral, o ar é bombeado ('aspirado') e passa por filtros de dimensões e porosidade conhecidas, colocados sequencialmente em locais estratégicos, como já foi referido. O caudal e a pressão são controlados pelo operador e dependem do local e da finalidade do estudo. Deverá haver um compromisso entre o tempo de recolha pretendido (amostragem pontual ou prolongada) e o respectivo caudal, tendo sempre em conta o ambiente em questão, de modo a que os filtros não colmatem, impossibilitando uma análise correcta. Usualmente, o sistema de filtros é colocado a uma altura que represente a área de respiração dos indivíduos expostos.

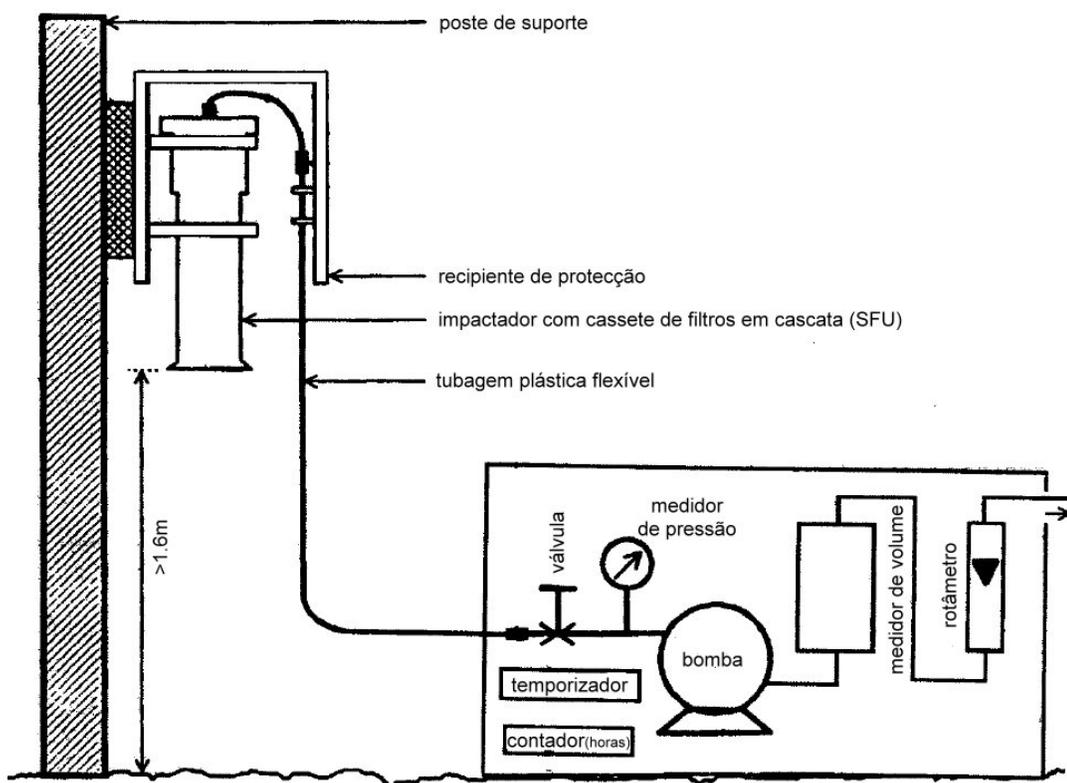


Figura 1.2: Representação esquemática de um amostrador Gent (adaptado de Hopke *et al.*, 1997)

É importante não esquecer que deve existir uma referência de ar interior em instalações que não estejam, à partida, contaminadas com o tipo de poluentes em estudo. Esta componente, em conjunto com valores de referência legislados, permite ter uma noção mais concreta do estado dos locais analisados, em termos de poluentes perigosos para a saúde humana. (Aitio, 2006)

Em termos analíticos, já foi referida a gravimetria como forma de quantificar a massa de material particulado recolhido. No entanto, para a caracterização química desse material, podem ser usadas

diversas técnicas, sendo que as utilizadas neste projecto foram *Particle Induced X-ray Emission* (PIXE) e *Instrumental Neutron Activation Analysis* (INAA).

1.7 Técnicas analíticas

Um dos requisitos básicos para a determinação de uma possível exposição a metais no local de trabalho ou no ambiente é a disponibilidade de procedimentos analíticos fiáveis para determinação de baixas concentrações de metais pesados em amostras biológicas, normalmente em indivíduos que não estão expostos ocupacionalmente. É muito difícil medir com precisão uma exposição ou estabelecer um valor de tolerância biológica no local de trabalho devido à possibilidade de um nível desconhecido destes elementos, por causas fisiológicas ou ambientais. Existem apenas valores limite para elementos e compostos específicos, principalmente espécies organometálicas, como o Al, As, Cd, Co, Cr, Hg, Ni e Pb. Uma das razões para a falta de outros metais pesados nesta lista é a falta de métodos analíticos adequados. Em saúde ocupacional e ambiental, a espectrometria de absorção atómica (AAS, do inglês *Atomic Absorption Spectrometry*) tem sido usada quase exclusivamente. No entanto, a principal limitação destas técnicas prende-se, não com os limites de detecção, mas com o facto de serem técnicas monoelementares. Além disso, existem muitas interferências para alguns elementos, o que obriga a preparações específicas de amostra, para cada elemento.

A Espectrometria de Massa Acoplada a Plasma Indutivo (ICP-MS, do inglês *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*) oferece, assim, a possibilidade de determinar concentrações tão baixas quanto aquelas que são encontradas em pessoas não expostas, além da determinação de uma vasta gama de elementos simultaneamente. (Schramel *et al.*, 1997; Varga *et al.*, 2005)

É, então, essencial determinar as espécies metálicas mais tóxicas e, para análises de especiação, o ICP-MS parece ser uma boa alternativa.

No entanto, uma vez que a técnica utilizada neste trabalho (análise de EBC por ICP-MS) implica uma nova abordagem metodológica, o processo deverá ser validado. Para isso, optou-se por utilizar uma técnica certificada, que se ajustasse às nossas necessidades em termos de quantidade de amostra e elementos em estudo (TXRF).

Ambas serão descritas em seguida, dando mais atenção ao ICP-MS, por ser a técnica na qual se baseia todo o trabalho, como já foi referido.

1.7.1 ICP-MS

O campo da espectrometria atómica analítica tem estado em constante mudança. Os anos 1970 foram a década do ICP-AES (do inglês, *Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry*). Durante este período, foi introduzida instrumentação prática, o método foi melhorado e foram comercializados os primeiros equipamentos. Foi também durante esta década que surgiu o ICP-MS, devido à procura de uma técnica complementar ao ICP-AES, principalmente para análise

multielementar de amostras geológicas. Pretendia-se minimizar as interferências espectrais e atingir limites de detecção menores do que os alcançados pelo ICP-AES. (Montaser, 1998; Apostoli, 2002; Thomas, 2003; Skoog, 2004)

Os primeiros artigos sobre ICP-MS foram publicados nos anos 1980, sendo a técnica de análise de elementos vestigiais mais versátil disponível actualmente. Os avanços tecnológicos das últimas décadas proporcionaram o desenvolvimento da técnica, existindo agora vários equipamentos comerciais que permitem a análise de rotina de concentrações ultra vestigiais inferiores a pg/mL, para quase todos os elementos da Tabela Periódica. Foi esta versatilidade que permitiu a rápida aceitação e subsequente desenvolvimento da técnica. (Montaser, 1998; Taylor, 2001; Apostoli, 2002; Thomas, 2003; Skoog, 2004; Nelms, 2005)

De forma geral, na espectrometria de massa, as amostras são atomizadas, tal como na espectrometria de emissão, mas os átomos gasosos são convertidos em iões positivos e separados com base nas suas razões massa-carga (m/z). (Skoog, 2004) O ICP-MS é, então, a combinação de um ICP, que gera iões monocarregados a partir dos elementos da amostra, com um espectrómetro de massa com quadrupolo. (Apostoli, 2002)

No entanto, para podermos perceber de modo geral o funcionamento e utilidade do equipamento, precisamos de conhecer a sua constituição.

1.7.1.1 O equipamento

Um aparelho de ICP-MS é constituído por cinco componentes principais: sistema de introdução de amostras, ICP (fonte de iões), interface, analisador e detector de iões.

As amostras podem, então, ser introduzidas no estado sólido, líquido ou gasoso. A introdução mais utilizada, e aquela que interessa neste trabalho, é a de amostras líquidas, que apresenta vantagens no que diz respeito à homogeneidade, facilidade de manipulação e disponibilidade de solução padrão para calibração. (Templeton, 1994; Taylor, 2001; Skoog, 2004; Nelms, 2005)

Para estas amostras, o sistema de introdução convencional é formado por uma bomba peristáltica, um nebulizador pneumático e uma câmara de nebulização. A amostra é bombeada até ao nebulizador onde é transformada em aerossol e transportada até ao plasma, onde será ionizada. (Templeton, 1994; Montaser, 1998; Taylor, 2001; Skoog, 2004; Nelms, 2005)

Este plasma é uma forma de matéria cujas propriedades são determinadas por espécies iónicas e é formado na tocha. Os plasmas de argón são os mais utilizados, mas outros gases de transporte como o He também têm sido explorados e são promissores para o ICP-MS, onde espécies poliatómicas com Ar interferem com muitos elementos de interesse biológico. (Templeton, 1994; Thomas, 2004; Nelms, 2005)

Praticamente todas as tochas de ICP consistem em 3 tubos de quartzo concêntricos rodeados por um solenóide (bobina) de indução arrefecida por água (ou ar), alimentada por um gerador de radiofrequência (rf), podendo atingir 2 a 5 kW de potência (com frequência de 27 ou 41 MHz) e que gera um campo magnético oscilante. O tubo intermédio transporta o Ar que assegura que o plasma quente se mantenha límpido na extremidade do tubo injector do capilar central, prevenindo a sua fusão sendo, portanto, utilizado para estabilizar o plasma durante a introdução de amostras. O fluxo de Ar no tubo central transporta a amostra. (Templeton, 1994; Montaser, 1998; Skoog, 2004; Thomas, 2004; Nelms, 2005)

O plasma de Ar induzido pelos equipamentos de ICP comerciais tem uma temperatura cinética de gás entre os 6000 e 10000K (obtida por aceleração dos electrões, que produzem mais iões à medida que colidem com os átomos do gás) e os analitos introduzidos em solução são rapidamente dissolvidos, vaporizados, atomizados e ionizados, processo que está esquematizado na figura 1.3. (Templeton, 1994; Montaser, 1998; Apostoli, 2002; Thomas, 2004; Nelms, 2005)

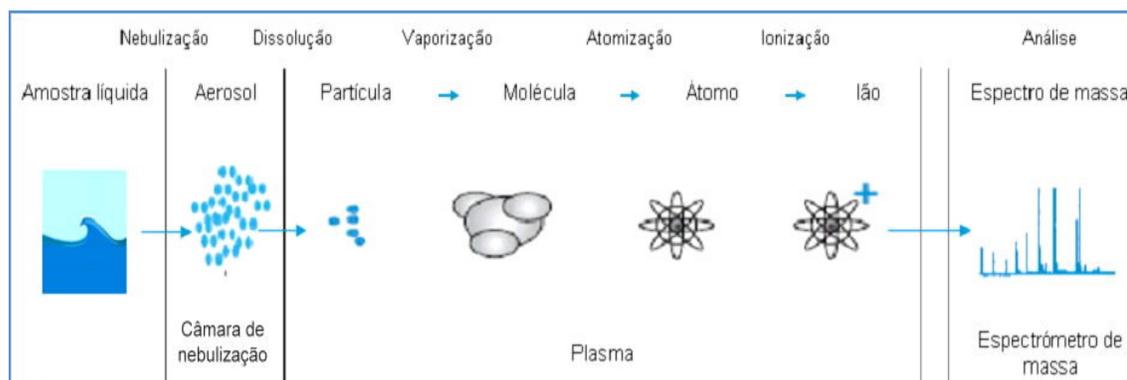


Figura 1.3: Representação esquemática do percurso da amostra no equipamento (adaptado de www.agilent.com/chem/icpms)

Desta forma, a fonte de iões é necessária para produzir partículas carregadas que interajam com os campos eléctricos e magnéticos e sejam desviadas conforme a sua razão m/z , para então poderem ser detectados e analisados. (Montaser, 1998; Skoog, 2004; Nelms, 2005)

A tocha de ICP é acoplada ao analisador (espectrómetro de massa) através de uma interface. Um cone de amostragem (*sampler*) com um orifício de cerca de 1mm é posicionado na zona analítica do plasma. Este abre para a região da interface, que se encontra a uma pressão inferior à atmosférica (1 Torr), provocando uma rápida expansão do gás, o que resulta no seu arrefecimento. Na expansão para a interface, a densidade do plasma diminui e a velocidade iónica aumenta com a distância. Um segundo cone, *skimmer*, é colocado alguns milímetros atrás do orifício de amostragem e amostra o plasma expandido antes que quebre numa onda de choque terminal, na chamada zona de silêncio. O orifício do *skimmer* abre directamente para a câmara de vácuo do espectrómetro de massa, que se encontra a aproximadamente 10^{-6} Torr. Na zona de silêncio, a densidade do plasma e a temperatura cinética do gás diminuem tão rapidamente que a química ião-molécula é minimizada e o grau de

ionização mantém-se igual ao da fonte, obtendo-se, assim, uma amostra representativa dos iões do ICP. (Templeton, 1994; Montaser, 1998; Taylor, 2001; Thomas, 2004; Nelms, 2005)

No que diz respeito às características do analisador, além de existirem vários tipos, o mais usado é o de quadrupolo, que apresenta elevadas velocidades de varrimento, podendo obter-se um espectro completo em menos de 100ms. (Montaser, 1998; Taylor, 2001; Thomas, 2004; Nelms, 2005)

Este instrumento permite discriminação de massas a baixo custo e baixa resolução para massas até várias centenas, além de permitir a separação de espécies que diferem em menos de uma unidade de massa, sendo por isso ideal para análise elementar. Todos os iões com uma razão específica m/z irão reagir da mesma forma em relação ao potencial eléctrico imposto pela geometria quadrupolar. Sob condições eléctricas apropriadas, os iões com uma única razão massa/carga terão uma trajectória estável no percurso total do quadrupolo. (Montaser, 1998; Taylor, 2001; Thomas, 2004; Nelms, 2005)

O detector num instrumento de ICP-MS é grandemente responsável pelas características de elevada sensibilidade e baixo *background* aleatório, pelos quais a técnica é reconhecida. A razão para a elevada sensibilidade é o detector usado virtualmente em todos os equipamentos de ICP-MS modernos: o multiplicador de iões. (Montaser, 1998; Taylor, 2001; Thomas, 2004; Nelms, 2005)

Os iões que saem do espectrómetro de massa colidem com a superfície activa do detector e geram um sinal electrónico mensurável. Esta superfície activa, conhecida como díodo, liberta um electrão cada vez que um ião colide com ela. Como está exemplificado na figura 1.4, o ião que sai do quadrupolo embate no primeiro díodo, que liberta electrões, iniciando o processo de amplificação. (Montaser, 1998; Taylor, 2001; Thomas, 2004; Nelms, 2005)

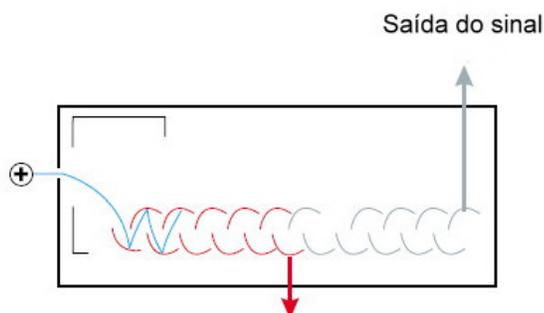


Figura 1.4: Representação esquemática do percurso dos iões através do detector (adaptado de www.perkinelmer.com)

Os electrões libertados do primeiro díodo colidem com o segundo, onde mais electrões são libertados. Esta cascata de electrões continua até ser criado um pulso mensurável, daí o termo ‘multiplicador de electrões’. Através da contagem dos pulsos gerados pelo detector, o sistema contabiliza os iões que atingiram o primeiro díodo. (Montaser, 1998; Taylor, 2001; Thomas, 2004; Nelms, 2005)

1.7.1.2 Interferências

Para se obter uma análise quantitativa mais precisa, as potenciais interferências que poderão afectar a medição de correntes de iões devem ser eliminadas ou minimizadas. Esta tarefa é particularmente difícil quando se realizam determinações multielementares para elementos com valores de m/z desde as massas mais baixas (i.e., Li com $m/z = 7$) até ao extremo das massas mais elevadas (i.e., U com $m/z = 238$). Além disso, quando se tenta uma análise simultânea para várias concentrações de diferentes elementos, desde níveis elevados até níveis vestigiais, o potencial para os efeitos de interferências interelementares aumenta.

As principais interferências no ICP-MS são sobreposições mássicas resultantes de massas isotópicas coincidentes de diferentes elementos (sobreposições isobáricas), óxidos e outras espécies poliatómicas, iões duplamente carregados e vários efeitos de matriz. (Templeton, 1994; Taylor, 2001; Thomas, 2004; Nelms, 2005)

As sobreposições elementares isobáricas surgem quando dois isótopos de elementos diferentes têm a mesma razão m/z na resolução do discriminador de massas. Assim, por exemplo, os iões $^{58}\text{Fe}^+$ e $^{58}\text{Ni}^+$, apesar de diferirem ligeiramente na massa (57,9333 vs 57,9353, respectivamente) não são distinguidos no ICP-MS convencional. Apesar do ^{58}Fe ser um isótopo do Fe pouco abundante (0,31%), as concentrações de Fe geralmente muito mais elevadas que as de Ni em amostras biológicas inibem o uso deste isótopo de Ni. Os sistemas comerciais utilizam um *software* de correcção; neste exemplo, o Fe pode ser medido na massa 56 e aplica-se uma correcção com base nas abundâncias naturais dos isótopos de Fe. No entanto, essas correcções são normalmente insatisfatórias para trabalhos mais precisos, mas pode ser escolhido um isótopo que não apresente interferências atómicas isobáricas, como o ^{62}Ni . (Templeton, 1994; Taylor, 2001; Apostoli, 2002; Thomas, 2004; Nelms, 2005)

As interferências poliatómicas são de resolução mais complexa. Uma vez que a atomização e a ionização são eficientes no plasma, provavelmente ocorrem devido a fenómenos de recombinação. Talvez sejam originados no próprio plasma, durante a expansão para o vácuo, ou na camada de fronteira ao longo do cone de amostragem (*sampler cone*). Os óxidos gerados principalmente a partir de solventes aquosos podem ser diminuídos até certo ponto, por redução da carga de solvente do plasma. Cloretos, nitritos e sulfitos são originados a partir dos ácidos minerais correspondentes usados no processamento das amostras e, claro, da presença destes elementos nas espécies biológicas. O ácido nítrico é geralmente o ácido escolhido para minimizar interferências externas no ICP-MS. Além disso, espécies poliatómicas de Ar também podem ser observadas. (Templeton, 1994; Taylor, 2001; Thomas, 2004; Nelms, 2005)

Estas interferências são mais problemáticas na região da primeira série de transição de elementos. Por exemplo, $^{35}\text{Cl}^{16}\text{O}^+$, $^{40}\text{Ar}^{12}\text{C}^+$ e $^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ interferem com os maiores isótopos de V, Cr e Fe, respectivamente. $^{40}\text{Ar}^{14}\text{NH}^+$ corresponde ao único isótopo de Mn, enquanto óxidos e hidróxidos de Ca interferem com cada um dos 5 isótopos estáveis de Ni. (Templeton, 1994; Taylor, 2001; Apostoli, 2002; Thomas, 2004; Nelms, 2005)

1.7.1.3 Métodos de quantificação

Uma vez que, com o ICP-MS, são possíveis medições isotópicas, a técnica apresenta vários métodos de quantificação, que não estão disponíveis em mais nenhuma técnica a nível vestigial, e que incluem análise quantitativa, procedimentos semiquantitativos, diluição de isótopos, razão isotópica e a utilização de padrão interno. (Thomas, 2004; Nelms, 2005)

Cada um destes procedimentos oferece diferentes graus de precisão, logo é importante perceber os seus pontos fortes e fracos, de forma a podermos decidir qual o mais adequado aos nossos objectivos.

Para este trabalho, apesar de todos os métodos terem sido tidos em conta, apenas se realizou uma análise quantitativa com padrão interno, sendo esse o ponto desenvolvido em seguida.

A análise quantitativa em ICP-MS é a ferramenta mais usada para determinar as concentrações dos analitos em amostras de composição desconhecida. Neste modo de operação, o instrumento é calibrado por medição da intensidade para todos os elementos de interesse em vários padrões de calibração conhecidos que representam a gama de concentrações a estudar. Após terem sido analisados todos os padrões e a solução de branco, o *software* cria uma curva de calibração da intensidade medida (ordenadas) em ordem à concentração (abcissas) para cada elemento dos padrões. Quando os dados de calibração são adquiridos, as amostras são analisadas por interpolação da intensidade dos elementos nas respectivas curvas de calibração, e o *software* pode assim calcular as concentrações dos analitos nas amostras. (Montaser, 1998; Taylor, 2001; Thomas, 2004; Nelms, 2005)

Esta calibração, com a utilização de padrões, é normalmente conhecida como calibração externa e é normalmente usada quando existe muito pouca diferença entre os componentes da matriz nos padrões e nas amostras. No entanto, nem sempre é possível fazer corresponder a matriz das amostras com os padrões, e a calibração externa pode produzir resultados erróneos devido às interferências induzidas pela matriz, que alteram a sensibilidade do analito com base na quantidade de matriz presente nos padrões e nas amostras. Quando isto acontece, o melhor é usar uma combinação de métodos, com abordagens semelhantes. (Montaser, 1998; Taylor, 2001; Thomas, 2004; Nelms, 2005)

Assim, torna-se necessária a utilização de padrões internos, para que os dados obtidos para as concentrações sejam mais precisos, mesmo recorrendo a uma abordagem directa da curva de calibração. Os padrões internos não são mais que elementos adicionados aos padrões de calibração e amostras, com uma concentração fixa e conhecida, normalmente um valor intermédio em relação à gama de concentrações estudadas. Para uma padronização interna satisfatória, vários critérios devem ser tidos em conta, como por exemplo, o(s) elemento(s) não devem existir nas amostras ou, se existirem, devem apresentar concentrações inferiores ao limite de detecção da técnica, além de que devem estar disponíveis numa forma de elevada pureza para que não ocorra contaminação dos analitos. Por outro lado, deve existir pelo menos um elemento cujo isótopo não apresente

interferências, e este não deve interagir com a matriz ou com elementos da amostra. (Taylor, 2001; Apostoli, 2002; Thomas, 2004; Nelms, 2005)

O objectivo do uso de padrões internos é, então, compensar os *drifts* intermédios ou a longo prazo nos componentes das medições do instrumento durante a análise. Através do uso de padrões internos apropriados, poderá ser melhorada a estabilidade das medições, que se reflecte na precisão final da quantificação. (Taylor, 2001; Apostoli, 2002; Thomas, 2004; Nelms, 2005)

Quando a análise multielementar cobre uma vasta gama de massas, vários padrões internos devem ser usados em simultâneo para atingir resultados mais favoráveis. Idealmente, os analitos a determinar com valores baixos de m/z necessitam de um padrão interno com uma baixa razão m/z , assim como o oposto também acontece. A cada padrão interno, adicionado com concentração fixa e conhecida, irá corresponder um grupo de analitos. O *software* então assume que as intensidades de todos os elementos desse grupo são afectadas de forma semelhante pela matriz. Variações nas proporções das intensidades do padrão interno são então usadas para corrigir as concentrações dos analitos nas amostras desconhecidas. (Taylor, 2001; Thomas, 2004; Nelms, 2005)

1.7.1.4 Aplicações

A partir de tudo o que já foi dito, podemos concluir que o ICP-MS é uma ferramenta bastante versátil. As suas aplicações abrangem diversas áreas (desde a área ambiental à saúde, passando pela geoquímica e indústria alimentar) e diferentes tipos de amostras, devido principalmente aos baixos limites de detecção, elevada selectividade e precisão. (Templeton, 1994; Montaser, 1998; Thomas, 2004; Nelms, 2005)

O ICP-MS atraiu a atenção dos investigadores envolvidos na análise de matrizes biológicas, uma vez que era ideal para medir a absorção de um ou vários elementos em grupos da população ou em indivíduos expostos no local de trabalho, permitindo correlacionar dados biológicos com efeitos ou doenças específicas em estudos epidemiológicos. Esta técnica também pode interessar para cenários clínicos ou forenses para demonstrar envenenamento agudo por um elemento desconhecido. (Apostoli, 2002; Nelms, 2005)

Os tipos de amostras biológicas analisadas por ICP-MS têm-se diversificado e agora incluem sangue total, plasma, soro, urina, fluidos intersticiais, órgãos internos, dentes, ossos, cabelo, unhas, proteínas ligadas a metais, bem como diversos tipos de células humanas e animais. (Montaser, 1998; Thomas, 2004; Nelms, 2005) Apesar de estes serem os meios mais estudados, o EBC também já começou a dar os primeiros passos juntamente com o ICP-MS.

A determinação de elementos vestigiais nestas matrizes é crucial uma vez que têm um papel importante tanto na função biológica normal como na toxicidade. O ICP-MS tornou-se uma importante técnica para a medição de concentrações de metais essenciais e tóxicos a níveis vestigiais usando pequenos volumes de amostra. (Montaser, 1998; Apostoli, 2002; Thomas, 2004; Nelms, 2005)

Este aspecto pode não parecer muito relevante mas quando estamos a falar de amostras biológicas, muitas vezes o que conseguimos recolher apenas é suficiente para uma análise, mesmo recorrendo a diluições, e grande parte das técnicas de análise ultra-vestigial geralmente utilizadas requerem um volume de amostra mais elevado.

A determinação de elementos vestigiais com um elevado nível de precisão tem-se tornado um aspecto importante em muitos laboratórios clínicos, industriais e governamentais. O estado de pacientes relativamente aos níveis de elementos vestigiais é muitas vezes de importância clínica e o ICP-MS, ao permitir a análise multielementar de amostras biológicas, pode fornecer uma rápida quantificação, substituindo assim procedimentos analíticos mais demorados e monoelementares de técnicas como a espectrometria de absorção atómica. (Montaser, 1998; Thomas, 2004; Nelms, 2005)

A monitorização biológica de trabalhadores expostos a níveis elevados de certos elementos também é muito importante em ambientes industriais, no âmbito da saúde ocupacional. No entanto, em muitos casos, os limites de detecção das técnicas de espectrometria de absorção atómica existentes não são suficientemente sensíveis para níveis ambientais de metais na urina ou noutros materiais biológicos, fazendo com o que ICP-MS seja a técnica de eleição.

1.7.2 TXRF

As técnicas de espectrometria de raios X têm sido vastamente utilizadas na análise de amostras biológicas, em grande parte devido ao seu carácter multielementar.

No entanto, as técnicas clássicas de espectrometria de raios X, como a fluorescência de raios X dispersiva em energia (EDXRF), apesar de apresentarem características vantajosas como a multielementaridade, rapidez e baixo custo por análise não possuem limites de sensibilidade adequados à análise de elementos vestigiais e são afectadas por efeitos de matriz, conduzindo a erros sistemáticos. Assim, é necessário garantir que o sinal de fluorescência obtido dos elementos analisados se distinga inequivocamente do fundo do espectro de raios X, sendo a redução do fundo nos espectros o principal objectivo de qualquer melhoramento neste tipo de técnicas. (Barreiros, 2003; Wobrauschek, 2007; Szoboszlai *et al.*, 2009)

A modificação da geometria dos espectrómetros, sugerida em 1971 pelo grupo japonês de Yoneda e Horiuchi e depois desenvolvida desde 1974 por Wobrauschek e Aiginger, Schwenke e Knoth e Klockenkämper, permitiu melhorar os limites de detecção em cerca de 3 a 4 ordens de grandeza e, simultaneamente, os efeitos de matriz foram praticamente eliminados. (Barreiros, 2003; Wobrauschek, 2007; Szoboszlai *et al.*, 2009) Estava então dado o passo decisivo para o aparecimento da espectrometria de fluorescência de raios X de reflexão total (TXRF).

Para a aplicação de TXRF em análise de elementos vestigiais, são exploradas características da reflexão total dos raios X: a elevada reflectividade em superfícies planas e a reduzida profundidade de penetração da radiação primária. Isto permite a aplicação de TXRF para análise de elementos

vestigiais e ultra-vestigiais, bem como análise de superfícies. Para análises de elementos químicos vestigiais, a reflexão total num suporte opticamente plano e muito polido é caracterizada pela elevada reflectividade, que leva a uma drástica redução do *background* espectral. (Prange & Schwenke, 1992; Wobrauschek, 2007; Szoboszlai *et al.*, 2009) É esta reflexão total do feixe de radiação X primária que marca a diferença para as comuns técnicas de EDXRF.

O ângulo de incidência do feixe da radiação excitadora é, no TXRF, inferior ao ângulo crítico a que ocorre a reflexão total (em EDXRF é aproximadamente 45°). Os ângulos rasantes formados pelos feixes (de incidência e reflexão) permitem que o detector esteja colocado muito perto da superfície do suporte de amostras e perpendicularmente a este, como se pode observar na figura 1.5. (Prange & Schwenke, 1992; Barreiros, 2003; Wobrauschek, 2007; Szoboszlai *et al.*, 2009)

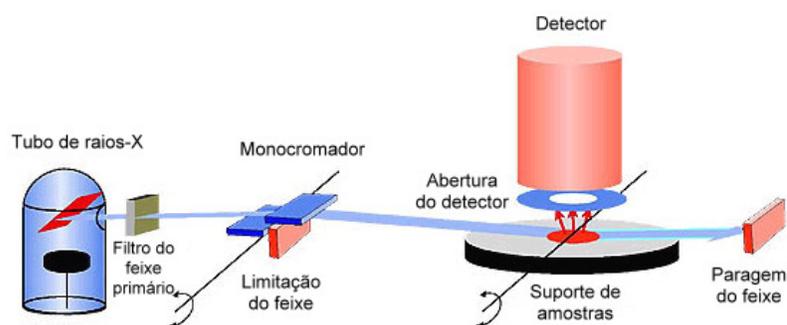


Figura 1.5: Representação esquemática do percurso do feixe de raios-X, e das várias etapas, na geometria de reflexão total (adaptado de <http://www.ufz.de/>)

A análise por TXRF é, desta forma, uma poderosa ferramenta analítica no que diz respeito à gama de detecção elementar, simplicidade de quantificação e limites de detecção. Isto inclui a capacidade de detectar quase todos os elementos da tabela periódica, do boro ao urânio. Mesmo os elementos com o maior número atômico (z) dos actínidos podem ser detectados. (Prange & Schwenke, 1992; Barreiros, 2003; Wobrauschek, 2007; Szoboszlai *et al.*, 2009)

Geralmente esta técnica é aplicada na análise directa de amostras líquidas, soluções ou suspensões, mas também permite a quantificação elementar em sólidos, desde que estes sejam previamente preparados (normalmente por digestão ácida). É também uma técnica muito usada em microanálise uma vez que requer quantidades muito pequenas de amostras. As suas aplicações abrangem áreas como as artes, ambiente, medicina e investigação fundamental. (Barreiros, 2003; Wobrauschek, 2007; Szoboszlai *et al.*, 2009)

2 | **Objetivos**

A saúde ocupacional tem alargado o seu espectro de acção ao longo das últimas décadas. Com a evolução tecnológica tem sido possível determinar factores de risco, predisposições individuais e exposições a químicos potencialmente perigosos cada vez mais cedo, de forma a minimizar ou mesmo evitar consequências mais graves para a saúde humana. Neste campo, a toxicologia tem tido um papel fundamental e este trabalho insere-se nesta importante área da saúde ocupacional, cada vez mais direccionada para a prevenção.

Assim, o principal objectivo a desenvolver neste trabalho foi o de avaliar a qualidade do ar exalado como bioindicador de exposição a poeiras e gases de chumbo no ambiente de trabalho.

Pretendeu-se então conjugar a validação de um bioindicador de exposição e respectiva metodologia com a caracterização ambiental.

Desta forma, o estudo de 25 trabalhadores de indústrias seleccionadas visou:

- caracterizar o ambiente industrial, recorrendo a amostradores pessoais e fixos, cujas concentrações elementares foram determinadas por INAA e PIXE;
- determinar concentrações elementares no EBC, nomeadamente de chumbo, por ICP-MS;
- correlacionar as concentrações de chumbo no EBC com os níveis sanguíneos, a função respiratória e hábitos de vida, bem como com a concentração de Pb no ambiente de trabalho;
- validar os procedimentos de recolha e análise das amostras, através do controlo do procedimento de recolha e controlo de qualidade da análise elementar quantitativa.

Deste modo, será possível avaliar a potencialidade do EBC como bioindicador não invasivo de exposição ocupacional a poluentes (metais pesados, neste caso) e validar o seu método de amostragem e análise.

3 | Metodologias

3.1 Trabalho preliminar

3.1.1 Selecção das indústrias

Durante o ano de 2008 foram seleccionadas indústrias de acordo com os objectivos do projecto em curso: número de trabalhadores por grupo de exposição ocupacional, metais manipulados, turnos dos trabalhadores, localização das indústrias e interesse dos trabalhadores no projecto. Foram enviadas cartas para várias indústrias e realizaram-se reuniões em cinco companhias na área de Lisboa.

Para cada indústria foi analisado:

- o processo industrial para identificar a localização dos trabalhadores e o tipo de exposição (agentes, tempo de exposição, etc);
- as características dos trabalhadores (idade, antiguidade, hábitos tabágicos);
- os relatórios clínicos dos trabalhadores;

Este trabalho abarcou as duas fábricas seleccionadas (processos fabris baseados na manipulação de metais pesados), embora uma delas, devido ao elevado número de trabalhadores, não tenha sido estudada na totalidade.

3.1.2 Grupos de estudo

Durante o projecto, foram estabelecidos dois grupos principais – um grupo de indivíduos expostos a metais na sua actividade laboral (um grupo em cada indústria seleccionada) e um grupo controlo de indivíduos não expostos a metais.

Os trabalhadores que constituem o grupo de indivíduos expostos foram recrutados numa indústria de processamento de metais pesados. Treze trabalhadores foram estudados durante o período de trabalho de 5 dias. Na tabela 3.1 encontram-se os dados (demográficos e clínicos) relativos aos trabalhadores recrutados nas indústrias seleccionadas, bem como as informações do grupo controlo.

Tabela 3.1: Informações demográficas e clínicas dos indivíduos expostos e não expostos, representadas por médias, ou percentagens, e desvio padrão. FEV1 representa a percentagem média do Volume Expiratório Forçado (*Forced Expiratory Volume*) no primeiro segundo; as queixas incluem tosse ocasional, expectoração e pieira.

	Fábrica 1	Fábrica 2	Controlo
n	13	12	22
Idade (anos)	42 ± 7	47 ± 12	37 ± 8
Antiguidade (anos)	13 ± 7	20 ± 13	—
Hábitos tabágicos (%)	36	33	32
Pb no sangue total (µg/dL)	38 ± 18	20 ± 8	—
FEV1 (%)	104 ± 16	—	—
Queixas (%)	50	—	—

No que diz respeito ao grupo controlo, este é constituído por 22 voluntários saudáveis que trabalham em escritórios (no Instituto Tecnológico e Nuclear, por questões de conveniência) e, como tal, não estão expostos a Pb ou outros metais (fumos ou partículas) na sua actividade ocupacional.

3.2 Métodos de estudo preliminar para definição da estratégia de recolha

O trabalho preliminar realizado prende-se com a decisão de qual a recolha do EBC mais representativa (início/fim do 1º turno após as folgas semanais ou início/fim do último turno antes das folgas semanais).

A recolha de EBC foi feita em 4 ocasiões (antes e depois dos turnos) para estimar as variações de concentração de Pb e de outros elementos ao longo do tempo:

a – primeiro dia da semana de trabalho – antes do turno

b – primeiro dia da semana de trabalho – depois do turno

c – último dia da semana de trabalho – antes do turno

d – último dia da semana de trabalho – depois do turno

Em indústrias com um elevado número de trabalhadores este sistema de recolhas exige uma logística que nem sempre é possível, além de que existia a dúvida acerca de qual a recolha mais representativa. Assim, os trabalhadores da segunda fábrica foram analisados apenas em a e em d, por apresentarem valores extremos, quer temporais, quer de concentração elementar. No entanto, os trabalhadores estudados inicialmente também foram incluídos no estudo geral.

3.3 Definição dos procedimentos de amostragem do EBC

3.3.1 Recolha e manuseamento do EBC

O EBC foi recolhido com o equipamento EcoScreen (Eric Jaeger, GmbH, Alemanha), um sistema eléctrico refrigerado, com um braço extensível que permite ao trabalhador estar sentado numa posição relaxada, respirando sem esforço, e exalando de modo controlado para a câmara arrefecida. Apresenta também uma parte descartável que consiste no bocal, conectado a duas válvulas e um tubo de recolha, no final, como se pode observar na figura 3.1.



Figura 3.1: Equipamento EcoScreen completo, durante uma recolha de EBC (*esquerda*); Pormenor do sistema de válvulas unidireccionais (*direita*); a) sistema de válvulas unidireccionais; b) câmara de recolha arrefecida; c) sistema de refrigeração; d) bocal descartável; e) válvula unidireccional de inspiração; f) válvula unidireccional de expiração; g) tubo de recolha.

Este aparelho consegue manter o fluido condensado a temperatura suficientemente baixa, durante o período de recolha. Embora seja um equipamento transportável, a optimização das suas dimensões traria vastos benefícios à sua utilização. (Goldoni *et al.*, 2005; Horvath *et al.*, 2005; Caglieri *et al.*, 2006; Corradi *et al.*, 2008)

Cerca de 5 minutos depois de ligar o sistema e da montagem dos acessórios amovíveis, o sujeito é instruído a lavar a cavidade oral com água. Em seguida, pode começar a respirar normalmente através da boca durante 16 minutos (usando uma mola para o nariz). Uma vez que este procedimento pode causar um certo desconforto (boca seca), apesar de simples e não invasivo, os sujeitos são aconselhados a descansar quando acharem necessário, retirar o excesso de saliva e beber água. No fim do período de recolha, o volume de amostra é medido, separado em aliquotas de 500µL em tubos Eppendorf™ e armazenadas numa arca ultracongeladora (U410 Premium, New Brunswick Scientific) a -80°C até à análise elementar, realizada, como já foi referido, por ICP-MS (equipamento Perkin Elmer ELAN-DRCe). (Caglieri *et al.*, 2006)

No entanto, ao longo do tempo, o procedimento de recolha das amostras foi sofrendo ajustes. No fim de Julho 2009, os quatro tubos Eppendorf™ onde se colocavam as alíquotas das amostras foram substituídos por tubos de polipropileno (de 5mL). Na chegada ao instituto, as amostras foram acidificadas com 3% de ácido nítrico (HNO₃ MERCK) e colocadas 10 minutos num banho de ultrassons, com a finalidade de dissolver o material particulado e homogeneizar as amostras.

A heterogeneidade do EBC devido a partículas suspensas também foi determinada. Foram filtradas ou acidificadas alíquotas de amostras usando um filtro de seringa de 0,45µm ou acidificadas com HNO₃ 0.05M 65% *Suprapur* MERCK, e posteriormente comparadas com alíquotas não tratadas. As amostras foram analisadas por TXRF e os resultados obtidos encontram-se descritos nas tabelas 3.2 e 3.3.

Tabela 3.2: Concentrações de Pb, obtidas por TXRF, em alíquotas de uma amostra de EBC, não filtradas e filtradas. Os valores são as concentrações obtidas em cada replicado, as respectivas médias e o desvio padrão.

Concentração de Pb (ng/mL)								
Aliquota	Amostras não filtradas				Amostras filtradas			
	Replicados			Média ± SD	Replicados			Média ± SD
	1	2	3		1	2	3	
a	197	79	179	152 ± 64	3.4	2.5	4.4	3.4 ± 1
b	65	66	1745	625 ± 970	3.4	5.9	4.4	4.6 ± 1.3
c	43	45	70	53 ± 15	2.1	3.8	2.9	2.9 ± 0.9

Tabela 3.3: Concentrações elementares, obtidas por TXRF, em alíquotas de uma amostra de EBC, não filtradas e filtradas. Os valores são médias, desvios padrão e desvios padrão relativos, baseados em 9 alíquotas.

	Não filtradas (N=9)		Filtradas (N=9)	
	Média ± SD	SD(%)	Média ± SD	SD(%)
Cr	11.7 ± 18.1	155	2.6 ± 0.7	27
Mn	4.3 ± 6.7	157	1.7 ± 0.6	35
Cu	1.9 ± 2.9	151	2.8 ± 1.9	67
Zn	66.2 ± 66.8	101	39.3 ± 41.3	105
Pb	274.6 ± 553.9	202	3.6 ± 1.2	32

3.3.2 Tempo de recolha

Quanto mais alargado for o tempo de recolha, maior será o volume de EBC obtido. No entanto, e em termos práticos, é necessário otimizar este tempo, para que se atinja um compromisso entre o volume necessário para análises posteriores e o tempo útil que os trabalhadores voluntários poderão dispendir.

Assim, em termos de publicações, encontraram-se referências a tempos de recolha entre os 5-20 minutos, de acordo com o tipo de estudo. No caso presente, verificou-se que, em condições normais de respiração, um tempo de recolha de 16 minutos permite obter um volume médio de 2mL de EBC (volume variável consoante o indivíduo e a forma como segue as indicações) sem se tornar demasiado cansativo. Era este volume que se distribuía por vários tubos EppendorfTM, sendo usado 1 tubo por cada análise, de forma a maximizar a amostra.

3.3.3 Influência do ambiente exterior

Para determinar a influência do ambiente externo na recolha das amostras, foram recolhidas 4 amostras, duas num ambiente normal e outras duas num ambiente controlado (sala limpa), cujos resultados estão expressos na tabela 3.4. Este teste permitiu verificar se o local onde são recolhidas as amostras (ambiente próximo do EcoScreen) é factor de relevo para este estudo, uma vez que as contaminações são um importante problema na análise de elementos ultra-vestigiais.

Tabela 3.4: Concentrações de Pb ($\mu\text{g/L}$) obtidas na determinação da influência do ambiente externo na recolha de EBC em dois ambientes distintos: não controlado (sala comum) e controlado (laboratório limpo, classe C ISO 7), com dois dos indivíduos anteriormente estudados como controlos. Os valores apresentados são médias e desvio-padrão.

Concentrações de Pb ($\mu\text{g/L}$)		
Indivíduo	Ambiente não controlado	Ambiente controlado
1	0.789 \pm 0.115	< 0.966
2	1.424 \pm 0.279	1.389 \pm 0.245

As amostras foram então analisadas por TXRF e os resultados mostraram que não existem diferenças significativas entre as concentrações dos dois ambientes, sugerindo que quaisquer contaminações serão provenientes de outra fonte.

3.3.4 Controlo das condições de recolha: temperatura

Uma vez que se verificou a formação de gelo no interior do tubo refrigerado (onde se coloca o tubo de recolha de EBC), efectuaram-se alguns testes de forma a minimizar estes efeitos, servindo também para confirmar se a temperatura indicada pelos fornecedores se mantém. As variações de temperatura, assim como as observações ao longo do teste estão descritas na tabela 3.5.

Assim, com o aparelho no laboratório limpo, foram efectuadas medições de temperatura, com um termopar, ao longo de um dia de trabalho, mantendo-se o tubo tapado com a protecção. A meio do dia, o aparelho foi desligado e limpo, de forma a atingir a temperatura ambiente. Cerca de duas horas depois, ligou-se novamente o aparelho e efectuou-se uma recolha, para testar a influência da temperatura do ar exalado, com medições intermédias. A temperatura ambiente no laboratório durante os testes registou poucas diferenças (entre 18 – 19.7°C).

Tabela 3.5: Controlo das condições de recolha com EcoScreen: controlo de temperatura.

Temperatura (°C)			
Tempo *	EcoScreen	Ambiente	Observações
0:00	17.6	18	Sistema ligado
0:15	-29.5		
0:45	-32.1		
1:15	-31.7	19	Início da formação de gelo
1:45	-31.1		
2:15	-31.8	19	
2:45	-31.8	18.9	Fundo do tubo
3:15	-31.9	19.2	Sistema desligado
5:45	16.3		Sistema ligado
5:55	-30.1		
5:57			Recolha de amostra (início)
6:05	-28.9		Leitura intermédia
6:17	-30.7		Recolha de amostra (fim)
6:45	-31.9		
7:15	-31.3		Formação dos primeiros cristais de gelo
7:20	-31.3	19,7	Sistema desligado
7:25	-7.9		
7:30	-2.8		
7:35	0.6		
7:40	3.3		
7:45	5.5		
7:50	7.1		
7:55	8.1		
8:00	8.9		Fim do teste

(* tempo desde o início do teste)

Com estas medidas, podemos concluir que a formação de gelo não depende da recolha da amostra mas apenas da condensação da humidade do ar. Quando o equipamento está ligado, a temperatura média é de -31°C , alcançado nos primeiros 10 minutos. Por outro lado, quando o equipamento é desligado, a temperatura atinge os -10°C nos primeiros 5 minutos. Assim, a hipótese de que a temperatura iria aumentar durante a recolha da amostra foi recusada, uma vez que o EcoScreen demora cerca de 1 minuto a atingir novamente os -31°C , após recolha.

3.4 Métodos analíticos elementares

3.4.1 ICP-MS

O equipamento de ICP-MS (ELAN DRC-e, PerkinElmer SCIEX, EUA), apresentado na figura 3.2, foi instalado entre Junho/Julho de 2008 através do Programa de Re-equipamento Científico. Desde então, tem sido realizado trabalho preliminar para otimizar a metodologia analítica para volumes muito pequenos de amostras e baixos níveis de concentração. As alíquotas de EBC disponíveis para análise elementar têm, em média, 1mL.

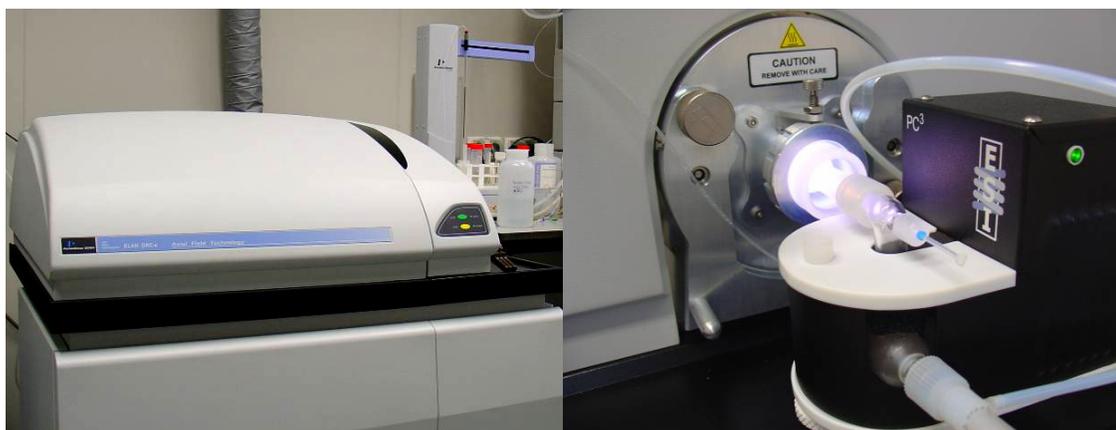


Figura 3.2: Equipamento de ICP-MS (ELAN DRC-e, PerkinElmer) (esquerda); Pormenor do nebulizador e da câmara de arrefecimento com sistema Peltier (direita).

Tendo em conta a limitação do volume de amostra, foi realizado trabalho preliminar usando condições de trabalho *standard* (ver abaixo) para avaliar os limites de detecção dos elementos de interesse e otimizar as condições para a determinação de baixos níveis de concentrações, tal como o controlo de contaminantes nos recipientes das amostras, na água ou nos químicos.

O equipamento foi operado a 1100W (RF *power*) e foi usado árgon como gás do plasma a 15L/min. O equipamento apresenta um nebulizador de fluxo cruzado (Concentric Teflon® Nebulizer - PFA-ST). O gás de nebulização (Ar) apresentava um fluxo de 0.9L/min. Foram usados cones de níquel com 1.5mm de diâmetro interno.

Foi usada uma bomba peristáltica de quatro canais para introdução da amostra. Os dados foram recolhidos, processados e analisados com o *software* ELAN 6100.

Inicialmente foi realizada uma análise semi-quantitativa para avaliar a composição elementar da amostra, através de um varrimento da toda a gama de massas ($m/z = 6 - 240$), que permitiu seleccionar os elementos de interesse. Em seguida procedeu-se à análise quantitativa, que se baseou numa calibração externa com padrões multielementares e adição de padrão interno.

No modo semi-quantitativo foram realizados 60 *sweeps*/1 leitura e 5 replicados, enquanto que no modo quantitativo foram utilizados 20 *sweeps*/3 leituras e 5 replicados. O *flush* da amostra era normalmente de 35 segundos e a lavagem entre amostras era de 45 segundos, no mínimo.

A solução de branco foi constituída por água (18 M Ω .cm) contendo HNO₃ *Suprapur* (MERCK) a 1% v/v. As contagens dos brancos foram subtraídas em ambas as abordagens (quantitativa e semi-quantitativa).

As condições de operação foram optimizadas diariamente, usando uma solução aquosa contendo 10 μ g/L de Mg, Ba, Ce, Cu, Cd, Rh, In e Pb e monitorizando as intensidades dos isótopos ²⁴Mg, ¹⁰³Rh, ¹¹⁴In, ²⁰⁸Pb, ¹³⁸Ba e ¹⁴⁰Ce, bem como as intensidades das massas 69, 156 e 220 (correspondentes às espécies ¹³⁸Ba²⁺, ¹⁴⁰Ce¹⁶O⁺ e *background*, respectivamente).

As condições escolhidas reflectem um compromisso entre o sinal mais elevado do ião ¹⁰³Rh e a percentagem de iões duplamente carregados (obtido pela razão das intensidades Ba²⁺/Ba⁺; sempre menor ou igual a 3%) e de óxidos (obtido pelo *ratio* das intensidades CeO⁺/Ce⁺, sempre menor ou igual a 3%), precisão melhor que 2% e *background* menor que 30cps.

Para validação dos resultados obtidos por ICP-MS, avaliou-se diariamente um Padrão Certificado de Referência NIST 1643e. Alguns elementos foram também determinados por TXRF, para validação externa de resultados.

3.4.2 TXRF

A técnica de TXRF utiliza o equipamento ATOMIKA EXTRA II, um espectrómetro comercial instalado no Laboratório de Análises Químicas (LAQ) do Laboratório Nacional de Energia e Geologia (LNEG), que utiliza dois tubos de raios-x, ânodos de Mo e W operando a 50kV e 38mA de corrente máxima, um detector de Si-Li com 80mm de área activa e uma janela de Be com 25,4 μ m de espessura, tendo uma resolução de 168eV a 5,9keV.

As análises espectrais foram realizadas através do programa AXIL (Van Espen *et al.*, 1986), com um algoritmo (*fit*) não linear de mínimos quadrados. Os cálculos quantitativos foram efectuados através do método de padrão interno usando o pacote de *software* QXAS (Van Espen *et al.*, 1986).

As amostras de EBC foram dopadas com uma solução padrão de Gálio. A concentração do padrão nas amostras foi de 10µg/L. As amostras foram homogeneizadas por agitação leve.

Foram preparados brancos para controlar contaminações e a preparação da amostra, seguindo o mesmo procedimento utilizado para as amostras e usando água ultrapura Milli-Q® dopada com a mesma solução de Ga. Cinco microlitros das amostras de EBC foram pipetados para suportes de quartzo para as medidas por TXRF. Para cada amostra foram analisados pelo menos dois alvos.

Para fornecer medidas fiáveis para elementos vestigiais em amostras biológicas, foram implementados esquemas de garantia de qualidade. A determinação dos limites de detecção e quantificação, bem como a identificação de fontes de incertezas devidas à preparação de amostra, calibração, *fit* do espectro, entre outros, que contribuem significativamente para a incerteza final, foram estabelecidos de acordo com os requisitos da NP EN ISO/IEC 17025. O programa de avaliação de controlo da qualidade do TXRF mostra que os métodos são rastreáveis para uma vasta gama de elementos e para uma vasta gama de matrizes de amostras, permitindo a modelação matemática de metodologias de medições e de controlo estatístico.

3.5 Material e reagentes

Foram usadas as soluções *Smart Tune Solution – STD & DRC-e* (Ba, Be, Ce, In, Pb, Mg, Rh, U, todos <0.1%) e *ELAN 6100 DRC Setup/Stability/MassCalibration solution* (Ba, Be, Ca, Ce, In, Fe, Pb, Mg, K, Rh, Na, U, todos <0.1%), ambas da PerkinElmer, para os procedimentos de optimização do ICP-MS.

Para os padrões de calibração, partiu-se de uma solução multielementar Fluka 70008 (Li, Be, Na, Mg, Al, K, Ca, V, Cr, Mn, Fe, Ni, Co, Cu, Zn, Ga, Rb, Sr, Mo, Ag, Cd, In, Cs, Ba, Tl, Pb, Bi) e foram preparadas diversas diluições para abranger a gama de concentrações necessária (0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100 µg/L), utilizando água ultrapura Milli-Q®.

A fim de se poder estudar também o Antimónio (Sb), e uma vez que não está presente na solução multielementar, foram preparados padrões monoelementares de Sb (padrão certificado MERCK 1002mg/L, Anexo I).

Como padrão interno, foi escolhido o Itrio (Yttrium AAS Standard Solution Specpure 1000mg/L) e o tungsténio (W, MERCK 1001mg/L), de forma a abranger a gama de massas a estudar. No entanto, com o W obtiveram-se flutuações nos elementos que lhe estavam associados, tendo-se optado por utilizar apenas o Y.

As soluções intermédias dos padrões internos foram preparadas em tubos Eppendorf™ com diferentes concentrações (100, 10 e 1mg/L).

Estabeleceu-se que a concentração do padrão interno deveria estar a meio da gama de valores dos padrões de calibração e, neste caso, a concentração final de Y nos padrões e nas amostras foi de 10µg/L (aproximadamente, mas semelhante em todos).

Uma vez que a preparação das soluções foi feita por pesagem, ou seja, era medido o volume necessário (previamente determinado) e este era pesado numa balança analítica (Sartorius Research), as concentrações de todas as soluções preparadas (e dos elementos que as constituem) foram calculadas com base nas massas e, quando necessário, procedeu-se à correcção com as densidades.

3.5.1 Controlo de contaminações em análise de elementos ultra-vestigiais

Tendo em conta a gama de concentrações estudada (inferior a µg/L), todo o trabalho apresenta dificuldades acrescidas, no que diz respeito ao controlo de contaminações e à descontaminação do material utilizado. Na análise de elementos ultra vestigiais, todos os passos do procedimento de amostragem, preparação e análise das amostras devem ser rigorosamente controlados, caso contrário os resultados irão reflectir os elementos presentes na amostra mas também os contaminantes, não havendo, à partida, forma de os distinguir.

Assim, todo o manuseamento e preparação das amostras deve ser efectuado em ambiente limpo. No entanto, o processo de colheita da amostra, devido a diversos factores (disponibilidade, local e logística), é o único que normalmente não permite cumprir os requisitos de ambiente limpo. A fim de minimizar qualquer tipo de exposição indesejada, após a recolha, as amostras são manipuladas em laboratório limpo (classe C ISO 7), em câmara de fluxo laminar.

No que diz respeito à água utilizada na preparação de soluções e nas lavagens, esta é sempre ultra-pura, purificada num sistema Milli-Q® da Millipore™, permitindo a obtenção de água com uma resistividade superior a 18MΩ.cm, o que indica a presença de poucos iões em solução.

A utilização de quaisquer reagentes químicos requer um elevado grau de pureza. Para isso, foi utilizado ácido nítrico (HNO₃) *Suprapur* da marca MERCK (65%), bem como HNO₃ TraceSelect da marca Fluka (>69%). No que diz respeito às soluções monoelementares (utilizadas como padrão interno), todas eram comercialmente designadas por Specpure®, da marca Alfa Aesar.

Além dos reagentes, o material de laboratório utilizado é também de grande importância no controlo de contaminações. Já em testes iniciais em que se prepararam soluções padrão em material de vidro (balões volumétricos previamente descontaminados com uma solução de HNO₃ *Suprapur*) nos apercebemos de que o vidro era uma fonte de contaminação, no que diz respeito a alguns dos elementos a analisar, para a gama de concentrações de interesse.

A preparação dos padrões passou a ser feita em frascos e tubos de plástico, previamente lavados com ácido nítrico Pro Analysis (HNO₃ P.A. MERCK) diluído (20%) durante uma semana; após esse

tempo, os recipientes foram cheios com HNO₃ *Suprapur* (MERCK) e assim permaneceram alguns dias. Em seguida foram lavados com água ultrapura Milli-Q® (>18MΩ.cm) e deixados a secar na câmara de fluxo laminar.

No entanto, durante as primeiras análises, constatou-se que mesmo o material de plástico, depois de lavado, ainda apresentava vestígios dos elementos a analisar, o que se torna um problema importante nas gamas mais baixas de valores de concentração.

Assim, começou-se a utilizar material de Teflon®, previamente descontaminado em HNO₃ a quente. O material é colocado numa tina de vidro imerso numa solução de água 18MΩ.cm e HNO₃ P.A. (50%) e levado à ebulição durante 2 horas. Após três lavagens com ácido P.A., a quarta lavagem é feita do mesmo modo mas com uma solução de HNO₃ *Suprapur*, preparada no momento. Enquanto a solução utilizada na primeira lavagem nunca é reutilizada, as 3 restantes soluções são normalmente recuperadas para futuras lavagens. A solução da segunda lavagem passa então a ser utilizada na primeira lavagem seguinte e assim sucessivamente. No fim das quatro lavagens, os frascos são lavados com água ultrapura e deixados a secar em câmara de fluxo laminar, no laboratório limpo.

Em termos de armazenagem, o material é usualmente guardado em sacos de plástico limpos e fechados.

Os materiais plásticos de Teflon® (politetrafluoretileno) e outros polímeros (policarbonato, polipropileno) são então os mais indicados para estudos a este nível, como substitutos do material convencional. Desta forma, as soluções padrão e os brancos foram preparados em frascos de Teflon®, previamente descontaminado.

Como já foi referido (ver 3.3.1), as amostras inicialmente eram colocadas em tubos Eppendorf™ até à sua preparação para análise. No entanto, este procedimento sofreu alterações quando se efectuaram testes a vários tubos (escolhidos aleatoriamente, após lavagem) e foram verificados valores muito elevados de alguns elementos.

Tabela 3.6: Análise de tubos Eppendorf™ e de polipropileno, contendo apenas água ultrapura Milli-Q® com 1% HNO₃ 65% *Suprapur* (MERCK), por ICP-MS. Os valores apresentados são contagens, obtidas directamente pelo *software* do equipamento.

		Contagens (intensidade)							
Branco		Tubos Eppendorf™				Tubos polipropileno			
		1	2	3	4	1	2	3	4
Pb	3 284	6 088	33 149	4 540	2 964	4 358	2 480	2 434	2 473

Assim, as amostras começaram a ser armazenadas em tubos de polipropileno. De referir que os tubos Eppendorf™, antes de serem utilizados, foram imersos numa solução de água ultra pura e HNO₃ (50%), durante cerca de uma semana e após esse tempo foram lavados com água ultra pura, individualmente, e secos em câmara de fluxo laminar.

Também os tubos de polipropileno, cuja função inicial estava relacionada com a recolha de sangue, foram lavados antes da sua utilização. Para isso, os tubos foram submetidos a uma lavagem prévia com um sabão de descontaminação (RBS 50®) e posteriormente imersos em HNO₃ P.A. durante cerca de 5 dias. Após esse tempo, os tubos foram lavados com água ultra pura e secos em câmara de fluxo laminar.

3.6 Preparação das amostras

As amostras de EBC foram diluídas em água ultrapura Milli-Q® cerca de 5-6 vezes, consoante o seu volume inicial, para um volume final de, no mínimo, 2,5mL. Este volume é o mínimo que permite assegurar que existe amostra suficiente para o tempo de análise e fluxo da câmara de nebulização utilizada. Foi adicionado um volume de padrão interno que correspondesse aos 10µg/L (aproximados) já mencionados. Como já foi dito, a maior parte das amostras foi acidificada (3% HNO₃) no dia anterior à sua diluição (e conseqüente análise), mas algumas foram acidificadas logo após a recolha e posteriormente congeladas. Inicialmente, as amostras eram preparadas em frascos de Teflon® de 30mL, mas verificou-se que eram demasiado grandes para um volume tão pequeno, passando a ser utilizados tubos de polipropileno descartáveis (5mL de volume máximo).

O branco foi constituído por H₂O ultrapura Milli-Q® com HNO₃ 1% e 10µg/L de padrão interno.

A solução de lavagem (*flush*) consistia em água purificada com o sistema Milli-Q® e 1% de HNO₃ (MERCK), num frasco de plástico de 1L.

A fim de minorar os possíveis efeitos de memória, a cada cinco amostras era analisada a solução de branco ou um padrão de referência NIST 1643e (*Standard Reference Material - Trace Elements in Water*, Anexo II).

3.7 Avaliação de Higiene Industrial (ISQ)

As amostragens para determinação da concentração de chumbo foram realizadas pela Unidade de Higiene Industrial (UHI) do Instituto de Soldadura e Qualidade (ISQ) e as análises foram efectuadas pelo Laboratório de Química e Ambiente (LABQUI) do mesmo instituto, acreditado no âmbito do Sistema Português da Qualidade (SPQ), de acordo com a norma NP EN ISO/IEC 17025, e de acordo com o método analítico National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) 7300.

O plano de amostragens foi desenvolvido de forma a garantir a representatividade das mesmas e dos respectivos valores na Caracterização da Exposição Ocupacional aos agentes a estudar. Deste modo:

- a) os dias da realização das amostragens foram seleccionados de acordo com a disponibilidade de ambas as partes mas de forma a serem representativos da exposição dos trabalhadores;
- b) os trabalhadores, nos quais se colocou o equipamento de amostragem, foram escolhidos aleatoriamente entre os trabalhadores que constituem o mesmo Grupo de Exposição Similar;
- c) de forma a simular a real exposição aos agentes em estudo, a amostragem foi realizada na zona de respiração dos trabalhadores.

Nas amostragens necessárias para a caracterização da exposição ocupacional, foi utilizado o seguinte equipamento:

- bombas de amostragem pessoal (modelo 224-PCXR7KB, marca SKC);
- conjunto de calibração para bombas de amostragem BIOS (modelo DCL-ML e DCLT12K).

A caracterização de exposição ocupacional ao Pb foi então realizada nos seguintes postos de trabalho:

- controlador de cadinhos;
- operador de cadinhos;
- operador de fornos.

3.8 Qualidade do ar

O nível de exposição elementar no ambiente interior da fábrica foi avaliado através de amostragem estacionária de ar. As amostras recolhidas provêm de locais que reflectem, tanto quanto possível, o ambiente interior – perto dos fornos (piso zero) e dos cadinhos (piso 1), no caso da fábrica estudada (fábrica 1).

Na figura 3.3 apresentam-se duas fotografias tiradas no interior da fábrica 1. Em ambas é possível ver o fumo que envolve todo o processo de laboração, implicando a presença de material particulado no ar respirado pelos trabalhadores.



Figura 3.3: Unidade de filtros em cascata (SFU) e impactador colocados no piso 1 da fábrica (esquerda); Trabalhador junto a um dos fornos (direita).

A recolha do ar foi feita com amostradores Gent PM₁₀, equipados com uma unidade de filtros em cascata (SFU, do inglês *Stacked Filter Unit*), que carregavam, em duas fases sequenciais, filtros de policarbonato Nuclepore® de 47mm, com 8 e 0,4µm de tamanho de poro. Acima do filtro mais grosseiro encontrava-se um pré-impactador. O ar foi amostrado com um caudal de 16L/min, que permitiu a recolha de partículas grosseiras com diâmetros aerodinâmicos entre 2,4-10µm, no primeiro filtro e partículas finas com diâmetro aerodinâmico menor que 2,5µm no segundo filtro.

As cargas dos filtros foram medidas por gravimetria numa sala limpa (classe C - ISO 7). Os filtros expostos foram divididos para permitir a análise por Particle Induced X-ray Emission (PIXE) e Instrumental Neutron Activation Analysis (INAA).

3.9 Análise Estatística

Foram efectuadas análises exploratórias para estudar a normalidade das variáveis (Shapiro-Wilk) e a heterocedastidade (teste de Levene). Para determinar as diferenças entre os grupos estabelecidos (as diferentes fases de recolha: a, b, c, d) e os indivíduos expostos e não expostos, foram usados diferentes testes, incluindo testes não-paramétricos (Mann-Whitney e Kruskal-Wallis). As correlações foram realizadas recorrendo ao coeficiente de correlação de Spearman e os resultados estatísticos foram considerados significantes para p-value<0.05. Todos os testes foram feitos no programa Statistica 8.0 (Statsoft®).

3 | Resultados

4.1 Trabalho preliminar

4.1.1 Análise da Qualidade do ar

4.1.1.1 Amostradores estacionários

Como foi descrito anteriormente, foram colocados 4 amostradores na fábrica 1, em locais estratégicos, para que a amostragem fosse representativa do ambiente de trabalho.

Os resultados dos ensaios gravimétricos, a partir dos filtros recolhidos nas instalações fabris, em escritórios e no ambiente exterior, depois de determinadas as concentrações (através da massa e do volume de ar), estão representados na figura 4.1.

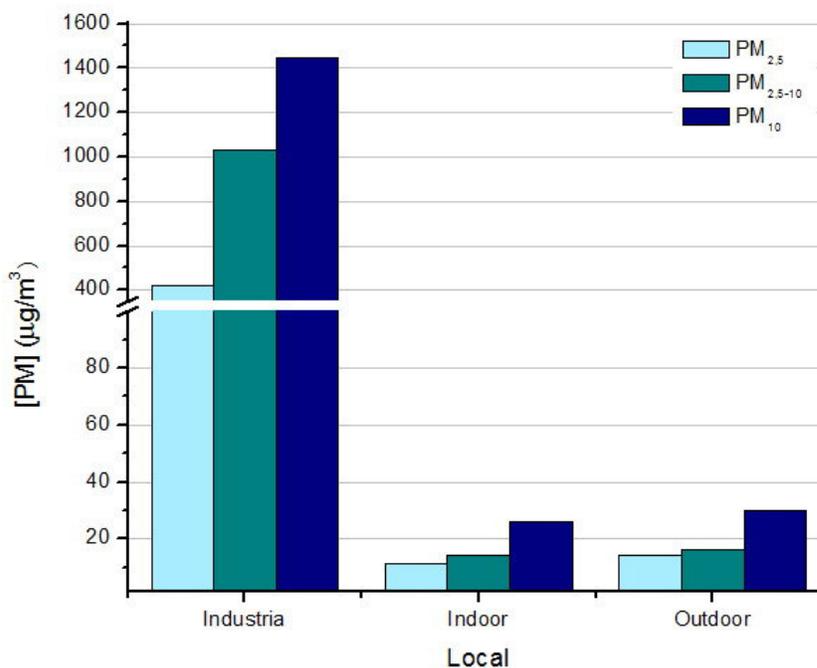


Figura 4.1: Valores médios das concentrações mássicas do material particulado (PM) na indústria (fábrica 1), em espaço *indoor* (escritórios, local controlo) e no ambiente (*outdoor*) (valores em µg/m³).

As concentrações médias na indústria são significativamente mais elevadas que as verificadas nos escritórios e no ambiente exterior. As concentrações médias de PM₁₀ e de PM_{2.5} medidas na indústria não excedem o valor limite para partículas respiráveis (3mg/m³) estabelecido pela Norma Portuguesa NP1796 (Limites de Exposição Ocupacional a Agentes Químicos).

Os níveis de PM_{2.5} e PM_{2.5-10} medidos nos escritórios e no ambiente não apresentam diferenças significativas, o que era de esperar uma vez que os escritórios não são ambientes estanques, estando naturalmente ventilados devido a janelas abertas.

A concentração mássica máxima de PM₁₀ medida nos escritórios (28 µg/m³) é mais baixa que o valor limite estabelecido pela legislação portuguesa (DL 79/2006, de 4 de Abril), relacionado com a qualidade de ar *indoor*, que é de 150µg/m³.

A concentração mássica média de PM_{10} medida no ambiente ($30 \mu\text{g}/\text{m}^3$) é mais baixa que o padrão anual da União Europeia e que é $40 \mu\text{g}/\text{m}^3$. Também a concentração média de $PM_{2.5}$ ($14 \mu\text{g}/\text{m}^3$) não excedeu o valor limite de $25 \mu\text{g}/\text{m}^3$ definido pela Posição Comum da União Europeia N^o 13/2007 de 25 de Junho.

As concentrações elementares para as fracções $PM_{2.5}$ e PM_{10} estão representadas na figura 4.2 e foram obtidas a partir de análises químicas realizadas às partículas recolhidas nos três locais (indústria, *indoor* e *outdoor*). Foi escolhida uma escala logarítmica para permitir uma melhor visualização dos resultados.

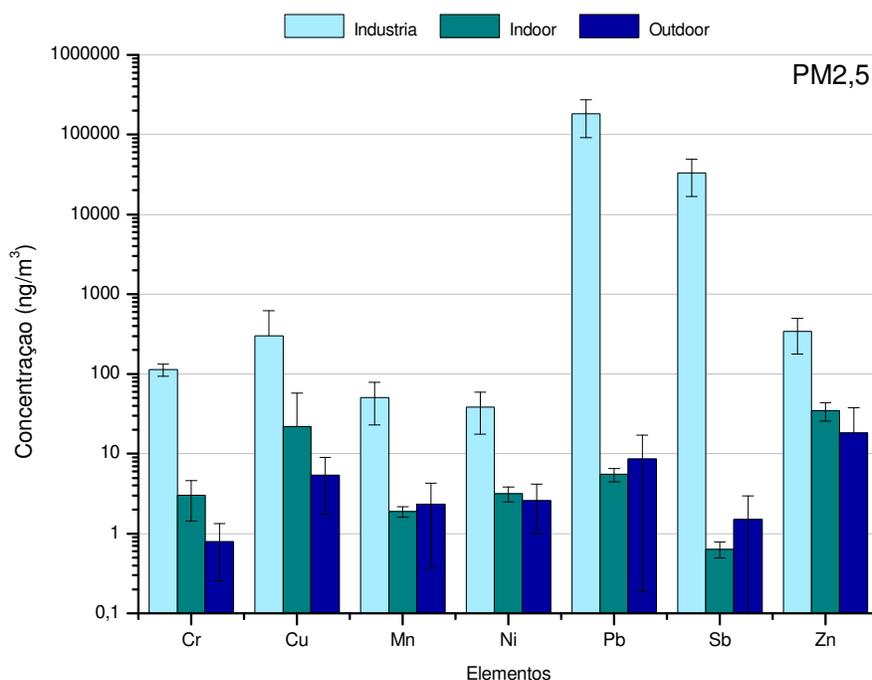


Figura 4.2: Concentrações elementares (ng/m^3) obtidas por análise do material particulado $PM_{2.5}$, por INAA e PIXE.

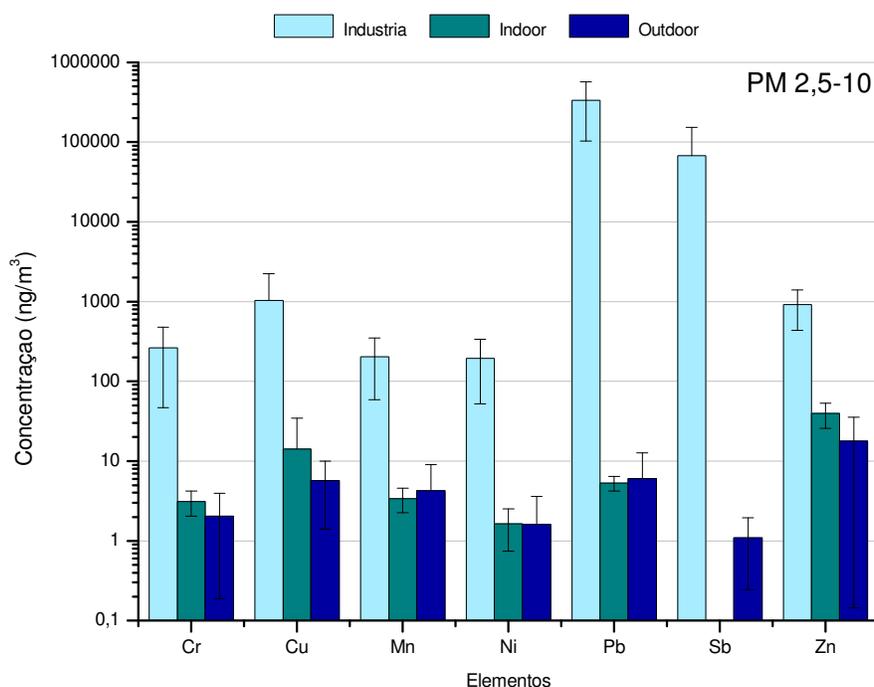


Figura 4.3: Concentrações elementares (ng/m^3) obtidas por análise do material particulado $\text{PM}_{2,5-10}$ por INAA e PIXE.

Em ambos os casos (Figuras 4.2 e 4.3), ocorreram problemas na análise espectral devido à elevada taxa de contagens (nomeadamente do Sb), que limitou o número de elementos detectados com rigor.

Dos elementos de interesse para este trabalho, o Pb e o Sb foram os que apresentaram concentrações mais elevadas (superiores a $10000 \text{ ng}/\text{m}^3$), estando estes elementos associados com o processo e os materiais usados na produção fabril.

A concentração média de Pb nas PM_{10} foi de $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$, valor bastante superior ao limite estabelecido pela Norma Portuguesa NP1796 ($50 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Por outro lado, a concentração média de Sb nas PM_{10} ($100 \mu\text{g}/\text{m}^3$) não excede o valor estabelecido pela mesma norma ($500 \mu\text{g}/\text{m}^3$).

Como se pode observar, as maiores diferenças ocorrem entre os valores na indústria e nos escritórios, para o Pb e o Sb, demonstrando a importância do processo industrial na emissão destes elementos. As figuras anteriores também mostram que as concentrações elementares das $\text{PM}_{2,5}$ e das $\text{PM}_{2,5-10}$ não apresentam diferenças significativas.

Os elementos que podem ser directamente relacionados com a combustão dos materiais usados nos processos industriais em causa são o Sb, Pb, Ni, Zn, que nas amostras das instalações fabris se apresentam em maiores quantidades na fracção grosseira, tal como acontece com o Mn, enquanto que no ambiente exterior e nos escritórios estes elementos antropogénicos estavam presentes em maiores quantidades nas $\text{PM}_{2,5}$.

4.1.1.2 Amostradores pessoais

Para um determinado agente químico, poderão existir simultaneamente diferentes tipos de valores limite de exposição ocupacional. A *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) apresenta, em termos de exposição ocupacional, a concentração média ponderada para um dia normal de 8 horas de trabalho e para uma semana de 40 horas, à qual os trabalhadores podem estar repetidamente expostos, dia após dia, sem efeitos adversos para a saúde, dada por TLV-TWA (*Threshold Limit Value-Weighted Average*).

Esta e outras definições foram adoptadas para o sistema português, através da norma portuguesa NP 1796/2007 ('Segurança e Saúde no Trabalho - Valores limite de exposição ocupacional a agentes químicos') emitida pelo Instituto Português da Qualidade. Ao ser estabelecida a equivalência com as designações adoptadas no sistema americano, a sigla e termo a utilizar para o TLV-TWA será VLE-MP (valor limite de exposição – média ponderada).

Assim, os valores da média ponderada foram obtidos multiplicando o caudal pelo tempo de amostragem, para obter o volume amostrado e dividindo a massa pelo valor encontrado, considerando-se que os operadores estão expostos ao chumbo durante 8 horas por dia. Os resultados desta avaliação estão representados na tabela 4.1.

Tabela 4.1: Valores obtidos na caracterização da exposição ocupacional a chumbo, através de amostradores pessoais. Dados fornecidos pelo ISQ.

Posto de Trabalho	Concentração (mg/m ³)	MP (mg/m ³)	VLE-MP (mg/m ³)	VLE ⁽¹⁾ (mg/m ³)
Controlador de cadinhos	0.22	0.22	0.05	0.15
	0.31	0.31		
Operadores de cadinhos	0.80	0.80		
	0.18	0.18		
Operadores de fornos	0.52	0.52		
	0.70	0.70		
	0.67	0.67		
	0.37	0.37		

(1) Valor limite de exposição (8 horas diárias de trabalho, 40 horas semanais) de acordo com o Decreto-lei nº 274/89 de 21 de Agosto.

Por análise da tabela anterior, verifica-se que todos os valores obtidos na caracterização da exposição ao Pb nos postos de trabalho avaliados se encontram acima do VLE (0.15 mg/m³) e consequentemente acima do VLE-MP (0.05 mg/m³), indicando risco para a saúde dos operadores.

4.1.2 Validação e estabelecimento da metodologia

A tabela 4.2 apresenta as concentrações médias de vários elementos presentes no EBC, medidas por TXRF e por ICP-MS, com o objectivo de validar os resultados de concentrações elementares no EBC. As técnicas escolhidas, apesar de apresentarem características distintas, são ambas adequadas à análise directa de amostras líquidas.

Tabela 4.2: Concentrações elementares médias no EBC (ng/mL) obtidas por TXRF e ICP-MS, para as diferentes fases de recolha dos indivíduos expostos (N=13) e para os controlos (N = 22). Os valores apresentados são médias e erro-padrão.

		Mn	Zn	Cu	Ni	Pb
a	TXRF	1.6 ± 0,3	400.0 ± 85,1	4.7 ± 1.4	2.9 ± 0.5	21.5 ± 4.8
	ICP-MS	1.9 ± 0.4	409.3 ± 101.6	5.7 ± 1.9	2.9 ± 0.6	18.5 ± 6.0
	% DIF	19	2	21	0	-14
b	TXRF	2.1 ± 1.1	205.5 ± 48.3	6.9 ± 2.2	5.0 ± 1.9	33.9 ± 7.2
	ICP-MS	2.3 ± 0.6	219.2 ± 54.7	8.4 ± 3.1	13.8 ± 8.8	18.9 ± 2.8
	% DIF	10	7	22	176	-44
c	TXRF	1.2 ± 0.2	147.6 ± 32.5	3.0 ± 0.7	4.5 ± 1.2	27.0 ± 7.2
	ICP-MS	1.4 ± 0.3	174.8 ± 43.2	3.4 ± 0.8	3.6 ± 0.7	23.4 ± 7.7
	% DIF	17	18	13	-20	-13
d	TXRF	2.4 ± 1.0	195.4 ± 44.9	9.3 ± 4.9	5.3 ± 1.0	27.8 ± 8.0
	ICP-MS	2.9 ± 0.9	336.5 ± 116.1	10.9 ± 6.2	4.7 ± 1.0	16.6 ± 2.9
	% DIF	21	72	17	-11	-40
CTR	TXRF	nq	203.2 ± 28.5	2.0 ± 0.4	24.0 ± 3.8	1.9 ± 0.4
	ICP-MS	0.5 ± 0.1	201.2 ± 31.4	2.4 ± 0.3	21.5 ± 3.3	2.3 ± 0.9
	% DIF	—	-1	20	-10	21

% DIF: percentagem de diferença entre ICP-MS e TXRF, tendo este último como referência.

nq: não quantificado

A maior parte das amostras analisadas por ICP-MS foram acidificadas (3% HNO₃) 24 horas antes de serem preparadas para análise, com a finalidade de dissolver compostos ou material particulado que pudesse influenciar os resultados. Além disso, entre a análise de cada grupo de amostras foram testados padrões certificados (NIST 1643e). Este padrão apresenta uma matriz aproximada à do EBC (aquosa) e a gama de concentrações a determinar, bem como os elementos, enquadra-se nos objectivos da análise.

Estes padrões foram também analisados por TXRF, de forma a garantir a validade de comparação das duas técnicas, e tanto por ICP-MS como por TXRF os resultados foram bastante satisfatórios.

Na tabela 4.3 apresentam-se os valores obtidos para os elementos em estudo (médias e erro-padrão), bem como os valores certificados das concentrações do material certificado de referência utilizado (valores médios, uma vez que foram preparadas duas soluções idênticas, analisadas quatro vezes entre conjuntos de amostras), correspondentes à diluição utilizada (1:20).

Tabela 4.3: Concentrações médias de Mn, Zn, Cu, Ni, Pb (ng/mL) e respectivos erros padrão obtidas por ICP-MS no material de referência certificado NIST1643e. São também indicadas as diferenças para o valor certificado expressas, em percentagem, obtidas para as técnicas de ICP-MS e de TXRF.

	NIST1643e (1:20)	ICP-MS	%DIF	%DIF TXRF *
Mn	1.93 ± 0.004	1.94 ± 0.013	-1	-9
Zn	3.88 ± 0.007	4.67 ± 1.12	-17	0
Cu	1.12 ± 0.002	1.17 ± 0.006	-4	-4
Ni	3.08 ± 0.006	3.22 ± 0.028	-4	10
Pb	0.97 ± 0.002	1.08 ± 0.008	-10	-6

% DIF: percentagem de diferença entre os valores obtidos por ICP-MS e os valores certificados.

% DIF TXRF: percentagem de diferença entre os valores obtidos por TXRF e os valores certificados (NIST1640 – Anexo III).

* Valores cedidos pelo LAQ/LNEG (Dr^a Alexandra Barreiros)

Assim, as diferenças nos valores obtidos para as amostras de EBC analisadas poderão dever-se à presença de partículas em suspensão inaladas, uma vez que as amostras utilizadas para TXRF não foram acidificadas. Apesar de cada amostra ser analisada pelas duas técnicas, na maior parte dos casos as alíquotas utilizadas não eram as mesmas, o que introduz mais um factor que poderá influenciar o resultado.

Uma vez que, nalguns casos, a diferença encontrada entre ambas as análises foi bastante elevada, optou-se por observar ao microscópio um suporte de amostra de TXRF usado numa das referidas análises. A Figura 4.4 apresenta duas fotografias tiradas a diferentes alvos.

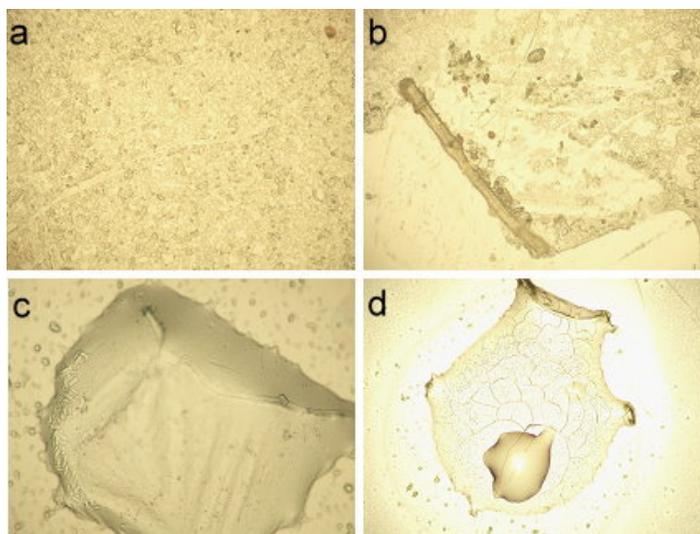


Figura 4.4a-d: Fotografias microscópicas de suportes utilizados em análise por TXRF, com amostra (ampliação: 100x-200x)

Na fotografia 4.4a podemos ver uma área relativamente uniforme e que à partida permite resultados mais homogéneos, em termos de reflexão dos raios incidentes e consequentes quantificações. Na figura 4.4b é evidente um aglomerado de partículas que irá com certeza influenciar as medidas, uma vez que, ao estar presente no alvo para análise por TXRF, não será analisada por ICP-MS, originando as diferenças apresentadas na tabela 4.2 (no caso do Pb e do Zn). Mesmo sendo analisada apenas uma alíquota, de onde são retirados volumes diferentes para as duas técnicas, a presença destas partículas irá aumentar a diferença entre os resultados obtidos. Estas fotografias foram tiradas a alvos com amostras não acidificadas

Por outro, na figura 4.4c apresenta-se uma imagem totalmente diferente. A base é a mesma, uma pequena quantidade de amostra colocada num suporte para análise por TXRF. No entanto, esta amostra foi acidificada e, apesar de termos uma visão quase tridimensional, a sua aparência semelhante a uma pequena película (que se deve ao facto do ácido nunca secar por completo) confere-lhe uma certa homogeneidade. Na figura 4.4d o caso é semelhante, distinguindo-se mais facilmente a zona onde o ácido não secou completamente e uma área mais uniforme, com formações mais regulares.

Assim, a acidificação das amostras revelou-se necessária para a determinação elementar nas duas técnicas.

A partir deste trabalho preliminar foi possível estabelecer a melhor metodologia de preparação de amostras e avançar para o estudo das concentrações elementares no EBC em ambiente fabril.

Uma vez que a utilização da técnica de TXRF apenas tinha como objectivo validar o procedimento de análise das amostras por ICP-MS, apenas os resultados obtidos por esta última técnica serão utilizados na caracterização elementar do EBC.

4.2 Caracterização elementar do EBC

Para o estudo das variações das concentrações elementares no EBC, ao longo da semana de trabalho mas também entre indivíduos expostos e não expostos, foram estudadas duas indústrias. Ambas têm o chumbo como principal componente dos respectivos processos fabris, apesar da fábrica 1 trabalhar maioritariamente com matérias-primas, resíduos, reciclagem de materiais com metais pesados, enquanto que a fábrica 2 utiliza os materiais resultantes da fábrica 1 na manufactura de equipamentos, também eles contendo chumbo.

Em seguida, apresenta-se o estudo realizado em cada uma delas, do ponto de vista dos elementos estudados, dando especial atenção ao chumbo.

4.2.1 Fábrica 1

Na figura 4.5 estão representadas as concentrações médias (e os respectivos erros) de Pb obtidas para cada fase de recolha dos indivíduos expostos e não expostos. Estão também representados os valores extremos e os *outliers*.

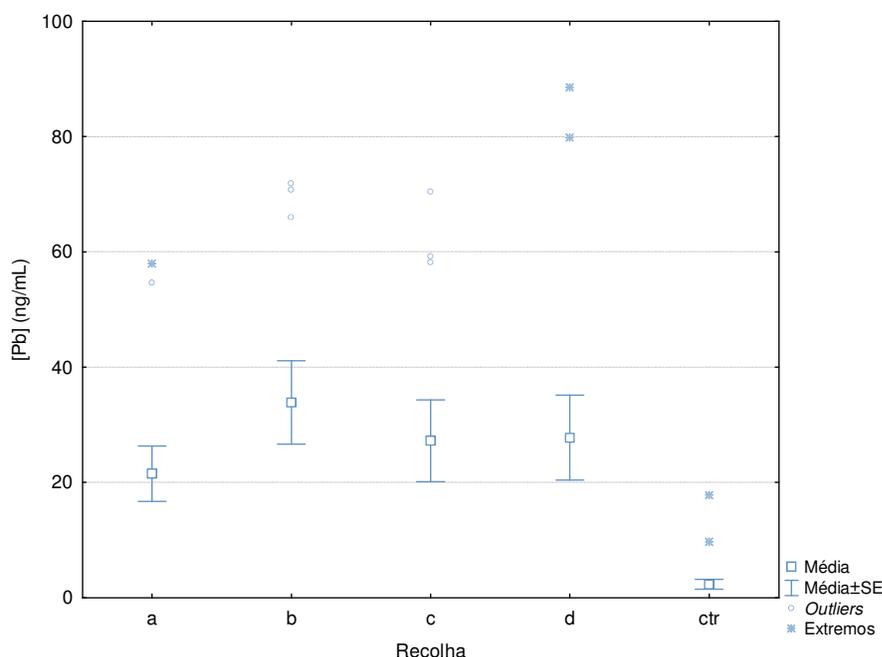


Figura 4.5: Concentração de Pb no EBC, em cada fase da semana de trabalho (a, b, c, d) para todos os indivíduos (N = 13) e grupo controlo (N = 22), na fábrica 1.

Como se pode observar na figura, o EBC dos trabalhadores apresenta valores mais elevados para as concentrações de Pb, em comparação com os indivíduos não expostos, em qualquer uma das fases de recolha. Nota-se uma tendência para o aumento das concentrações ao longo da semana de trabalho, apesar de nem sempre significativa ($p\text{-value} = 0.430$ entre a e d), associada a um aumento durante o dia de trabalho.

Na tabela 4.4 estão indicadas as concentrações médias (e respectivos erros) dos restantes elementos em estudo, para as várias fases de recolha.

Tabela 4.4: Concentrações elementares no EBC, em cada fase da semana de trabalho (a, b, c, d) para todos os indivíduos (N=13) e grupo controlo (N = 22), na fábrica 1. Os valores apresentados são médias e erro-padrão.

	Fase de recolha				
	CTR	a	b	c	d
	Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE
Mn	0.5 ± 0.1	1.9 ± 0.4	2.3 ± 0.6	1.4 ± 0.3	2.9 ± 0.9
Zn	201.2 ± 31.4	409.3 ± 101.6	219.2 ± 54.7	174.8 ± 43.2	336.5 ± 116.1
Cu	2.4 ± 0.3	5.7 ± 1.9	8.4 ± 3.1	3.4 ± 0.8	10.9 ± 6.2
Ni	21.5 ± 3.3	2.9 ± 0.6	13.8 ± 8.8	3.6 ± 0.7	4.7 ± 1.0
Cr	0.14 ± 0.06	2.8 ± 1.0	3.0 ± 0.9	5.1 ± 1.7	3.5 ± 1.0
Sb	0.06 ± 0.01	1.1 ± 0.3	1.7 ± 0.3	1.3 ± 0.5	1.1 ± 0.2

Observa-se que as concentrações elementares nos indivíduos expostos são superiores às dos indivíduos não expostos, com excepção do Ni. Este elemento apresenta um valor médio bastante superior nos controlos. Este facto foi detectado aquando da realização das análises por ICP-MS e verificou-se apenas nos últimos controlos mas, como os valores eram muito mais elevados que os restantes, a média foi bastante afectada. Tendo em conta a tendência dos restantes elementos, este valor pode ser explicado por contaminações dos tubos Eppendorf™ utilizados para armazenar as amostras de EBC.

Como já foi referido no Capítulo 2 (Metodologias – tabela 3.6), foram testados vários tubos de polipropileno e tubos Eppendorf™, de modo a definir quais os que apresentavam menor contaminação. Foram seleccionados para o trabalho futuro os tubos de polipropileno por apresentarem menores contagens para os vários elementos em estudo, principalmente para o Pb.

Apesar de não existirem diferenças estatísticas entre os valores das recolhas a e d, estas estão presentes entre d e CTR para todos os elementos estudados, excepto o Zn (*p-value* = 0.094) e o Cu (*p-value* = 0.088). Entre a recolha a e CTR apenas o Zn não apresenta diferenças significativas (*p-value* = 0.357).

Estes dados indicam que, mesmo havendo algumas diferenças entre os valores recolhidos em a e em d (tendência de aumento ao longo da semana de trabalho), estas não são tão evidentes como as diferenças com os indivíduos não expostos, sendo este o resultado esperado.

Assim, estes resultados permitiram testar e estabelecer a metodologia de recolha e de armazenamento das amostras.

4.2.2 Fábrica 2

Depois do estudo preliminar realizado na fábrica 1, determinou-se que bastava recolher amostras no início e no fim da semana de trabalho, uma vez que eram as recolhas mais representativas, além de simplificar a logística de amostragem e diminuir o tempo que os trabalhadores estão afastados do seu posto de trabalho. Os resultados das amostragens, em relação ao chumbo, estão representados na figura 4.6.

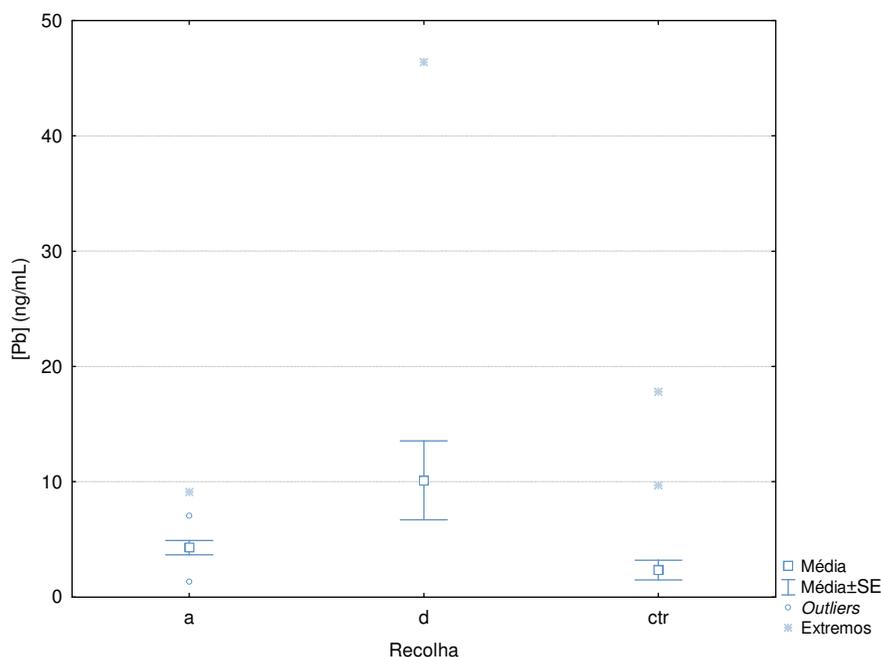


Figura 4.6: Concentração de Pb no EBC, em cada fase da semana de trabalho (a, d) para todos os indivíduos (N = 12) e grupo controlo (N = 22), na fábrica 2.

Através de comparações não paramétricas (testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis), podemos dizer que existem diferenças estatísticas ($p\text{-value} = 0.028$) entre as duas fases de recolha para as concentrações de Pb no EBC, tendência que pode ser observada na figura anterior. Também as diferenças entre cada fase de recolha e os valores dos controlos são significantes ($p\text{-value a-ctr} = 0.0007$; $p\text{-value d-ctr} = 0.0001$).

Tabela 4.5: Concentrações elementares no EBC, em cada fase da semana de trabalho (a, d) para todos os indivíduos (N = 12) e grupo controlo (N = 22), na fábrica 2. Os valores apresentados são médias e erro-padrão.

	Fase de recolha		
	CTR	a	d
	Média ± SE	Média ± SE	Média ± SE
Mn	0.5 ± 0.1	1.6 ± 0.1	1.2 ± 0.3
Zn	201.2 ± 31.4	323.7 ± 83.7	166.9 ± 44.6
Cu	2.4 ± 0.3	3.0 ± 0.9	2.4 ± 0.5
Ni	21.5 ± 3.3	5.2 ± 0.6	4.5 ± 1.0
Cr	0.14 ± 0.06	2.6 ± 0.9	2.2 ± 0.7
Sb	0.06 ± 0.01	0.19 ± 0.03	0.28 ± 0.04

Como se pode observar na tabela anterior, apenas o Sb regista um aumento entre as recolhas a e d, com diferenças significativas (p -value = 0.049). Por outro lado, para o Zn verifica-se também uma variação mais pronunciada (e negativa) ao longo da semana de trabalho, mas mesmo assim não é estatisticamente significativa (p -value = 0.073). Os restantes elementos não apresentam diferenças significativas entre as duas fases de recolha, podendo considerar-se que as concentrações se mantêm constantes.

Em termos de comparação das fases de recolha e o grupo controlo, o Zn e o Cu não apresentam diferenças estatisticamente significantes, como se pode observar na tabela 4.6.

Tabela 4.6: P -values da relação entre as fases de amostragem na fábrica 2 (a e d) e o grupo controlo (CTR).

	a-CTR	d-CTR
Zn	0.249	0.428
Cu	0.692	0.829

Os restantes elementos apresentam-se estatisticamente diferentes entre as fases de recolha e os valores dos controlos.

4.2.3 Comparação das duas fábricas

Após o estudo elementar de ambas as instalações fabris, e depois de se observarem claras diferenças entre elas, resta-nos efectuar uma comparação simples entre as fases de recolha mais significativas (a e d). A diferença em percentagem, entre os valores médios das concentrações elementares, encontra-se representada na figura 4.7.

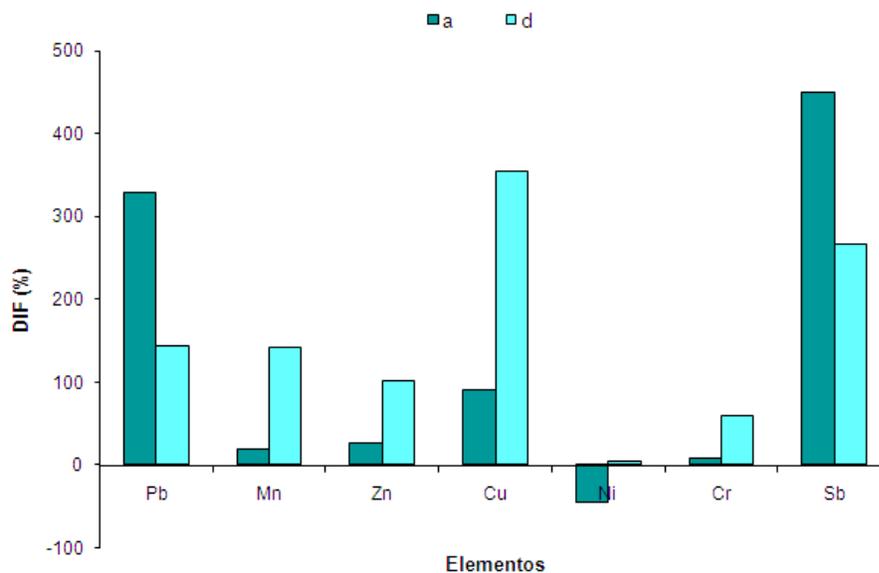


Figura 4.7: Comparação das concentrações elementares no EBC dos trabalhadores das duas fábricas estudadas. Estão representadas as diferenças (expressas em percentagem) das concentrações elementares obtidas nas fases de recolha mais representativas (a e d) dos trabalhadores da fábrica 1 relativamente aos da fábrica 2.

Como se pode verificar, a maior parte das diferenças são positivas, o que indica que a fábrica 2 (utilizada como referência) apresenta concentrações menores em todos os elementos. Este facto vai de encontro aos resultados referidos anteriormente, a título individual. No entanto, regista-se uma diferença negativa no caso do Ni, determinado em concentrações mais elevadas nos trabalhadores da fábrica 2, no início da semana de trabalho.

Torna-se assim bastante evidente a diferença entre as duas fábricas, em termos de concentrações elementares determinadas no EBC.

4.3 Caracterização demográfica e clínica

A análise da correlação entre as variáveis pressupõe a verificação de uma relação de linearidade entre estas. Ao contrário do índice de correlação de *Pearson*, que considera que as amostras são provenientes de populações normais com variâncias iguais (distribuição normal bivariada), o coeficiente de correlação de Spearman expressa a variação conjunta de duas variáveis, mas utiliza as ordens dos valores para obter uma estimativa da correlação.

Assim, para análise da correlação entre as variáveis consideradas neste estudo foi utilizado um teste não-paramétrico de correlação, o coeficiente de correlação de Spearman (r_s), cujos resultados são apresentados na tabela 4.7.

Embora, como já referido, os coeficientes de correlação da tabela anterior ilustrem apenas a análise da associação linear entre as duas variáveis, estes valores poderão dar-nos uma medida das variações relativas entre os pares de variáveis analisadas.

Tabela 4.7: Correlações entre antiguidade, FEV1 (%), concentração de Pb no sangue e concentrações elementares no EBC, nos indivíduos expostos na fábrica 1. Os valores apresentados são coeficientes de correlação de Spearman (r_s) com $p\text{-value} < 0.05$.

	Antiguidade (N = 13)	FEV1 (%) (N = 7)	[Pb] sangue (N = 11)
Pb	0.628	0.821	0.736
Zn	—	-0.786	—
Sb	0.614	—	—

Estes valores permitem-nos dizer que existe uma correlação ténue entre a antiguidade e as concentrações de Pb e Sb no EBC. Em relação ao FEV1 (%), verifica-se uma forte correlação positiva com os níveis de Pb, e negativa com a concentração de Zn no EBC. Existe também uma correlação positiva e entre as concentrações de Pb no EBC e no sangue, bastante importante no âmbito da validação do EBC como bioindicador de exposição a este metal.

A idade dos indivíduos expostos não se mostrou relacionada com as concentrações elementares encontradas no EBC.

Na fábrica 2 não foram encontradas correlações significantes entre as características demográficas/clínicas e as concentrações elementares determinadas no EBC. Isto pode dever-se ao facto dos trabalhadores da fábrica 2 apresentarem concentrações elementares no EBC muito próximas dos controlos e, como tal, muito diferentes da fábrica 1 (como se pode observar no ponto 4.2.3).

Também no grupo de indivíduos não expostos (estudados como grupo controlo) não foram encontradas associações significantes entre a concentração de Pb no EBC e a idade. As restantes características não foram analisadas para este grupo, uma vez que o FEV1 (%) não foi avaliado e o estudo da antiguidade não teria significado, devido às características do ambiente *indoor*.

4.3.1 Factores de risco: hábitos tabágicos

As características estudadas anteriormente podem apresentar relações mais ou menos significativas com a concentração de Pb no EBC, mas não podem ser considerados factores de risco. Falámos em idade, tempo de serviço e capacidade respiratória; agora coloca-se em evidência os hábitos tabágicos dos indivíduos expostos. A figura 4.8 que se segue representa a relação entre o número de fumadores/não fumadores e as concentrações médias de Pb no EBC.

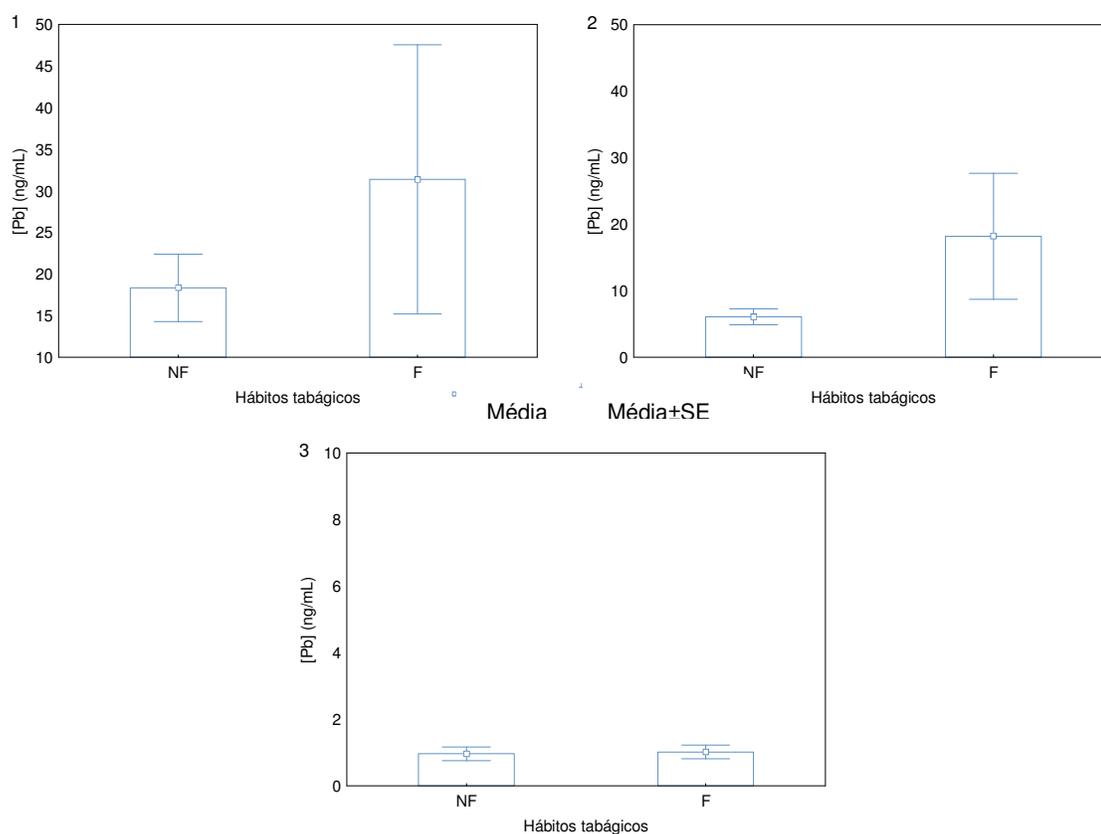


Figura 4.8: Representação gráfica da relação entre a concentração de Pb no EBC e os hábitos tabágicos dos indivíduos expostos na fábrica 1 (1), na fábrica 2 (2) e dos controlos (3).

Como se pode observar, existem algumas diferenças, mas não são significativas ($p\text{-value} > 0.05$). Não se pode dizer que exista uma correlação entre os hábitos tabágicos dos indivíduos expostos e a concentração de Pb encontrada no EBC, uma vez que a dispersão é muito grande mesmo entre os fumadores.

Também no grupo de indivíduos não expostos não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as concentrações elementares no EBC e os hábitos tabágicos.

5 | Discussão

A poluição do ambiente de trabalho é um tópico cada vez mais discutido por médicos, investigadores e responsáveis por higiene e segurança no trabalho, em todo o mundo. Se em escritórios o problema também se coloca, em ambientes fabris as medidas de prevenção devem ser redobradas devido às concentrações mais elevadas de agentes potencialmente tóxicos. (Lee & Chang 2000; Menezes *et al.*, 2004; Stranger *et al.*, 2007)

A determinação da exposição de trabalhadores de instalações fabris a substâncias com diversos graus de toxicidade, apesar de contar já com várias décadas de estudo, teve um avanço significativo nos últimos anos devido ao surgimento de novas técnicas analíticas. No entanto, os meios biológicos recolhidos são o sangue e a urina, que não fornecem uma avaliação directa da exposição. Torna-se necessário encontrar alternativas, uma vez que a determinação de concentrações de metais em diferentes fluidos biológicos pode também fornecer informação útil sobre a cinética e uma melhor compreensão das interações físico-químicas entre os metais. (Goldoni *et al.*, 2004)

No entanto, a caracterização inflamatória, iónica e elementar do EBC para fins de saúde ambiental ainda é escassa. Vários estudos já reportaram como é importante a determinação de marcadores de stress oxidativo no EBC como forma de avaliação da resposta inflamatória em cenário ocupacional (Hoffmeyer *et al.* 2007; Fireman *et al.*, 2008) e na distinção entre exposições agudas e crónicas (Do *et al.* 2009).

O condensado do ar exalado surge então como possível bioindicador não invasivo de exposição a poeiras e gases de metais pesados, pretendendo este trabalho avaliar as suas capacidades para essa função, nomeadamente no caso do chumbo, bem como o desenvolvimento da respectiva metodologia de recolha e análise.

Como forma de complementar esta avaliação, principalmente a nível elementar, foi realizada uma breve caracterização ambiental, tanto em cenário fabril como em escritórios, recorrendo a amostradores fixos. Os resultados demonstraram uma elevada carga de material particulado nas instalações fabris (fábrica 1), além de concentrações elementares (principalmente de chumbo) acima dos valores regulamentados, estando de acordo com as observações empíricas e imediatas que podem ser registadas numa simples visita às instalações. Os valores obtidos para o ambiente de escritórios permitem assegurar a escolha acertada do grupo controlo, que não deve estar exposto de forma persistente aos poluentes em estudo.

Também o estudo da exposição ao chumbo através de amostradores pessoais permitiu comprovar o ambiente poluído a que os trabalhadores estavam expostos, tendo sido obtidas concentrações de chumbo bastante superiores aos valores limite de exposição regulamentados.

Mesmo antes da avaliação da dose realmente inspirada pelos trabalhadores e tendo em conta apenas a fracção respirável de partículas e o ambiente de trabalho, torna-se claro que algumas medidas devem ser tomadas.

O risco para a saúde dos trabalhadores, patente nos valores obtidos, implica a implementação de medidas correctivas, que passam pela instalação de um sistema de extracção eficaz na zona dos cadinhos e a melhoria do sistema já existente na zona dos fornos, para evitar a dispersão dos fumos no local de trabalho. Também a medicina do trabalho deve estar directamente envolvida, assegurando a vigilância médica dos trabalhadores expostos aos agentes tóxicos, através de exames regulares.

Por outro lado, a informação é extremamente importante e os trabalhadores devem ser instruídos acerca dos riscos a que estão expostos, para que as regras de protecção individual não sejam descuradas.

Por questões de agendamento, não foi possível analisar a qualidade do ar na fábrica 2 em tempo útil, mas uma comparação geral pode ser feita, em termos de observação do local.

As duas fábricas estudadas, apesar de terem por base o mesmo tipo de matérias-primas, apresentavam um processo fabril totalmente distinto. Enquanto a fábrica 1 tinha um ambiente muito mais poluído, com fumos e poeiras, devido à fundição dos metais nos fornos, a fábrica 2 apresentava-se à partida mais limpa, com instalações espaçosas e aparentemente bem ventiladas. De forma geral, era possível distinguir de forma inequívoca os dois ambientes; no entanto, restava confirmar este facto com as respectivas análises.

Assim, e de forma geral, estes dois passos de caracterização ambiental podem ser complementares, servindo de ponto de partida para a caracterização pessoal dos trabalhadores, e podem ajudar a responder a uma das principais questões que estão na base deste trabalho: as concentrações elementares de EBC reflectem o ambiente de trabalho, bem como a diferença entre os dois espaços?

Efectivamente, e com base nos resultados obtidos para a fábrica 1, podemos dizer que o EBC reflecte a contaminação ambiental, principalmente tendo em conta os elementos estudados. Os valores obtidos para as concentrações elementares do EBC mostram uma tendência semelhante aos registados através da análise da qualidade do ar, respondendo assim à questão colocada em primeiro lugar.

O facto dos valores médios obtidos para o Mn, Cu, Cr e Ni não diferirem muito entre as duas fábricas não indica que não existam diferenças. Enquanto na fábrica 1 se verifica um aumento das concentrações de todos os elementos (com excepção do Sb e do Zn) durante a semana de trabalho, na fábrica 2 os valores mantêm-se constantes (ou com variações não significantes), além de que estes últimos são da ordem de grandeza dos controlos. Este facto demonstra a diferença entre as duas fábricas, corroborando os dados que indicam uma maior exposição dos trabalhadores da fábrica 1 aos elementos estudados.

Em estudos com outros elementos (Cr, W) esta tendência de aumento ao longo da semana de trabalho também se verificou, mostrando que as variações das concentrações elementares no EBC

de trabalhadores expostos são dependentes do nível e duração da exposição. (Mutlu *et al.*, 2001; Antczak & Gorski, 2002; Lemiere, 2002; Caglieri *et al.*, 2006; Goldoni *et al.*, 2004, 2006, 2008).

O Zn apresenta um comportamento contrastante em relação aos elementos referidos anteriormente, diminuindo ao longo da semana de trabalho. Esta tendência verifica-se em ambas as fábricas e poderá ter uma base fisiológica, uma vez que o Zn é necessário para o crescimento e multiplicação de células, integridade do sistema imunitário, acções anti-inflamatórias (activação das vias de remoção macrofágicas), protecção contra radicais livres (actividade da superóxido dismutase), entre muitos outros processos biológicos. Tem ainda um papel bioquímico muito importante na actividade de mais de 300 enzimas (oxiredutases, transferases, hidrolases, isomerases, liases e ligases), podendo ser essencial para a sua estrutura, regulação e/ou acção catalítica. (Thunus & Lejeune, 1994; Apostoli, 2002; Bond, 2005; Deng *et al.*, 2009)

Assim, como foi possível constatar através da análise do ar ambiente, os trabalhadores estão expostos a elevadas concentrações de Zn. Ora, uma vez que o elemento está presente no ambiente numa quantidade superior ao normal e é bastante necessário para o organismo, poderá verificar-se um aprisionamento de Zn. Desta forma, ao ser requisitado para os diversos processos biológicos onde está envolvido, não será libertado através do EBC, uma vez que será absorvido e encaminhado para os diferentes sistemas de forma mais rápida. Não podemos esquecer, no entanto, que a manutenção da homeostase intracelular do Zn é fundamental, o que poderá ser conseguido através de trocas membranares com outros iões ou por outros processos que envolvam dispêndio energético com vista ao seu armazenamento intracelular. As células do epitélio respiratório têm esta capacidade, apesar de existir pouca informação acerca dos processos da passagem do Zn para o meio intracelular. (Deng *et al.*, 2009)

Esta questão é pouco conhecida e merecia um acompanhamento mais aprofundado. Seria bastante interessante que, no futuro, se aproveitasse este primeiro passo para estudar o comportamento deste elemento noutros meios biológicos, como forma de explicar mas também de complementar os estudos já efectuados.

Como já foi referido nos Resultados, as concentrações elementares de Ni nos controlos não deverão ser consideradas para um estudo comparativo, uma vez que foi detectada uma contaminação nos tubos EppendorfTM onde as amostras se encontravam armazenadas. Foram afectadas cerca de metade das amostras dos indivíduos controlo o que, em termos médios, impossibilita o estudo estatístico deste elemento. Deverão ser analisadas novas alíquotas das amostras contaminadas ou até nova recolha de EBC, que não foi possível realizar durante este trabalho.

O facto do Sb se apresentar muito elevado no material particulado mas não ser significativo no EBC, pode originar alguma controvérsia. Está descrito que a maior parte da dose absorvida é metabolizada em 48h, principalmente em associação com outros elementos como o Pb e o As, permanecendo uma pequena fracção em circulação retida nos eritrócitos. (Bencze, 1994) Este facto pode então indicar uma absorção mais rápida, não permitindo a acumulação nas vias respiratórias durante o mesmo período de tempo que os restantes elementos estudados. Além disso, a dose que não fica retida nos

tecidos é rapidamente excretada por via renal, sendo por isso a urina um bom meio para determinar a exposição a este elemento. (Gerber *et al.*, 1982; Lüdersdorf *et al.*, 1987; Gebel, 1997; McCallum, 2005). Por outro lado, também se pode colocar a hipótese do Sb ficar realmente retido nas vias respiratórias no fluído do revestimento do epitélio pulmonar e/ou por apresentar menor solubilidade na fase aquosa dificultando a sua condensação no EBC.

No que diz respeito ao chumbo, o elemento de maior interesse neste estudo, os seus níveis no EBC revelam uma tendência característica. Como foi descrito nos Resultados, as concentrações aumentam até níveis relativamente estáveis ao longo da semana de trabalho, mas mostram-se mais baixos no primeiro dia do período de trabalho. Este facto opõe-se a métodos de avaliação de exposição a longo prazo, que tendem a ser mais conservativos ao longo do período considerado (semana de trabalho de 5 dias). (*p.e.* Caglieri *et al.*, 2006; Goldoni *et al.*, 2004, 2006; Sheepers *et al.* 2008) Isto pode sugerir uma capacidade de recuperação durante a fase não exposta (período de descanso ou durante a noite) por absorção do Pb dos pulmões para a circulação sistémica.

Os valores considerados como *outliers*, nalguns casos muito mais elevados que os restantes, podem dever-se à contaminação por partículas retidas na boca dos indivíduos, que se depositaram no condensado aquando das recolhas. Alguns trabalhadores foram observados a retirar a máscara de protecção no local de trabalho, expondo-se de forma mais crítica, o que poderá resultar num maior *intake* de Pb para o tracto respiratório, mesmo até imediatamente antes da recolha. Apesar das recomendações, são situações que não podem ser controladas e que deverão ser integradas no estudo. Este facto foi também descrito nas Metodologias e os conhecimentos adquiridos a partir desta situação são particularmente úteis para a optimização dos métodos de recolha e tratamento das amostras.

A variabilidade entre indivíduos também pode ser explicada considerando diferentes tarefas nas instalações fabris, associadas à exposição a diferentes concentrações elementares, diferentes espécies químicas ou até possíveis diferenças no comportamento dos indivíduos no seu local de trabalho. Diferentes propriedades físico-químicas, em termos de valência e solubilidade, podem implicar diferentes propriedades cinéticas e dinâmicas, levando a um comportamento diferente do EBC, quando comparado com a urina, cujos conteúdos variam com a solubilidade das espécies. (Caglieri *et al.*, 2006)

Uma vez que, nos indivíduos expostos considerados, a inalação é a principal via de entrada do Pb, que posteriormente é absorvido pela circulação sistémica, seria de esperar uma correlação positiva entre o Pb no sangue e no EBC, e é exactamente isso que acontece. Esta correlação poderá sugerir que o EBC pode permitir uma estimativa da concentração de Pb no sangue, de forma menos conservativa, bem como a determinação da dose diária de exposição. O EBC tem sido considerado um bioindicador de exposição recente e este facto pode até complementar os resultados obtidos através do estudo de outros meios biológicos. (Mutti & Corradi, 2006)

Além disso, pode haver uma estimativa de um valor limite máximo de Pb ao qual um indivíduo pode estar diariamente exposto, para que não exceda determinada concentração de Pb no sangue. No

entanto, a validação destas hipóteses requer uma monitorização contínua de um número relativamente elevado de indivíduos expostos, de forma controlada, a fim de se obter um razoável grau de confiança. Ainda assim, a força de uma correlação pode estar dependente de outros factores como a solubilidade dos compostos inalados (Kraus *et al.*, 2001; Goldoni *et al.*, 2004), que pode resultar em fracas correlações devido a uma assimilação mais lenta dos elementos pela circulação sistémica, aumentando o tempo de transição do Pb entre o tracto respiratório e o sangue.

Enquanto que o estudo da exposição directa a elementos potencialmente tóxicos é muito importante, as características demográficas e clínicas dos grupos estudados também não devem ser descuradas neste tipo de avaliações, uma vez que permitem analisar as relações entre os vários elementos e os potenciais factores de risco. No caso deste trabalho, apenas foi considerado um possível factor de risco (hábitos tabágicos) que, apesar de apresentar diferenças a nível de concentração elementar de Pb entre os indivíduos fumadores e não fumadores, não se apresentou estatisticamente significativa.

O conhecimento da absorção de metais pesados, nomeadamente o Pb, pelas vias respiratórias ainda é reduzido. Geralmente os estudos que englobam estes elementos são feitos com base na absorção através da ingestão, talvez por parecer ter resultados mais imediatos e/ou com mais riscos para a saúde humana. No entanto, as consequências directas para o aparelho respiratório, e mesmo em termos de dose a que o indivíduo este exposto, têm sido pouco estudadas.

Os elementos analisados poderão ser estudados em maior detalhe através da metodologia desenvolvida neste trabalho, mas com outro tipo de compromisso com as instalações fabris a avaliar. Um estudo abrangente que permitisse avaliar os elementos mais importantes em determinadas indústrias poderia ser constituído por recolha de EBC mas também por análises à urina e ao sangue, uma vez que para o presente trabalho só foram facultados valores de concentrações sanguíneas de chumbo. No entanto, uma avaliação mais alargada implica uma maior disponibilidade dos trabalhadores voluntários, mas também da entidade empregadora, que veria o seu processo de produção parcialmente interrompido durante um período mais longo de tempo. Todos estes aspectos devem ser ponderados e discutidos para que se chegue a um compromisso entre ambas as partes – uma avaliação correcta minimizando o distúrbio da laboração e dos trabalhadores em causa.

O desenvolvimento e validação de uma metodologia adequada à recolha, armazenamento e análise das amostras de EBC foi uma parte fundamental deste estudo, revelando-se este trabalho preliminar de extrema importância. As dificuldades encontradas, no que respeita às contaminações, devido aos níveis ultra-vestigiais da gama de concentrações estudada, aos procedimentos de optimização das técnicas analíticas, e à avaliação das características da matriz do EBC permitiram uma visão aprofundada e global das metodologias e de como as maiores fontes de variabilidade poderão ser mitigadas.

Todos os aspectos anteriormente descritos permitem enfatizar a importância da toxicologia ocupacional, neste caso referente à exposição a metais pesados e à utilização do condensado do ar exalado como um bioindicador viável e muito promissor neste tipo de estudos.

6 | Referências

- Adamis PDB, Panek AD, Leite SGF, Eleutherio ECA. 2003. Factors involved with cadmium absorption by a wild-type strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Braz J Microbiol* 34(1):55-60.
- Aitio A. 2006. Guidance values for the biomonitoring of occupational exposure. State of the art. *Med Lav* 97(2):324-331.
- Ahluwalia SS, Goyal D. 2007. Microbial and plant derived biomass for removal of heavy metals from wastewater. *Bioresour Technol* 98(12):2243-2257.
- Albertini R, Bird M, Doerrer N, Needham L, Robinson S, Sheldon L, Zenick H. 2006. The use of biomonitoring data in exposure and human health risk assessments. *Environ Health Perspect* 114(11):1755-1762.
- Alexander NM. 1994. Iron In: Seiler HG, Sigel A, Sigel H, editors. *Handbook on Metals in clinical and analytical chemistry*. New York: Marcel Dekker Inc. p 411-421.
- Almeida SM, Farinha MM, Ventura MG, Pio CA, Freitas MC, Reis MA, Trancoso MA. 2007. Measuring air particulate matter in large urban areas for health effect assessment. *Water Air Soil Pollut* 179:43-55.
- Amorim LCA. 2003. Biomarkers for evaluating exposure to chemical agents present in the environment. *Rev Bras Epidemiol* 6(2):158-170.
- Amorim LCA, Cardeal ZL. 2007. Breath air analysis and its use as a biomarker in biological monitoring of occupational and environmental exposure to chemical agents. *J Chromatogr B* 853:1-9.
- Angerer J, Ewers U, Wilhelm M. 2007. Human biomonitoring: State of the art. *Int J Hyg Environ Health* 210:201-228.
- Antczak A, Gorski P. Markers of pulmonary diseases in exhaled breath condensate. *Int J Occup Med Environ Health* 2002; 15: 317-323.
- Antonini JM, Leonard SS, Roberts JR, Solano-Lopez C, Young S-H, Xianglin Shi, Taylor MD. 2005. Effect of stainless steel manual metal arc welding fume on free radical production, DNA damage, and apoptosis induction. *Mol Cell Biochem* 279:17-23.
- Apostoli P. 2002. Elements in environmental and occupational medicine. *J Chromatogr B* 778:63-97.
- ATSDR, 2000. Final Report of Toxicological Profile for Chromium. NTIS Accession No. PB2000-108022. Agency for Toxic substances and Disease Registry, Atlanta, GA. pp461.
- Barbosa F, Tanus-Santos JE, Gerlach RF, Parsons PJ. 2005. A Critical Review of Biomarkers Used for Monitoring Human Exposure to Lead: Advantages, Limitations, and Future Needs. *Environ Health Perspect* 113(12):1669-1674.

- Barnes JE, Kanapilly GM, Newton GJ. 1976. Cobalt-60 Oxide Aerosols: methods of production and short-term retention and distribution kinetics in the beagle dog. *Health Phys* 30(5):391-398.
- Barreiros MA. 2003. Total Reflection X-Ray Fluorescence for chemical analysis: an approach to Quality Assurance. Ph.D. Thesis. Portugal: Universidade Nova de Lisboa (em Português) pp146.
- Barry PSI. 1975. A comparison of concentrations of lead in human tissues. *Br J Ind Med* 32:119-139.
- Barton JC, Conrad ME, Holland R. 1981. Iron, lead, and cobalt absorption: similarities and dissimilarities. *Proc Soc Exp Biol Med* 166(1):64-69.
- Beckman KB, Ames BN. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78(2):547-581.
- Bellinger DC. 2005. Teratogen Update: Lead and Pregnancy. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 73:409-420.
- Bencze K. 1994. Antimony In: Seiler HG, Sigel A, Sigel H, editors. *Handbook on Metals in clinical and analytical chemistry*. New York: Marcel Dekker Inc. p 227-236.
- Benko V, Ciket M. 1984. Manganese: A review of occupational and environmental toxicology. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 28:139-148.
- Bidstrup PL. 1972. Clinical symptoms of mercury poisoning in man. *Biochem J* 130:59-61.
- Bond EL. 2005. The Significance of Zinc in Antioxidant Processes. *J Free Radic Biol Med* 1-10.
- Boogaard PJ. 2007. Human biomonitoring activities – Programmes by industry. *Int J Hyg Environ Health* 210:259-261.
- Broding HC, Michalke B, Göen T, Drexler H. 2009. Comparison between exhaled breath condensate analysis as a marker for cobalt and tungsten exposure and biomonitoring in workers of a hard metal alloy processing plant. *Int Arch Occup Environ Health* 82:565-573.
- Brodkin E, Copes R, Mattman A, Kennedy J, Kling R, Yassi A. 2007. Lead and mercury exposures: interpretation and action. *Can Med Assoc J* 176(1):59-63.
- Caglieri A, Goldoni M, Acampa O, Andreoli R, Vettori MV, Corradi M, Apostoli P, Mutti A. 2006. The Effect of Inhaled Chromium on Different Exhaled Breath Condensate Biomarkers among Chrome-Plating Workers. *Environ Health Perspect* 114(4):542-546.
- Cao W, Duan Y. 2006. Breath Analysis: Potential for Clinical Diagnosis and Exposure Assessment. *Clin Chem* 52(5):800-811.
- Cáp P, Dryahina K, Pehal F, Spanel P. 2008. Selected ion flow tube mass spectrometry of exhaled breath condensate headspace. *Rapid Commun Mass Spectrom* 22:2844-2850.

- Chan HP, Lewis C, Thomas PS. 2008. Exhaled breath analysis: Novel approach for early detection of lung cancer. *Lung Cancer*.
- Cherian MG, Hursh JB, Clarkson TW, Allen J. 1978. Radioactive mercury distribution in biological fluids and excretion in human subjects after inhalation of mercury vapor. *Arch Environ Health* 33:109-114.
- Chia KS, Ong CN, Ong HY, Endo G. 1989. Renal tubular function of workers exposed to low levels of cadmium. *Br J Ind Med* 46:165-170.
- Christensen JM. 1995. Human exposure to toxic metals: factors influencing interpretation of biomonitoring results. *Sci Total Environ* 166:89-135.
- Christensen JM, Kristiansen J. 1994. Lead. In: Seiler HG, Sigel A, Sigel H, editors. *Handbook on Metals in clinical and analytical chemistry*. New York: Marcel Dekker Inc. 425-440.
- Christensen OB, Lagesson V. 1981. Nickel concentration of blood and urine after oral administration. *Ann Clin Lab Sci* 11:119-125.
- Clarkson TW. 1972. The pharmacology of mercury compounds. *Annu Rev Pharmacol* 12:375-406.
- Clarkson TW, Friberg L, Hursh JB, Nylander M. 1988. The prediction of intake of mercury vapor from amalgams. In: Clarkson TW, Friberg L, Norberg GF, Sager P, editors. *Biological Monitoring of Metals*, New York: Plenum Press p 247-264.
- Corradi M, Mutti A. 2005. Exhaled Breath Analysis: from Occupational to Respiratory Medicine. *Acta Biomed* S2:20-29.
- Crerar DA, Cormick RK, Barnes HL. 1980. Geochemistry of manganese: an overview. In: Varentsov I, editor. *Geology and Geochemistry of Manganese*. Hungarian Academy of Sciences p 293-334.
- Crist KC, Liu B, Kim M, Deshpande SR, John K. 2008. Characterization of fine particulate matter in Ohio: Indoor, outdoor, and personal exposures. *Environ Res* 106:62-71.
- De Flora S. 2000. Threshold mechanisms and site specificity in chromium(VI) carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21:533-541.
- Deng Z, Dailey LA, Soukup J, Stonehuerner J, Richards JD, Callaghan KD, Yang F, Ghio AJ. 2009. Zinc transport by respiratory epithelial cells and interaction with iron homeostasis. *Biometals* 22:803-815.
- Do R, Bartlett KH, Dimich-Ward H, Chu W, Kennedy SM. 2008. Biomarkers of Airway Acidity and Oxidative Stress in Exhaled Breath Condensate from Grain Workers. *Am J Respir Crit Care Med* 178:1048-1054.

- Domingo JL, Schuhmacher M, Agramunt MC, Müller L, Neugebauer F. 2001. Levels of metals and organic substances in blood and urine of workers at a new hazardous waste incinerator. *Int Arch Occup Environ Health* 74:263-269.
- Drasch G, Schupp I, Riedl G. 1992. Einfluss von Amalgamfüllungen auf die Quecksilberkonzentration in menschlichen Organen. *Dtsch Zahnärztl Z* 47:490-496.
- Effros RM, Dunning MB, Biller J, Shaker R. 2004. The promise and perils of exhaled breath condensates. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287:1073-1080.
- Elinder CG, Gerhardsson L, Oberdoerster. 1988. In: Clarkson TW, Friberg L, Nordberg GF, Sager P, editors. *Biological Monitoring of Metals*. Plenum Press, New York.
- Epton MJ, Dawson RD, Brooks WM, Kingham S, Aberkane T, Cavanagh JAE, Frampton CM, Hewitt T, Cook, JM, McLeod S, McCartin F, Trought K, Brown L. 2008. The effect of ambient air pollution on respiratory health of school children: a panel study. *Environ Health* 7:16.
- Fasim F, Ahmed N, Parsons R, Gadd GM. 2002. Solubilization of zinc salts by a bacterium isolated from the air environment of a tannery. *FEMS Microbiol Lett* 213(1):1-6.
- Fay M, Mumtaz MM. 1996. Development of a priority list of chemical mixtures occurring at 118 hazardous waste sites using the Hazdat database. *Food Chem Toxicol* 34:1163-1165.
- Fireman E, Lerman Y, Stark M, Schwartz Y, Ganor E, Grinberg N, Frimer R, Landau DA, Zilberberg M, Barenboim E, Jacovovitz R. 2008. Detection of Occult Lung Impairment in Welders by Induced Sputum Particles and Breath Oxidation. *Am J Ind Med* 51:503-511.
- Fisher GL. 1975. Function and homeostasis of copper and zinc in mammals. *Sci Total Environ* 4(4):373-412.
- Fromme H, Diemer J, Dietrich S, Cyrys J, Heinrich J, Lang W, Kiranoglu M, Twardella D. 2008. Chemical and morphological properties of particulate matter (PM10, PM2.5) in school classrooms and outdoor air. *Atmos Environ* 42: 6597-6605.
- Gebel T. 1997. Arsenic and antimony: comparative approach on mechanistic toxicology. *Chem Biol Interact* 107: 131-144.
- Gerber GB, Maes J, Eykens B. 1982. Transfer of Antimony and Arsenic to the Developing Organism. *Arch Toxicol* 49:159-168.
- Gergelova P, Corradi M, Acampa O, Goldoni M, Mutti A, Franchini I, Marcinkova D, Rusnak M. 2008. New techniques for assessment of occupational respiratory diseases. *Bratisl Lek Listy* 109(10): 445-452.

- Ghio AJ, Turi JL, Yang F, Garrick LM, Garrick MD. 2006. Iron homeostasis in the lung. *Biol Res* 39: 67-77.
- Gidlow DA. 2004. Lead toxicity. *Occup Med* 54: 76-81.
- Gilfillan SC. 1965. Lead poisoning and the fall of Rome. *J Occup Med* 7: 53-60.
- Goldoni M, Caglieri A, Corradi M, Poli D, Rusca M, Carbognani P, Mutti A. Chromium in exhaled breath condensate and pulmonary tissue of non-small cell lung cancer patients. *Int Arch Occup Environ Health* 2008; 81: 487-493.
- Goldoni M, Caglieri A, Poli D, Vettori MV, Corradi M, Apostoli P, Mutti A. Determination of hexavalent chromium in exhaled breath condensate and environmental air among chrome plating workers. *Anal Chim Acta* 2006; 562: 229-235.
- Goldoni M, Catalani S, Palma G, Manini P, Acampa O, Coradi M, Bergonzi R, Apostoli P, Mutti A. 2004. Exhaled Breath Condensate as a Suitable Matrix to Assess Lung Dose and Effects in Workers Exposed to Cobalt and Tungsten. *Environ Health Perspect* 112 (13): 1293-1298.
- Gomes VE, de Sousa MLR, Barbosa F Jr, Krug FJ, Saraiva MJCP, Cury A, Gerlach RF. 2004. In vivo studies on lead content of deciduous teeth superficial enamel of preschool children. *Sci Total Environ* 320:25-35.
- Gutteridge JM, Mumby S, Quinlan GJ, Chung KF, Evans TW. 1996. Pro-oxidant iron is present in human pulmonary epithelial lining fluid: implications for oxidative stress in the lung. *Biochem Biophys Res Commun* 220:1024-1027.
- Guyton AC. 1988. *Fisiologia Humana*. Guanabara Koogan 6ª Edição. Pp 334-393.
- Hac E, Krzyzanowski M, Krechniak J. 2000. Total mercury in human renal cortex, liver, cerebellum and hair. *Sci Total Environ* 248:37-43.
- Hartwig A. 2000. Recent advances in metal carcinogenicity. *Pure Appl Chem* 72: 1007-1014.
- Herber RFM. 1994. Cadmium In: Seiler HG, Sigel A, Sigel H, editors. *Handbook on Metals in clinical and analytical chemistry*. New York: Marcel Dekker Inc. 283-297.
- Herber RFM, Verschoor MA, Wibowo AA. 1988. Cadmium In: Stoeppler M, Piscator M, editors. *Environmental Toxin Series 2*. Berlin: Springer-Verlag 115-133.
- Hernberg S. 2000. Lead Poisoning in a Historical Perspective. *Am J Ind Med* 38: 244-254.
- Herold DA, Fitzgerald RL. 1994. Chromium In: Seiler HG, Sigel A, Sigel H, editors. *Handbook on Metals in clinical and analytical chemistry*. New York: Marcel Dekker Inc. 321-332.

- Ho YS, Huang C T, Huang HW. 2002. Equilibrium sorption isotherm for metal ions on tree fern. *Process Biochem* 37(12): 1421-1430.
- Hoffmeyer F, Harth V, Merget R, Goldscheid N, Hainze E, Degens P, Pesch B, Bünger J, Brüning T, Raulf-Heimsoth M., Exhaled breath condensate analysis: evaluation of a methodological setting for epidemiological field studies. *J Physiol Pharmacol*. 2007 Nov; 58 Suppl 5(Pt 1): 289-98.
- Hopke PK, Xie Y, Raunemaa T, Biegalski S, Landsberger S, Maenhaut W, Artaxo P, Cohen D. 1997. Characterization of the Gent Stacked Filter Unit PM10 Sampler. *Aerosol Science and Technology* 27(6):726-735.
- Horvath I, Hunt J, Barnes PJ. 2005. Exhaled Breath Condensate: methodological recommendations and unresolved questions. *Eur Respir J* 26:523–548.
- Hunt J. 2002. Exhaled breath condensate: An evolving tool for noninvasive evaluation of lung disease. *J Allergy Clin Immunol* 110 (1): 28-34.
- Hursh JB, Clarkson TW, Cherian MG, Vostal JV, Mallie RV. 1976. Clearance of mercury (197Hg, 203Hg) vapor inhaled by human subjects. *Arch Environ Health* 31: 302-309.
- Hursh JB, Greenwood MR, Clarkson TW, Allen J, Demuth S. 1980. The effect of ethanol on the fate of mercury vapor inhaled by man. *J Pharmacol Exp Ther* 214: 520–527.
- Iavicoli I, Bocca B, Carelli G, Caroli S, Caimi S, Alimonti A, Fontana L. 2007. Biomonitoring of tram drivers exposed to airborne platinum, rhodium and palladium. *Int Arch Occup Environ Health* 81:109-114.
- International Agency for Research on Cancer. 1980. Some Metals and Metallic Compounds. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 23.
- International Agency for Research on Cancer. 2003. Lists of IARC Evaluations. IARC Scientific Publications.
- International Agency for Research on Cancer. 2006. Inorganic and Organic Lead Compounds. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Vol 87.
- International Union of Pure and Applied Chemistry. 2004. Glossary of terms used in toxicokinetics (IUPAC Recommendations 2003). *Pure Appl Chem* 76: 1033-1082.
- Ishinishi N, Tsuchiya K, Vahter M, Fowler BA. 1986. Arsenic In: Friberg L, Nordberg GF, Vouk V, editors. *Handbook of the Toxicology of Metals*. 2nd Ed Amsterdam: Elsevier 2: 43-83.
- Iyengar GV, Subramanian KS, Woittiez RW. 1998. Element analysis of biological samples. Principles and practice. CRC Press, Boca Raton, FL, 204–207.

- Jacob S, Francone C, Lossow W. 1990. Anatomia e Fisiologia Humana. Guanabara 5ª Ed pp377-404.
- Janssen NAH, van Vliet PHN, Aarts F, Harssema H, Brunekreef B. 2001. Assessment of exposure to traffic related air pollution of children attending schools near motorways. *Atmos Environ* 35: 3875-3884.
- Järup L. 2003. Hazards of heavy metal contamination. *Br Med Bull* 68: 167–182.
- Kasprzak KS. 1991. The role of oxidative damage in metal carcinogenicity. *Chem Res Toxicol* 4:604-615.
- Kazantzis G. 1981. Role of cobalt, iron, lead, manganese, mercury, platinum, selenium and titanium in carcinogenesis. *Environ Health Perspect* 40:143-161.
- Kazantzis G, Lilly L. 1986. Mutagenic and carcinogenic effects of metals In: Friberg L, Nordberg GF, Vouk V, editors. *Handbook of the Toxicology of Metals*. 2nd Ed Amsterdam: Elsevier 1: 319-390.
- Kershaw TG, Clarkson TW, Dhahir PH. 1980. The relationship between blood levels and dose of methylmercury in man. *Arch Environ Health* 35: 28-36.
- Kharitonov SA, Barnes PJ. 2001. Exhaled Markers of Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med* 163 : 1693–1722.
- Kraus T, Schramel P, Schaller KH, Zobebelein P, Weber A, Angerer J. 2001. Exposure assessment in the hard metal manufacturing industry with special regard to tungsten and its compounds. *Occup Environ Med* 58: 631–634.
- Kruse-Jarres JD. 1989. The significance of zinc for humoral and cellular immunity. *J Trace Elem Electrolytes Health Dis* 3(1):1-8.
- Leboulanger J. 1977. *in* Les vitamines, biochimie, mode d'action et intérêt thérapeutique. Produits Roche S.A.. Ed. SIF.
- Lee SC, Chang M. 2000. Indoor and outdoor air quality investigation at schools in Hong Kong. *Chemosphere* 41: 109-113.
- Lemiere C. 2002. Non-invasive assessment of airway inflammation in occupational lung diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2:109–114.
- Liidersdorf R, Fuchs A, Mayer P, Skulsuksai G, Schiickel G. 1987. Biological assessment of exposure to antimony and lead in the glass-producing industry. *Int Arch Occup Environ Health* 59:469-474.
- Mahoney JP, Small WJ. 1968. Studies on manganese III: the biological half-life of radiomanganese in man and factors which affect this half-life. *Journal of Clinical Investigation* 46: 643-653

- Mallinckrodt MG, Meissner D. 1994. General Aspects of the Role of Metals in Clinical Chemistry. In: Seiler HG, Sigel A, Sigel H, editors. Handbook on Metals in clinical and analytical chemistry. New York: Marcel Dekker Inc. p 13-29.
- Markert B. 2007. Definitions and principles for bioindication and biomonitoring of trace metals in the environment. *J Trace Elem Med Biol* 21(S1):77-82.
- McCallum RI. 2005. Occupational exposure to antimony compounds. *J Environ Monit* 7 1245-1250.
- McNeely MD, Nechay MW, Sunderman FWJr. 1972. Measurements of nickel in serum and urine as indices of environmental exposure to nickel. *Clin Chem* 18:992-995.
- Menezes MABC, Sabino CVS, Franco MB, Maia ECP, Albinati CCB. 2004. Assessment of Workers' Contamination Caused by Air Pollution Exposure in Industry Using Biomonitoring. *J Atmos Chem* 49: 403-414.
- Merck Index. 1989. 11th Merck. Rahway N.J. 379-380
- Mishra KP, Chauhan UK, Naik S. 2006. Effect of lead exposure on serum immunoglobulins and reactive nitrogen and oxygen intermediate. *Hum Exp Toxicol* 25:661- 665.
- Molnár P, Bellander T, Sällsten G, Boman J. 2007. Indoor and outdoor concentrations of PM_{2.5} trace elements at homes, preschools and schools in Stockholm, Sweden. *J Environ Monit* 9: 348–357.
- Montaser A. 1998. Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. New York: John Wiley & Sons, Inc 964p.
- Muller WG, Morini F, Eaton S, Peters M, Jaffe A. 2006. Safety and feasibility of exhaled breath condensate collection in ventilated infants and children. *Eur Respir J* 28:479–485.
- Mutti A, Corradi M. 2006. Recent developments in human biomonitoring: non-invasive assessment of target tissue dose and effects of pneumotoxic metals. *Med Lav* 97(2):199–206.
- Mutlu GM, Garey KW, Robbins RA, Danziger LH, Rubinstein I. Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 731-737.
- National Research Council. 2001. Arsenic in Drinking Water. National Academy Press; Washington, DC.
- Nelms SN. 2005. ICP Mass Spectrometry Handbook. Oxford: Blackwell Publishing Ltd. 485p.
- Neve J, Peretz A. 1988. Importance nutritionnelle et physiopathologie du zinc chez l'homme. *J Pharm Belg* 43: 466–477.

- Nordberg G, Nordberg M. 1988. Biological monitoring of cadmium In: Clarkson TW, Friberg L, Nordberg GF, Sager PR, editors. Biological monitoring of toxic metals. Rochester Series on Environmental Toxicity. New York: Plenum Press 151-168.
- Norseth E, Cecutti AG. 1979. Nickel In: Hutchinson TC, editor. Natural Science and Engineering Research Council. Ottawa, Canada.
- Norseth T. 1988. Metal carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 534: 377-386.
- Nylander M, Friberg L, Eggleston D, Björkman L. 1989. Mercury accumulation in tissues from dental staff and controls in relation to exposure. *Swed Dent J* 13:235-243.
- Nylander M, Friberg L, Lind B. 1987. Mercury concentrations in the human brain and kidneys in relation to exposure from dental amalgam fillings. *Swed Dent J* 11: 179-187.
- O'Flaherty EJ, Kerger BD, Hays SM, Paustenbach DJ. 2001. A physiologically based model for the ingestion of chromium(III) and chromium(VI) by humans. *J Toxicol Sci* 60:196–213.
- Paustenbach D, Galbraith D. 2006. Biomonitoring and biomarkers: Exposure Assessment Will Never Be the Same. *Environ Health Perspect* 114(8): 1143-1149.
- Peters JM, Thomas D, Falk H, Oberdorster G, Smith TJ. 1986. Contribution of metals to respiratory cancer. *Environ Health Perspect* 70: 71-83.
- Petersen R, Thomsen JF, Jørgensen NK, Mikkelsen S. 2000. Half life of chromium in serum and urine in a former plasma cutter of stainless steel. *Occup Environ Med* 57:140-142.
- Prange A, Schwenke H. 1992. Trace Element Analysis Using Total-Reflection X-Ray Fluorescence Spectrometry. *Advances in X-Ray Analysis* 35B: 899-923
- Rabinowitz MB. 1991. Toxicokinetics of bone lead. *Environ Health Perspect* 91:33–37.
- Raithel HJ, Schaller KH, Mohrmann W, Mayer P, Henkels Z. 1982. Untersuchungen zur Ausscheidungs kinetic von Nickel bei Beschäftigten in der Glas und Galvanischen Industrie In: Fliedner TM, editor. Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Arbeitsmedizin. Stuttgart: Gentner Verlag 223-228.
- Reeves AL. 1986. Beryllium In: Friberg L, Nordberg GF, Vouk V, editors. Handbook of the Toxicology of Metals. 2nd Ed Amsterdam: Elsevier 2: 95-116.
- Sarkar B. 1980. Nickel in blood and kidney In: Brown SS, Sunderman FW, editors. Nickel Toxicology. London: Academic Press 81-84.
- Schaller K-H, Raithel H-J, Angerer J. 1994. Nickel In: Seiler HG, Sigel A, Sigel H, editors. Handbook on Metals in clinical and analytical chemistry. New York: Marcel Dekker Inc. 505-518.

- Scheepers PT, Heussen GA, Peer PG, Verbist K, Anzion R, Willems J. 2008. Characterisation of exposure to total and hexavalent chromium of welders using biological monitoring. *Toxicol Lett* 178: 185-190.
- Scheideler L, Manke HG, Schwulera U, Inacker O, Hammerle H. 1993. Detection of nonvolatile macromolecules in breath – a possible diagnostic tool. *Am Rev Respir Dis* 148(3): 778-784.
- Sheng PX, Ting YP, Chen JP, Hong L. 2004. Sorption of lead, copper, cadmium, zinc, and nickel by marine algal biomass: characterization of biosorptive capacity and investigation of mechanisms, *J Colloid Interface Sci* 275(1): 131-141.
- Sherlock JC, Hislop J, Newton D, Topping G, Whittle K. 1984. Elevation of mercury in human blood from controlled chronic ingestion of methylmercury in fish. *Hum Toxicol* 3: 117-131.
- Schramel P, Wendler I, Angerer J. 1997. The determination of metals (antimony, bismuth, lead, cadmium, mercury, palladium, platinum, tellurium, thallium, tin and tungsten) in urine samples by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Int Arch Occup Environ Health* 69: 219-223.
- Scheepers PT, Heussen GA, Peer PG, Verbist K, Anzion R, Willems J. Characterisation of exposure to total and hexavalent chromium of welders using biological monitoring. *Toxicol Lett* 2008; 178: 185-190.
- Sidorenko GI, Zborovskii EI, Levina DI. 1980. Surface-active properties of the exhaled air condensate (a new method of studying lung function). *Ter Arkh* 52: 65-68.
- Skoog DA, West DM, Holler FJ. 2004. *Fundamentals of Analytical Chemistry*. 8th Ed. Brooks/Cole 1168p.
- Smith T, Edmonds CJ, Barnaby CF. 1972. Absorption and retention of cobalt in man by whole-body counting. *Health Physics* 22 (4): 359-367.
- Stohs SJ, Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med* 18: 321–336.
- Stoleski S, Karadzinska-Bislimovska J, Stikova E, Risteska-Kuc S, Mijakoski D, Minov J. 2008. Adverse effects in Workers Exposed to Inorganic Lead. *Arh Hig Rada Toksikol* 59:19-29.
- Stranger M, Potgieter-Vermaak SS, Van Grieken R. 2007. Comparative overview of indoor air quality in Antwerp, Belgium. *Environ Int* 33: 789-797.
- Sunderman FWJr. 1978. Carcinogenic effects of metals. *Federal Procedures* 37: 40-46.
- Sunderman FWJr. 1984. Recent advances in metal carcinogenesis. *Ann Clin Lab Sci* 14: 93-122.

- Sze KF, Lu YJ, Wong PK. 1996. Removal and recovery of copper ion (Cu^{2+}) from electroplating effluent by a bioreactor containing magnetite-immobilized cells of *Pseudomonas putida* 5X. *Resour Conserv Recyc* 18(1-4): 175-193.
- Szoboszlai N, Polgari Z, Mihucz VG, Zaray G. 2009. Recent trends in total reflection X-ray fluorescence spectrometry for biological applications. *Anal Chim Acta* 633:1-8.
- Tailor A, Marks V. 1978. Cobalt: a Review. *J Hum Nutr* 32: 165-177.
- Tanaka I, Ishimatsu S, Haratake J, Horie A, Kodama Y. 1988. Biological half-time in rats exposed to nickel monosulfide (amorphous) aerosol by inhalation. *Biol Trace Elem Res* 17: 237-246.
- Tanaka I, Ishimatsu S, Matsuno K, Kodama Y, Tsuchiya K. 1985. Biological half time of deposited nickel oxide aerosol in rat lung by inhalation. *Biol Trace Elem Res* 8: 203-210.
- Taylor HE. 2001. *Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry: Practices and Techniques*. San Diego: Academic Press 294p.
- Templeton DM. 1994. Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES) and Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS). In: Seiler HG, Sigel A, Sigel H, editors. *Handbook on Metals in clinical and analytical chemistry*. New York: Marcel Dekker Inc. p 13-29.
- Thomas R. 2004. *Practical Guide to ICP-MS*. New York: Marcel Dekker, Inc. 324p.
- Thunus L, Lejeune R. 1994. Zinc. In: Seiler HG, Sigel A, Sigel H, editors. *Handbook on Metals in clinical and analytical chemistry*. New York: Marcel Dekker Inc. p 667-674.
- Tong S, Schirnding YE, Prapamontol T. 2000. Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. *Bull World Health Organ* 78 (9) – 1068-1077.
- Toscano CD, Guilarte TR. 2005. Lead neurotoxicity: From exposure to molecular effects. *Brain Res Rev* 49 529–554.
- Tossavainen A, Nurminen M, Mutanen P, Tola S. 1980. Application of mathematical modelling for assessing the biological half-times of chromium and nickel in field studies. *Br J Ind Med* 37: 285-291.
- Tsuchiya K. 1986. Lead In: Friberg L, Nordberg GF, Vouk V, editors. *Handbook of the Toxicology of Metals*. 2nd Ed Amsterdam: Elsevier 2: 298-340.
- Tufvesson E, Bjermer L. 2006. Methodological improvements for measuring eicosanoids and cytokines in exhaled breath condensate. *Respir Med* 100: 34–38.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. 2006. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160: 1-40.

- Valls M, de Lorenzo V. 2002. Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution. *FEMS Microbiol Rev* 26(4) 327-338.
- Van Espen P, Janssens K, Nobels J. 1986. AXIL-PC: software for the analysis of complex X-ray spectra. *Chemo Intell Lab Sys* 1(1):109-114.
- Varga Imre, Szebeni A, Szoboszlai N, Kovács B. 2005. Determination of trace elements in human liver biopsy samples by ICP-MS and TXRF: hepatic steatosis and nickel accumulation. *Anal Bioanal Chem* 383: 476-482.
- Viau C. 2005. Biomonitoring in occupational health: Scientific, socio-ethical, and regulatory issues. *Toxicol Appl Pharmacol* 207: S347-S353.
- Volesky B. 2001. Detoxification of metal-bearing effluents: biosorption for the next century. *Hydrometallurgy* 59(2-3): 203-216.
- Volesky B, Holan ZR. 1995. Biosorption of Heavy-Metals. *Biotechnol Prog* 11(3): 235-250.
- Waalkes MP, Coogan TP, Barter RA. 1992. Toxicological principles of metal carcinogenesis with special emphasis on cadmium. *Crit Rev Toxicol* 22: 175-201.
- Waalkes MP, Oberdorster G. 1990. Cadmium carcinogenesis In: Foulkes EC, editor. *Biological Effects of Heavy Metals. Metal Carcinogenesis*. Boca Raton FL: CRC Press Vol. 2: 129-158.
- Wasowicz W, Gromadzińska J, Rydzyński K. 2001. Blood concentration of essential trace elements and heavy metals in workers exposed to lead and cadmium. *Int J Occup Med Environ Health* 14: 223-229.
- Wehner AP, Craig DK. 1972. Toxicology of inhaled NiO and CoO in Syrian Golden Hamsters. *Am Ind Hyg Assoc J* 33(3): 146-155.
- Weinzierl SM, Webb M. 1972. Interaction of carcinogenic metals with tissue and body fluids. *Br J Cancer* 26: 279-291.
- Wobruschek P. 2007. Total reflection x-ray fluorescence analysis – a review. *X-Ray Spectrom* 36: 289-300.
- World Health Organization (WHO). 1979. *Early Detection of Health Impairment in Occupational Exposure to Health Hazard Report, Meet Metals 3*. World Health Organization, Geneva.
- World Health Organization (WHO). 1990. *Environmental Health Criteria 101, Methylmercury*. World Health Organization, Geneva.
- World Health Organization (WHO). 1991. *Environmental Health Criteria, 118 - Inorganic Mercury*. World Health Organization, Geneva. 172pp.

World Health Organization (WHO). 1992. Environmental Health Criteria 134, Cadmium. World Health Organization, Geneva. pp 17-35.

Yoshioka N, Nakashima H, Hosoda K, Eitaki Y, Shimada N, Omae K. 2008. Urinary excretion of an oxidative stress marker, 8-hydroxyguanine (8-OH-Gua), among Nickel-Cadmium battery workers. *J Occup Health* 50: 229-35.

Zouboulis AI, Loukidou MX, Matis KA. 2004. Biosorption of toxic metals from aqueous solutions by bacteria strains isolated from metal polluted soils. *Process Biochem* 39(8): 909-916.

7 | Anexos

Anexo I



Certificate of Analysis

CertiPUR® Reference Material

Antimony ICP Standard 1000 mg/l Sb CertiPUR®

1.70302.0100

Lot No.: HC935733

This Certificate of Analysis is based on the data from the Merck Calibration Laboratory for ICP-OES, according to DIN EN ISO / IEC 17025. Accredited by the DKD (Deutscher Kalibrierdienst).

DAR Reg.-No.: DKD-K-14302
Ref. Calibration Certificate: 341 DKD-K-14302/09-03

Composition: Antimony oxide in hydrochloric acid solution, 7%

Assay: 968 mg/kg
1000 mg/l (calculated) **JES**

Measurement Uncertainty: ± 4 mg/kg (± 0,4%)
This value represents the expanded uncertainty (*U*) for a coverage probability of 95%. Refer to page 2 for further details.

Traceability: This ICP Standard has been measured in comparison to the corresponding reference material.

Trace impurities µg/ml:

Ag <0.02	Cr <0.05	In <0.02	Ni <0.02	Sb *	Tl <0.02
Al <0.05	Cu <0.02	Ir <0.02	Os <0.20	Sc <0.02	Tm <0.02
As <0.30	Dy <0.02	K <0.20	P <0.60	Se <0.20	U <0.02
Au <0.02	Er <0.02	La <0.05	Pb <0.20	Si <0.20	V <0.02
B <0.05	Eu <0.02	Li <0.02	Pd <0.02	Sm <0.02	W <0.05
Ba <0.02	Fe <0.05	Lu <0.02	Pr <0.02	Sn <0.02	Y <0.02
Be <0.02	Ga <0.02	Mg <0.02	Pt <0.02	Sr <0.02	Yb <0.02
Bi <0.20	Gd <0.02	Mn <0.02	Rb <0.02	Ta <0.05	Zn <0.02
Ca <0.20	Ge <0.02	Mo <0.02	Re <0.02	Tb <0.02	Zr <0.02
Cd <0.02	Hf <0.02	Na <0.10	Rh <0.02	Te <0.20	
Ce <0.02	Hg <0.02	Nb <0.05	Ru <0.02	Th <0.02	
Co <0.02	Ho <0.02	Nd <0.02	S <0.50	Ti <0.05	

Date of release: 2009-03-24

Minimum shelf life: 2012-03-31

A. Yildirim

Dipl.Ing.Ayfer Yildirim
(responsible laboratory manager quality control)

Accreditation:

The DKD (Deutscher Kalibrierdienst) is signatory to the multilateral agreement of the EA (European co-operation for Accreditation) and of the ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperation) for the mutual recognition of calibration certificates.

Uncertainty:

The uncertainty in the certified value is calculated in accordance to GUM and EA-4/02 as $U = k \cdot u_c$ where $k=2$ is the coverage factor for a 95% coverage probability and u_c is obtained from the standard uncertainty. U is the expanded uncertainty which includes the contribution of the primary reference material, temperature, and other contributions of the measuring system.

Preparation:

This standard is a single element solution that was prepared gravimetrically from high purity antimony oxide which has been dissolved in hydrochloric acid Suprapur[®] and diluted with filtered (0.22µm) high purity water (18MΩ).

All balances are regularly calibrated according to NIST and PTB standards. The density of the solution is 1.034 g/cm³ (at $T=20^{\circ}\text{C}$).

Homogeneity:

Analysing a representative number of systematically chosen sample units performs the assessment of homogeneity. This assessment procedure is documented and conducted in accordance to the quality management system.

Stability:

The property values are measured periodically under known conditions for analytical method and storage. The gained experiences are the basis for the quantification of the suitable shelf life of this ICP standard for the unopened container.

The user should be aware of the additional effect of transpiration losses of solvent through the container walls of the unopened container in the range of +0.15% per year.

Application and correct use:

This solution is intended for use as a calibration standard for inductively coupled plasma spectroscopy (e.g. ICP, DCP). Keep tightly sealed when not in use. Store at +15°C to +25°C. Never pipet directly from original container.

All trace level elements were determined by ICP-MS /-OES or graphite furnace AAS. These analysis values are subject to unavoidable systematic variations in this concentration range. They therefore do not form part of our guarantee and are subsequently no subject of release.

Quality Management System:

This CertiPUR[®] Reference Material has been prepared and certified under an ISO 9001 quality management system in accordance to the following guides.

Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement	GUM: 1995
Expression of the Uncertainty of Measurement in Calibration	EA-4/02: 1999
Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement	EURACHEM / CITAC: 2000
Reference Materials - Contents of certificates and labels	ISO Guide 31: 2000
General requirements for the competence of reference materials producers	ISO Guide 34: 2000
General requirements for the competence of testing and calibration laboratories	DIN EN ISO / IEC 17025: 2005
Guideline for the requirements for the competence of reference materials producers	ILAC G12: 2000

Anexo II



National Institute of Standards & Technology

Certificate of Analysis

Standard Reference Material[®] 1643e

Trace Elements in Water

This Standard Reference Material (SRM) is intended primarily for use in evaluating methods used in the determination of trace elements in fresh water. SRM 1643e consists of approximately 250 mL of acidified water in a polyethylene bottle, which is sealed in an aluminized plastic bag to maintain stability. SRM 1643e simulates the elemental composition of fresh water. Nitric acid is present at a concentration of approximately 0.8 mol/L to stabilize the trace elements.

Certified Values: The certified values for 29 elements in SRM 1643e are listed in Table 1. All values are reported both as mass fractions ($\mu\text{g}/\text{kg}$) and as mass concentrations ($\mu\text{g}/\text{L}$). A NIST certified value is a value for which NIST has the highest confidence in its accuracy in that all known or suspected sources of bias have been investigated or accounted for by NIST [1]. The certified values are the average of the gravimetrically prepared value and a value determined by either inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) or inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP-OES). The expanded uncertainty for each certified value is calculated as

$$U = ku_c$$

where k is the coverage factor for a 95 % confidence interval and u_c is the combined standard uncertainty calculated according to the ISO and NIST Guides [2]. The value of u_c is intended to represent, at the level of one standard deviation, the combined effect of uncertainty components associated with the gravimetric preparation, the ICP-MS or ICP-OES determination, method bias [3], and stability.

Information Value: A rhenium value is listed in Table 2 for information purposes only. An information value is considered to be a value that will be of interest to the SRM user, but insufficient information is available to assess the uncertainty associated with the value [1]. The information value is based on results from one NIST method.

Expiration of Certification: This certification of SRM 1643e is valid, within the measurement uncertainties specified, until **31 March 2014**, provided the SRM is handled in accordance with instructions given in this certificate. This certification is nullified if the SRM is damaged, contaminated, or modified.

Maintenance of SRM Certification: NIST will monitor this SRM over the period of its certification. If substantive technical changes occur that affect the certification before the expiration of this certification, NIST will notify the purchaser. Registration (see attached sheet) will facilitate notification.

Coordination of the NIST technical measurements was under the direction of T.A. Butler and G.C. Turk of the NIST Analytical Chemistry Division. The ICP-MS analyses were performed by T.A. Butler, L.L. Yu, and G.C. Turk. The ICP-OES analyses were performed by T.A. Butler and G.C. Turk.

Statistical analysis of the experimental data was performed by S.D. Leigh and D.D. Leber of the NIST Statistical Engineering Division.

The support aspects involved in the issuance of this SRM were coordinated through the NIST Measurement Services Division.

Stephen A. Wise, Chief
Analytical Chemistry Division

Robert L. Watters, Jr., Chief
Measurement Services Division

Gaithersburg, MD 20899
Certificate Issue Date: 26 March 2009
See Certificate Revision History on Last Page

SRM 1643e

Page 1 of 3

Table 1. Certified Values, Expanded Uncertainties, and Coverage Factors for Trace Elements in SRM 1643e

Element	Mass Fraction ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			Mass Concentration ($\mu\text{g}/\text{L}$)			<i>k</i>
	Value	±	U	Value	±	U	
Aluminum	138.33	±	8.4	141.8	±	8.6	3.2
Antimony	56.88	±	0.60	58.30	±	0.61	2.0
Arsenic	58.98	±	0.70	60.45	±	0.72	2.0
Barium	531.0	±	5.6	544.2	±	5.8	2.0
Beryllium	13.64	±	0.16	13.98	±	0.17	2.0
Bismuth	13.75	±	0.15	14.09	±	0.15	2.0
Boron	154.0	±	3.8	157.9	±	3.9	2.4
Cadmium	6.408	±	0.071	6.568	±	0.073	2.0
Calcium	31 500	±	1 100	32 300	±	1 100	2.8
Chromium	19.90	±	0.23	20.40	±	0.24	2.0
Cobalt	26.40	±	0.32	27.06	±	0.32	2.0
Copper	22.20	±	0.31	22.76	±	0.31	2.1
Iron	95.7	±	1.4	98.1	±	1.4	2.0
Lead	19.15	±	0.20	19.63	±	0.21	2.0
Lithium	17.0	±	1.7	17.4	±	1.7	3.2
Magnesium	7 841	±	96	8 037	±	98	2.0
Manganese	38.02	±	0.44	38.97	±	0.45	2.0
Molybdenum	118.5	±	1.3	121.4	±	1.3	2.0
Nickel	60.89	±	0.67	62.41	±	0.69	2.0
Potassium	1 984	±	29	2 034	±	29	2.1
Rubidium	13.80	±	0.17	14.14	±	0.18	2.0
Selenium	11.68	±	0.13	11.97	±	0.14	2.0
Silver	1.036	±	0.073	1.062	±	0.075	3.2
Sodium	20 230	±	250	20 740	±	260	2.0
Strontium	315.2	±	3.5	323.1	±	3.6	2.0
Tellurium	1.07	±	0.11	1.09	±	0.11	3.2
Thallium	7.263	±	0.094	7.445	±	0.096	2.0
Vanadium	36.93	±	0.57	37.86	±	0.59	2.1
Zinc	76.5	±	2.1	78.5	±	2.2	2.6

Table 2. Information Value for Trace Elements in SRM 1643e

Element	Mass Fraction ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Mass Concentration ($\mu\text{g}/\text{L}$)
Rhenium	110	113

Preparation of Material: SRM 1643e was prepared at NIST using only high purity reagents. The containers were acid cleaned before use. In the preparation, a polyethylene cylindrical tank was filled with deionized water and sufficient nitric acid to make the solution approximately 0.8 mol/L. Known masses of the matrix elements (sodium, potassium, calcium, and magnesium) were added to the tank solution as solutions prepared from the same primary materials used to prepare the SRM 3100 Series of Single Element Solutions. Known masses of the other elements were then added to the tank solution using weighed aliquots of the SRM 3100 Series. The final total mass of the tank solution was determined, allowing calculation of the gravimetrically prepared mass fraction for each element. Mass concentrations were calculated using the measured density of 1.025 g/mL. After mixing thoroughly, the solution was transferred to clean 250 mL polyethylene bottles.

INSTRUCTIONS FOR USE

Precautions: The SRM should be shaken before use because of possible water condensation. To prevent possible contamination of the SRM, **DO NOT** insert pipettes into the bottle. Samples should be decanted at a room temperature of 17 °C to 27 °C. After use, the bottle should be recapped tightly and returned to the aluminized plastic bag, which should be folded and sealed with sealing tape. This safeguard will protect the SRM from possible environmental contamination and long-term evaporation.

The accuracy of trace element determinations, especially at the µg/L level, is limited by contamination. Apparatus should be scrupulously cleaned and only high purity reagents employed. Sampling and manipulations, such as evaporations, should be done in a clean environment, such as a Class-100 clean hood.

REFERENCES

- [1] May, W.; Parris, R.; Beck, C.; Fassett, J.; Greenberg, R.; Guenther, F.; Kramer, G.; Wise, S.; Gills, T.; Colbert, J.; Gettings, R.; MacDonald, B.; *Definition of Terms and Modes Used at NIST for Value-Assessment of Reference Materials for Chemical Measurements*; NIST Special Publication 260-136, U.S. Government Printing Office: Washington, DC (2000).
- [2] ISO; *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*, ISBN 92-67-10188-9, 1st ed. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland, (1993); see also Taylor, B.N.; Kuyatt, C.E.; *Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurement Results*; NIST Technical Note 1297, U.S. Government Printing Office, Washington, DC (1994); (available at <http://physics.nist.gov/Pubs/>).
- [3] Levenson, M.S.; Banks, D.L.; Eberhart, K.R.; Gill, L.M.; Guthrie, W.F.; Liu, H.K.; Vangel, M.G.; Yen, J.H.; Zhang, N.F.; *An Approach to Combining Results From Multiple Methods Motivated by the ISO GUM*, J. Res. Natl. Inst. Stand. Technol., Vol. 105, p. 521 (2000).

Certificate Revision History: 26 March 2009 (Addition of a Rhenium information value and editorial revisions); 16 March 2004 (Original certificate date).

Users of this SRM should ensure that the certificate in their possession is current. This can be accomplished by contacting the SRM Program at: telephone (301) 975-2200; fax (301) 926-4751; e-mail srminfo@nist.gov; or via the Internet at <http://www.nist.gov/srm>.

Anexo III



National Institute of Standards & Technology

Certificate of Analysis

Standard Reference Material® 1640

Trace Elements in Natural Water

This Standard Reference Material (SRM) is intended primarily for use in evaluating methods used in the determination of trace elements in fresh water. SRM 1640 is composed of natural fresh water collected from Clear Creek, CO, which has been filtered and stabilized with nitric acid at a concentration of 0.5 mol/L. A unit of SRM 1640 consists of approximately 250 mL of solution in a polyethylene bottle, which is sealed in an aluminized plastic bag.

Certified Values and Uncertainties: The certified values expressed as mass fractions and their expanded uncertainties are listed in Table 1 for 17 elements in SRM 1640. The certified values are equally weighted means of the results of two or more independent analytical methods or a single primary method. Each expanded uncertainty is based on a 95 % confidence interval for the mean, and includes an allowance for differences between the analytical methods used and an allowance for solution stability [1].

Reference Values and Uncertainties: The reference values expressed as mass fractions and their expanded uncertainties are provided in Table 2 for an additional ten elements. The reference values are means from a single method or two or more equally weighted means of results of independent analytical methods for which there is insufficient information to meet NIST certification criteria. Each expanded uncertainty is based on a 95 % confidence interval for the mean and includes an allowance for differences between the analytical method used and an allowance for solution stability but may not include all sources of uncertainty [1].

Information Value: The upper limit information value for thallium, expressed as a mass fraction in Table 3, is an estimate based on the instrumental limit of detection and measurements from a single unit of SRM 1640.

The analytical methods used for the characterization of this SRM are given in Table 4. All values are reported as mass fractions [2].

NOTICE AND WARNINGS TO USERS

Expiration of Certification: This certification of this SRM lot is valid until **01 June 2008**, within the measurement uncertainties specified, provided the SRM is handled and stored in accordance with the instructions given in this certificate (see "Use"). However, the certification will be nullified if the SRM is contaminated or modified. Registration (see attached sheet) will facilitate notification.

Use: The SRM should be shaken before use because of potential water condensation. Samples should be analyzed at a room temperature of $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$. To prevent possible contamination of the SRM, pipettes should not be inserted into the bottle. After use, the bottle should be recapped tightly and returned to the aluminized bag, which should be folded and sealed with sealing tape. This precaution will protect the SRM from possible environmental contamination and long-term evaporation.

The mass fractions given in Tables 1 and 2 are expressed as microgram per kilogram or milligram per kilogram. These values can be converted to mass concentrations with units of nanograms per cubic centimeter or micrograms per cubic centimeter, respectively, by multiplying by the density. The density of SRM 1640 at $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ was measured to be $1.0015\text{ g/cm}^3 \pm 0.0005\text{ g/cm}^3$ (identical to grams per milliliter).

Coordination of the NIST technical measurements was under the direction of J.R. Moody of the NIST Analytical Chemistry Division.

Stephen A. Wise, Chief
Analytical Chemistry Division

Robert L. Watters, Jr., Chief
Measurement Services Division

Gaithersburg, MD 20899
Certificate Issue Date: 20 January 2006
See Certificate Revision History on Last Page

SRM 1640

Page 1 of 4

Statistical analysis of the experimental data was performed by W.F. Guthrie of the NIST Statistical Engineering Division.

The overall coordination of measurements performed by the U.S. Geological Survey National Water Quality Laboratory, Arvada, CO, and by laboratories that participate in the Standard Reference Water Program was under the direction of K. Long.

The support aspects involved in the issuance of this SRM were coordinated through the NIST Measurement Services Division.

Recognizing contamination at the microgram per kilogram level can be a serious problem, labware should be scrupulously cleaned and only high purity reagents employed. Sampling and manipulations, such as evaporations, should be done in a clean environment, such as a Class-100 clean hood.

Table 1. Certified Mass Fractions

Element	$\mu\text{g}/\text{kg}$	Element	$\mu\text{g}/\text{kg}$
Aluminum	52.0 \pm 1.5	Iron	34.3 \pm 1.6
Antimony	13.79 \pm 0.42	Lead	27.89 \pm 0.14
Arsenic	26.67 \pm 0.41	Manganese	121.5 \pm 1.1
Barium	148.0 \pm 2.2	Molybdenum	46.75 \pm 0.26
Beryllium	34.94 \pm 0.41	Selenium	21.96 \pm 0.51
Boron	301.1 \pm 6.1	Silver	7.62 \pm 0.25
Cadmium	22.79 \pm 0.96	Strontium	124.2 \pm 0.7
Chromium	38.6 \pm 1.6	Vanadium	12.99 \pm 0.37
Cobalt	20.28 \pm 0.31		

Table 2. Reference Mass Fractions

Element	$\mu\text{g}/\text{kg}$	Element	mg/kg
Copper	85.2 \pm 1.2	Calcium	7.045 \pm 0.089
Lithium	50.7 \pm 1.4	Magnesium	5.819 \pm 0.056
Nickel	27.4 \pm 0.8	Silicon	4.73 \pm 0.12
Potassium	994 \pm 27	Sodium	29.35 \pm 0.31
Rubidium	2.00 \pm 0.02		
Zinc	53.2 \pm 1.1		

Table 3. Information Mass Fraction

Thallium	<0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$
----------	------------------------------

Source and Preparation of Material: A sample of about 3500 L of natural (fresh) water was obtained by the USGS at Clear Creek, CO. It was filtered through a 0.1 μm ultra filter and acidified with nitric acid. Analysis of the water by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS), before and after the stabilization process, showed that arsenic, beryllium, cobalt, selenium, and zinc were decreased in concentration during the stabilization process. These elements were adjusted to their original concentration levels by the addition of salts of the decreased elements. The stabilized solution was then pumped through an ultra filter, past a UV light source (for sterilization purposes), and then to a bottling station. At the bottling station, the bottles were rinsed with the sample and then filled.

Contributing Laboratories and Analysts:

E.S. Beary, M.S. Epstein, K.E. Murphy, P.J. Paulsen, and G.C. Turk; NIST Analytical Chemistry Division, Gaithersburg, MD
Water Resources Division and approximately 70 laboratories participating in the Standard Reference Water Program, under the direction of K. Long; U.S. Geological Survey, Arvada, CO
P. Taylor, L. Van Nevel, I. Lapitajs, A. Kynartren, A. Held, U. Örnemark, and P. De Bièvre; Institute for Reference Materials and Measurements, Geel, Belgium
M. Morita; Regional Environmental Division of the National Institute for Environmental Studies, Japan Environmental Agency, Tsukuba, Japan

REFERENCES

- [1] ISO; *Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement*, ISBN 92-67-10188-9, 1st ed. International Organization for Standardization: Geneva, Switzerland (1993); see also Taylor, B.N.; Kuyatt, C.E.; *Guidelines for Evaluating and Expressing the Uncertainty of NIST Measurements Results*, NIST Technical Note 1297, U.S. Government Printing Office: Washington, DC (1994); available at <http://physics.nist.gov/Pubs/>.
- [2] Taylor, B.N.; *Guide for the Use of the International System of Units (SI)*; NIST Special Publication 811, U.S. Government Printing Office: Washington, DC (1995).

Certificate Revision History: 20 January 2006 (This revision reflects an extension of the certification period); 17 March 2004 (This technical revision reports a change in the expiration date); 23 January 1998 (Revision reports the addition of an information value for thallium; 02 October 1997 (Original certificate date).

Users of this SRM should ensure that the certificate in their possession is current. This can be accomplished by contacting the SRM Program at: telephone (301) 975-6776; fax (301) 926-4751; e-mail srminfo@nist.gov; or via the Internet at <http://www.nist.gov/srm>.