

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Toxicologia e
Análises Toxicológicas

Valores de referência de porfirinas urinárias
por CLAE numa população não-exposta a
agentes químicos porfirinogênicos

ATECLA NUNCIATA LOPES ALVES

Tese para obtenção do grau de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Henrique Vicente Della Rosa

São Paulo

2005

ATECLA NUNCIATA LOPES ALVES

Valores de referência de porfirinas urinárias por CLAE
numa população não-exposta a agentes químicos
porfirinogênicos

Comissão Julgadora da tese para obtenção do grau de Doutor

Prof. Dr. Henrique Vicente Della Rosa
Orientador/presidente

Prof. Dr. Nairo Massakazu Sumita
1º. Examinador

Prof. Dr. Etelvino José Henriques Bechara
2º. Examinador

Profa. Dra. Rosário Dominguez Crespo Hirata
3º. Examinador

Prof. Dr. Fernando Kok
4º. Examinador

São Paulo, 12 de agosto de 2005.

*TODOS PENSAM EM MUDAR O MUNDO
MAS NINGUÉM PENSA EM MUDAR A SI MESMO
(Filosofia Grega)*

*A VERDADEIRA CARIDADE COMEÇA EM CASA,
COM AS PESSOAS QUE VIVEM AO NOSSO LADO,
QUE PRECISAM E CONTAM COM NOSSO APOIO NO DIA-A-DIA.
ESTES SÃO OS SERES COM O QUAL TEMOS QUE APRENDER E
ENSINAR PARA QUE POSSAMOS CRESCER COMO SER HUMANO.*

DEDICATÓRIA

Para Toni, meu companheiro de todas as horas, pai dos meus filhos, o equilíbrio e o centro do meu universo, você é mais do que a luz da minha vida!

Para meus pais Américo e Rosa, parabéns porque o Amor superou todos os obstáculos, a prova disto são os 50 anos de convivência! Obrigado pelo amor, dedicação e por sempre acreditarem e confiarem nos meus planos.

Para meus filhos Thiago e Victor, mais do que filhos, Thiago grande amigo e conselheiro, tens uma grande compreensão da vida e do universo que eu ainda não tenho. Victor fonte inesgotável de carinho e amor, você me fez conhecer o lado bom e alegre do ser humano!

Para minha querida irmã Marisilda que nunca me desamparou, estive do meu lado em todos os momentos auxiliando e incentivando, torcendo por mim. Confia na tua força, ela pode transformar !!!

Dedico este trabalho a todos os funcionários da Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP. Vocês são maravilhosos, acho que não é por acaso que estamos a tantos anos juntos. Temos um ideal em comum: O AMOR PELO PRÓXIMO.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Henrique Vicente Della Rosa pela compreensão, disponibilidade e apoio em todos os momentos. Obrigado pela orientação desta tese.

Ao Dr. Nairo Massakazu Sumita pela confiança, apoio e amizade sincera de tantos anos. Pelas importantes sugestões no exame de qualificação.

À Profa. Elizabeth Nascimento pelas orientações na qualificação e pela amizade verdadeira e apoio incondicional.

Ao Prof Marcelo N. Burattini, Diretor da Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP, pela confiança em mim depositada.

À Dra Maria Elizabete Mendes pelo incentivo, pela força e perseverança que você espalha por onde passa.

À Profa. Dra. Sandra P. Farsky pelas orientações na qualificação e estímulo ao aprendizado.

Ao Dr Alexandre Soriano Fortini pela confiança, amizade e apoio.

Aos Colegas da Bioquímica pelo espírito de equipe e amizade.

À Equipe de Auditores Internos da DLC (1996-2004), obrigado pela confiança e apoio.

Às professoras Regina Lúcia, Silvia Berlanga e outros tantos professores maravilhosos da FCF/USP a quem devo toda minha formação universitária desde 1977.

Aos funcionários e colegas da Toxicologia um abraço especial pelo apoio e amizade.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-graduação da Pós-Graduação da FCF/USP.

À Prof^a. Sabina D. Gotlieb pelo aprendizado em bioestatística e pelas orientações.

Ao Rogério da Medicina Preventiva pelo trabalho estatístico.

À Rosely Zenker Lopes pela revisão ortográfica.

À Roseli Polo pela edição do texto.

À Leila Aparecida Bonadio pela normalização das referências bibliográficas.

À Béatrice Allain pela revisão do “summary”.

Á TODOS QUE ME APOIARAM, O MEU AGRADECIMENTO!!!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

SUMMARY

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	05
2.1. Biossíntese do heme.....	06
2.2. Porfirias.....	11
2.2.1. Generalidades.....	11
2.2.2. Classificação das porfirias.....	11
2.2.3. Porfirias hepáticas crônicas.....	15
2.2.3.1. Porfiria cutânea tarda (PCT).....	15
2.2.3.2. Porfiriahepatoeritropoiética (HEP).....	18
2.2.3.3. Porfirias hepáticas crônicas induzidas por fatores porfirinogênicos.....	19
2.2.4. Porfinúrias secundárias.....	20
2.3. Exposição ambiental e ocupacional a agentes químicos porfirinogênicos.....	21
2.3.1. Hidrocarbonetos aromáticos polihalogenados.....	22
2.3.1.1. Generalidades e mecanismo de ação porfirinogênica.....	22
2.3.1.2. Hexaclorobenzeno (HCB).....	24
2.3.1.3. Pentaclorofenol (PCP).....	26
2.3.1.4. Dioxinas.....	27
2.3.1.5. Outros hidrocarbonetos halogenados.....	28
2.3.2. Metais pesados – Fontes de exposição, toxicodinâmica e efeitos tóxicos relacionados com porfirias.....	30

2.3.2.1. Arsênio (As).....	30
2.3.2.2. Mercúrio (Hg).....	32
2.3.2.3. Chumbo (Pb).....	33
2.4. Valores de referência de porfirinas urinárias.....	35
2.4.1. Conceito de valores de referência e intervalo de referência de bioindicadores.....	35
2.4.2. Tipo de coleta de urina para valores de referência de porfirinas urinárias.....	35
2.4.2.1. Coleta de amostra de urina de 24 horas.....	35
2.4.2.2. Coleta de amostra isolada de urina como indicador biológico de efeito na exposição a agentes porfirinogênicos.....	36
3. OBJETIVO.....	38
4. MATERIAL E MÉTODO.....	40
4.1. Materiais.....	41
4.1.1. Soluções-padrão.....	41
4.1.2. Reagentes e outros materiais.....	42
4.1.3. Equipamentos e acessórios.....	43
4.1.4. População de referência.....	44
4.1.4.1. Características geográficas e ambientais da cidade de São Paulo.....	44
4.1.4.2. População estudada e fatores de exclusão...	45
4.1.4.3. Dimensionamento da amostra e análise estatística.....	47
4.2. Desenvolvimento da metodologia de dosagem de porfirinas urinárias por CLAE/detector de fluorescência.....	48
4.2.1. Padronização do método.....	48
4.2.2. Preparo da amostra.....	50
4.2.3. Condições cromatográficas.....	51
4.2.4. Validação do método.....	52
4.2.4.1. Linearidade.....	52
4.2.4.2. Limite de quantificação e detecção.....	52

4.2.4.3. Precisão intra e interensaio.....	53
4.2.4.4. Estabilidade dos analitos na matriz.....	53
4.2.4.5. Sistema de qualidade e controle de qualidade.....	54
5. RESULTADOS.....	55
5.1. Cromatogramas característicos do perfil de porfirinas urinários.....	56
5.2. Resultados da validação do método para determinação das frações URO, HEPTA, HEXA, PENTA e COPROPORFIRINAS.....	60
5.2.1. Linearidade.....	60
5.2.2. Precisão intra e interensaio.....	61
5.2.3. Limite de quantificação e detecção.....	62
5.2.4. Estabilidade dos analitos na matriz.....	63
5.3. Dados demográficos da população de referência analisada....	64
5.4. Análise estatística dos dados obtidos das frações URO e COPRO e das porfirinas totais.....	66
6. DISCUSSÃO.....	75
7. CONCLUSÃO.....	89
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	91
ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Molécula do heme destacando na estrutura química o átomo de ferro.....	03
FIGURA 2 -	Reações de biossíntese do heme.....	08
FIGURA 3 -	Compostos intermediários da biossíntese do heme eliminados pela urina.....	10
FIGURA 4 -	Principais porfirias associadas às alterações na atividade enzimática da rota do heme.....	13
FIGURA 5 -	Fluxograma do procedimento para a preparação de amostras.....	50
FIGURA 6 -	Cromatograma do padrão de URO, HEPTA, HEXA, PENTA e COPRO com concentrações de 90,8; 86,9; 88,8; 118,8; 187,2µg/L respectivamente.....	57
FIGURA 7 -	Indivíduo não-exposto a agentes porfirinogênicos – Cromatograma de porfirinas urinárias com as frações URO e COPRO (tempo de retenção 10,742 e 15,419 min, respectivamente).....	58
FIGURA 8 -	Cromatogramas de porfirinas urinárias de um indivíduo não pertencente à população estudada com um perfil compatível com PCT.....	59
FIGURA 9 -	Gráfico de dispersão e histograma obtido para URO na população de referência.....	66
FIGURA 10 -	Gráfico de dispersão e histograma obtido para COPRO na população de referência.....	67
FIGURA 11 -	Gráfico de dispersão e histograma obtido para porfirinas totais na população de referência.....	68
FIGURA 12 -	“Box-and-whisker plot” para os níveis de coproporfirinas urinários nas atividades administrativas e técnicas da população estudada da cidade de São Paulo, SP, Brasil.....	72

FIGURA 13 - “Box-and-whisker plot” para os níveis de coproporfirinas urinários nas categorias de não-fumantes e fumantes (>5 cigarros por/dia) da população estudada da cidade de São Paulo, SP, Brasil.....	72
FIGURA 14 - “Box-and-whisker plot” para os níveis de porfirinas urinários nas atividades administrativas e técnicas da população estudada da cidade de São Paulo, SP, Brasil.....	74
FIGURA 15 - “Box-and-whisker plot” para os níveis de porfirinas urinários nas categorias de não-fumantes e fumantes (>5 cigarros por/dia) da população estudada da cidade de São Paulo, SP, Brasil.....	74

LISTA DE TABELAS

TABELA I -	Classificação das principais porfirias.....	12
TABELA II -	Número de mutações conhecidas para porfirias e “locus” do cromossomo.....	15
TABELA III -	Diferenciação dos tipos de PCT de acordo com as variações na deficiência da URO-D.....	18
TABELA IV -	Hidrocarbonetos halogenados e suas formas de utilização.....	23
TABELA V -	Lista de compostos associados com o HCB como subproduto ou contaminante.....	25
TABELA VI -	Relação de porfirias com as alterações originadas na exposição ao Pb.....	34
TABELA VII -	Valores de referência adotados para frações de porfirinas em coleta de 24 horas.....	36
TABELA VIII -	Valores de média, mediana e dp de porfirinas urinárias em amostra isolada.....	37
TABELA IX -	Concentrações das frações de porfirinas do calibrador comercial utilizado para a validação da metodologia.....	42
TABELA X -	Eluentes encontrados na literatura para dosagem de porfirinas urinárias por CLAE.....	49
TABELA XI -	Programa de gradiente utilizado para a separação das frações de acordo com a polaridade.....	51
TABELA XII -	Correlação e equação de regressão linear obtida para URO, HEPTA, HEXA, PENTA, COPRO na faixa de estudo.....	60
TABELA XIII -	Valores de precisão intra-ensaio (CV%) obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de urina adicionadas com URO, HEPTA, HEXA, PENTA e COPRO.....	61

TABELA XIV -	Valores de precisão interensaio (CV%) obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de urina adicionadas com URO e COPRO.....	62
TABELA XV -	Limites de quantificação e detecção obtidos para as frações de porfirinas urinárias.....	62
TABELA XVI -	Estabilidade da amostra para a fração URO e COPRO conservada em freezer e geladeira em pH 5-6 e pH 9.....	63
TABELA XVII -	Dados demográficos da população de voluntários com relação à idade, sexo, hábitos de tabagismo e atividade ocupacional.....	65
TABELA XVIII -	Análise estatística para as frações URO, COPRO e porfirinas totais para a população estudada.....	69
TABELA XIX -	Resultado dos testes Mann-Whitney para todas as observações para as medidas de URO.....	70
TABELA XX -	Resultado dos testes Mann-Whitney para todas as observações para as medidas de COPRO.....	71
TABELA XXI -	Resultado dos testes Mann-Whitney para todas as observações para as medidas de porfirinas totais.....	73
TABELA XXII -	Estudo comparativo de precisão intra-ensaio para dosagem de porfirinas urinárias por CLAE.....	78
TABELA XXIII -	Comparação dos resultados obtidos no experimento com os determinados por BURATTI <i>et al.</i> , 1987..e APOSTOLI <i>et al.</i> , 2002.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD	autossômica dominante
ADP	porfiria por deficiência da \square \square ALA-D
AIP	porfiria intermitente aguda
ALA	ácido δ -aminolevulinico
ALA-D	enzima ácido δ -aminolevulinico desidratase
ALA-sintase	enzima ácido δ -aminolevulinico sintase
AR	autossômica recessiva
CEP	porfiria eritropoiética congênita
CETESB	Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
COPRO	coproporfirinogênios=coproporfirinas= 4-carboxiporfirina
COPRO I	coproporfirinogênio I= coproporfirina I
COPRO III	coproporfirinogênio III= coproporfirina III
COPRO-O	enzima <i>coproporfirinogênio III oxidase</i>
CV	coeficiente de variação
DLC-HCFMUSP	Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo
DDT	diclorodifeniltricloroetano
dp	desvio padrão
EEP	protoporfiria eritropoiética
HCB	hexaclorobenzeno
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo
HCP	coproporfiria hereditária
HEP	porfiria hepatoeritropoiética
HEPTA	heptaporfirina= 7-carboxiporfirina
HEXA	hexaporfirina = 6-carboxiporfirina
IC	intervalo de confiança
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry
LOD	limite de detecção
LOQ	limite de quantificação

m	média
MESO	mesoporfirina IX
n	número de indivíduos
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
nd	não determinado
p	probabilidade
PBBs	bifenilas polibromadas
PBG	porfobilinogênio
PBG <i>desaminase</i>	<i>enzima porfobilinogênio desaminase</i>
PBG- <i>sintase</i>	<i>enzima porfirinogênio sintase</i>
PCB	bifenilas policloradas
PCMSO	Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional
PCP	pentaclorofenol
PCT	porfiria cutânea tarda
PENTA	pentaporfirina = 5-carboxiporfirina
PHA	hidrocarbonetos aromáticos polihalogenados
PROTO IX	protoporfirina IX
PROTO-O	<i>enzima protoporfirinogênio IX oxidase</i>
r^2	coeficiente de correlação de Pearson
TCDD	2,3,7,8-tetraclorodibenzeno <i>p</i> -dioxina= dioxinas
tR	tempo de retenção
URO	uroporfirinogênios = uroporfirinas = 8-carboxiporfirina
URO I	uroporfirinogênio I = uroporfirina I= 8-carboxiporfirina
URO III	uroporfirinogênio III = uroporfirina III = 8-carboxiporfirina
URO III <i>sintase</i>	<i>enzima uroporfirinogênio III sintase</i>
URO-D	<i>enzima uroporfirinogênio descarboxilase</i>
V	variável
VP	porfiria variegata
VR	valores de referência
ZPP	zinco-protoporfirina

RESUMO

Perfil de referência de porfirinas urinárias por CLAE numa população não-exposta a agentes químicos porfirinogênicos

Porfirinas são produtos formados como intermediários na biossíntese do heme, variando de 8 a 4 grupos carboxilas: uro, hepta, hexa, penta e coproporfirinas. Alterações no perfil de porfirinas urinárias podem ser originados por uma causa hereditária ou por exposição ambiental/ocupacional. Este trabalho teve como objetivo estabelecer um método de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por fluorescência, sensível o suficiente para estimar valores de referência das frações de porfirinas urinárias, denominadas de perfil, para uma população da cidade de São Paulo, Brasil. A urina, amostra isolada, foi coletada de 126 indivíduos (18-65 anos) de ambos os sexos e não expostos ocupacionalmente a agentes porfirinogênicos tais como organoclorados, As, Hg e Pb. Os resultados obtidos apresentaram distribuição não-paramétrica e os valores de referência em $\mu\text{g/g}$ of creatinina, média \pm dp e percentil 2,5 - 97,5 % foram: para a fração uro: $5,3 \pm 6,0$ e 0 - 20,8; para copro: $42,8 \pm 26,4$ e 7,4-133,6 e para porfirinas totais: $48,1 \pm 27,7$ e 7,4-159,4 respectivamente. As frações hepta, hexa e penta não foram quantificadas. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para os grupos de sexo e idade. O grupo de fumantes apresentou níveis mais baixos de copro e porfirinas totais (mediana 37,19 e 43,48) comparado com o grupo de não-fumantes (mediana 22,49 e 27,18). O método proposto, permite detectar discretas alterações na excreção de porfirinas e os limites de referência estimados têm potencial a serem utilizados como biomarcadores na exposição a agentes porfirinogênicos.

SUMMARY

SUMMARY

Urinary porphyrin reference ranges by HPLC in a population not exposed to porphyrinogenic agents

Porphyrins, which are formed as intermediates in heme biosynthesis, vary from eight to four carboxyl groups: uro, hepta, hexa, penta and coproporphyrins. Alterations in the urinary porphyrin excretion profile may be caused by a hereditary disease or by environmental/occupational exposure. The purpose of this study was to establish a sensitive and accurate high-performance liquid chromatography (HPLC) method with fluorescence detection to estimate reference ranges of urinary porphyrin fractions in a population of São Paulo city, Brazil. Random urine samples were collected from 126 subjects (18 - to 65-year-old) of both sexes not occupationally exposed to porphyrinogenic agents such as chlorinated hydrocarbons, As, Hg and Pb. Distribution were nonparametric and reference ranges obtained in $\mu\text{g/g}$ of creatinine, mean \pm SD and 2,5 -97,5th percentile were: for 8-carboxyl (uro): $5,3 \pm 6,0$ and 0 - 20,8; for 4-carboxyl (copro): $42,8 \pm 26,4$ and 7,4-133,6 and for total porphyrins: $48,1 \pm 27,7$ and 7,4 -159,4 respectively. Hepta, hexa and pentaporphyrins were not quantified. No statistically significant correlation was found for sex and age. Smokers had lower levels of copro and total porphyrins statistically significant (median 37,19 and 43,48) than nonsmokers (median 22,49 and 27,18). The proposed method, which allows for the detection of minor alterations in porphyrin excretion and the reference ranges estimated are potentially applicable as biological markers in exposure to porphyrinogenic agents.

1. INTRODUÇÃO

Porfirinas são compostos tetrapirrólicos policarboxilados originados no processo de biossíntese do heme, uma molécula vital para uma grande variedade de funções fisiológicas. As características estruturais do heme e a presença de um átomo ionizado de ferro (Figura 1) permitem que este seja responsável pelo transporte de oxigênio pela hemoglobina, transporte de elétrons na cadeia respiratória (citocromos a, a₃, b₁, c, e c₁), ativação e decomposição do peróxido de hidrogênio (catalase e peroxidase) e outras funções de óxido-redução nos citocromos P450 e b₅ (DANIELL, 1997).

A biossíntese do heme ocorre em todas as células humanas, sendo que cerca de 85% ocorre nas células eritropoéticas da medula óssea, onde todo heme sintetizado é incorporado à hemoglobina e sua produção é dependente da necessidade de síntese desta (KING, MARCHESINI, 2005).

O restante do heme é, praticamente, sintetizado nos hepatócitos e incorporado às hemoproteínas que compõem o citocromo P450 (ELDER, URQUHART, 1987).

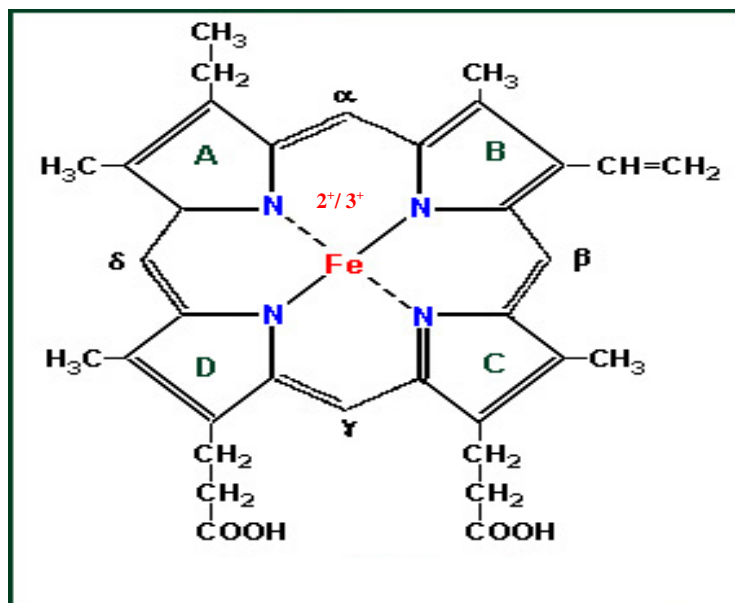


Figura 1 - Molécula do heme destacando na estrutura química o íon de ferro

Agentes porfirinogênicos são capazes de provocar inibições enzimáticas na rota do heme e por consequência alterações no perfil de porfirinas eliminadas via renal. Quanto maior o grau de inibição enzimática, maior o acúmulo de porfirinas nos tecidos, propiciando o aparecimento de sinais e sintomas clínicos de uma doença denominada genericamente de porfiria (DANIELL,1997).

Compostos aromáticos clorados como o hexaclorobenzeno (HCB) e alguns metais como o chumbo (Pb), arsênio (As) e mercúrio (Hg) são reconhecidamente porfirinogênicos. A identificação de alterações discretas provocadas pela exposição a agentes porfirinogênicos só pode ocorrer quando este perfil é comparado com os valores encontrados em população não-exposta a estes. Estimar valores de referência (VR) para o perfil de porfirinas urinárias se torna indispensável para identificar o efeito biológico na exposição a estes agentes, isto é, tem potencial a ser utilizado como indicador biológico de efeito, na monitorização biológica e no

estabelecimento de estratégias de controle e promoção da saúde no ambiente de trabalho (DANIELL,1997).

Para avaliar o perfil de porfirinas urinárias foi estudada uma população de referência, com uma amostragem de 141 indivíduos entre 18 e 65 anos, residentes na cidade de São Paulo, Brasil. A metodologia utilizada foi cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por fluorescência, sensível o suficiente para avaliar o perfil de porfirinas urinárias eliminadas fisiologicamente via renal em amostra isolada e corrigida pela creatinina. Na análise cromatográfica de porfirinas urinárias foi identificada a presença de 5 picos que correspondem às porfirinas derivadas de porfirinogênios com 8, 7, 6, 5, e 4-grupos carboxílicos, denominadas respectivamente de URO (uroporfirina = 8-carboxiporfirina), HEPTA (heptaporfirina = 7-carboxiporfirina), HEXA (hexaporfirina = 6-carboxiporfirina), PENTA (pentaporfirina = 5-carboxiporfirina), COPRO (coproporfirina I e III = 4-carboxiporfirina).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Biossíntese do heme

A biossíntese do heme (Figura 2) ocorre através de uma série de reações reguladas enzimaticamente, descritas a seguir (KING, MARCHESINI, 2005):

- a primeira reação ocorre na mitocôndria com a condensação de uma molécula de glicina e uma de succinil coenzima-A (succinil-CoA) originando o *ácido δ -aminolevulinico* (ALA). Esta reação é limitante para a biossíntese do heme, é catalisada pela enzima *ácido δ -aminolevulinico sintase* (ALA-sintase), sofrendo inibição pelo heme o produto final;
- o ALA mitocondrial é transportado para o citossol, onde a enzima *ácido δ -aminolevulinico desidratase* (ALA-D), também chamada *porfirinogênio sintase* (PBG-sintase) ou *hidrometilbilano sintase*, dimeriza 2 moléculas de ALA para produzir o anel pirrólico do porfobilinogênio (PBG);
- condensação cabeça-cauda de 4 moléculas de PBG para produzir o tetrapirrol intermediário hidrometilbilano. A enzima envolvida na condensação é a *porfobilinogênio desaminase* (PBG desaminase), também denominada *uroporfirinogênio I sintase*. Este intermediário pode seguir duas rotas diferentes, a mais importante é regulada enzimaticamente e produz o uroporfirinogênio III (URO III). Esta etapa é mediada pela enzima *uroporfirinogênio III sintase* (URO III sintase) em conjunto com a *uroporfirinogênio III cosintase*. A rota não regulada enzimaticamente produz uroporfirinogênio I (URO I);

- no citossol, os URO (I ou III) são descarboxilados pela *uroporfirinogênio descarboxilase* (URO-D). Os produtos resultantes têm os grupos acetato substituídos pelo metila e são conhecidos como coproporfirinogênios (COPRO), sendo o COPRO III o mais importante intermediário na biossíntese do heme;
- o COPRO é transportado para o interior da mitocôndria, onde dois propionatos residuais são descarboxilados pela *coproporfirinogênio III oxidase* (COPRO-O), resultando em dois grupos vinil substituídos nos 2 anéis pirrólicos formando o protoporfirinogênio IX;
- o protoporfirinogênio IX, incolor, é convertido a protoporfirina IX (PROTO IX) pela *protoporfirinogênio IX oxidase* (PROTO-O);
- a enzima *ferroquelase* catalisa a reação de incorporação do ferro (Fe) à estrutura cíclica da PROTO IX e origina o heme de coloração avermelhada.

Existem diferenças no controle da biossíntese do heme nos hepatócitos e eritrócitos em função das diferentes necessidades (KING, MARCHESINI, 2005). No fígado a demanda de heme para as hemoproteínas do complexo P450 controla a atividade enzimática da *ALA-sintase*, o heme age por “*feed-back*” negativo nesta primeira enzima do ciclo (ELDER, URQUHART, 1987). Nos eritrócitos este controle é exercido pelo produto de oxidação do heme, a hemina, que age por “*feed-back*”, inibindo a atividade da *ALA sintase* e o transporte desta do citossol, onde é produzida, para a mitocôndria onde catalisa a reação enzimática. Quando as células vermelhas estão maduras, tanto a síntese do heme como da hemoglobina cessam. O estímulo à biossíntese do heme nos eritrócitos ocorre provavelmente por ativação da *ferroquelase* e da *PBG desaminase* (KING, MARCHESINI, 2005).

A degradação do heme origina a bilirrubina que é transportada para o fígado onde ocorrem as reações para posterior eliminação do organismo (KING, MARCHESINI, 2005).

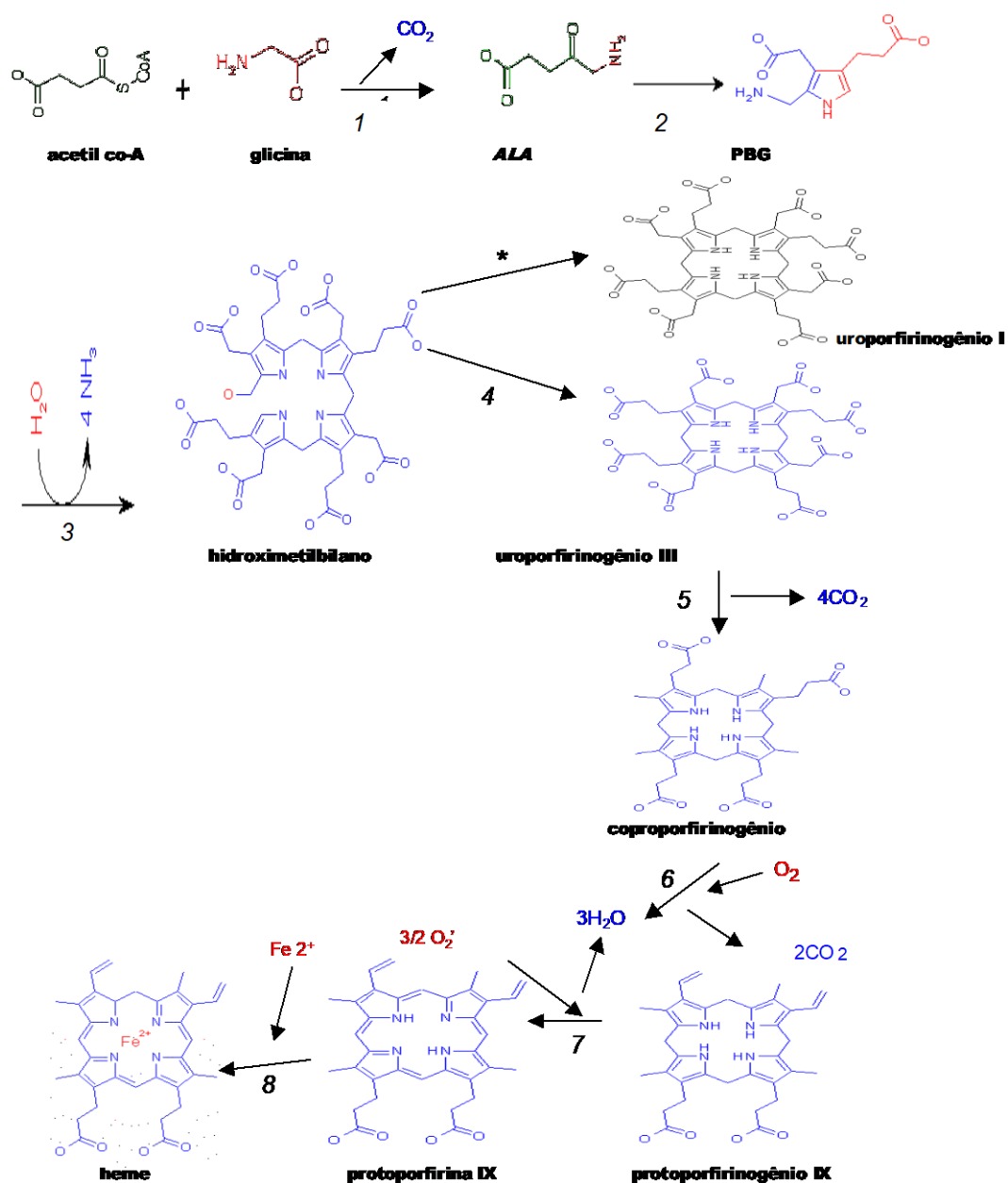


Figura 2 - Reações de biossíntese do heme (KING, MARCHESINI modificado, 2005).

Enzimas: (1) ALA sintase, (2) ALA-D, (3) PBG desaminase (4) URO III sintase e uroporfirinogênio III cosintase, (5) URO-D, (6) COPRO-O, (7) PROTO-O; (8) ferroquelase. * reação não-enzimática

Na catalisação das reações que acontecem na biossíntese do heme, a partir do uroporfirinogênio ocorre uma descarboxilação progressiva em quatro etapas, produzindo moléculas intermediárias mais polares (Figura 3). Estas são chamadas genericamente de porfirinogênios. Alguns destes escapam da rota intracelular e são oxidados por processos celulares, originando porfirinas que são excretadas na urina e nas fezes. As porfirinas derivadas de porfirinogênios com 8, 7, 6, 5, e 4-grupos carboxílicos, por serem mais hidrossolúveis, são excretadas na urina, enquanto a menos polar, 2-carboxiporfirina (protoporfina) é excretada exclusivamente nas fezes (VERDON, POLLOCK, BRALLEY, 2004).

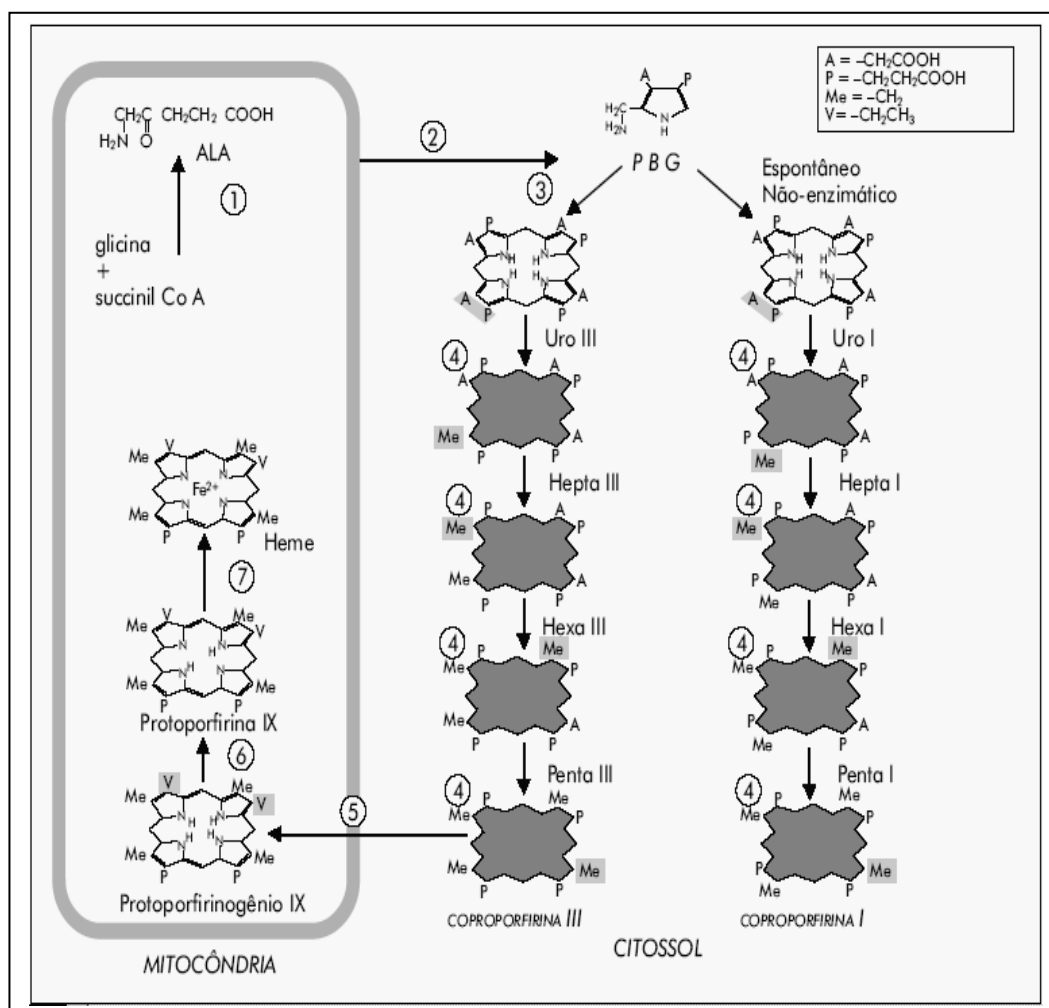


Figura 3 – Compostos intermediários da biossíntese do heme eliminados pela urina

Enzimas: (1) ALA sintase, (2) ALA-D, (3) PBG desaminase + URO III sintase e uroporfirinogênio III cosintase, (4) URO-D, (5) COPRO-O, (6) PROTO-O, (7) ferroquelase.

2.2. Porfirias

2.2.1. Generalidades

As porfirias são um grupo de patologias de origem genética ou adquirida relacionadas com a síntese deficiente ou inibição de enzimas da via biossintética do heme. Quando a rota do heme é interrompida em algum ponto, o excesso de porfirina não metabolizado começa a se acumular em alguns órgãos, aonde irão se desencadear os sintomas tóxicos (DONNAY, ZIEM, 2000). De maneira geral, nas porfirias, o padrão de excreção de produtos e subprodutos originados na biossíntese do heme apresenta-se alterado (DOSS, KÜHNEL, GROSS, 2000).

2.2.2. Classificação das porfirias

Historicamente as porfirias podem ser classificadas de acordo com (DANIELL, 1997):

- a principal enzima envolvida;
- a natureza da herança genética (autossômica dominante ou autossômica recessiva);
- a principal origem do precursor do heme em excesso: hepática, eritropoética ou mista;
- o padrão de manifestação dos sintomas: agudas ou crônicas;
- a natureza dos sintomas clínicos: neurológica, cutânea ou neurocutânea.

Estas diferentes classificações se sobrepõem (DANIELL, 1997). A Tabela I relaciona o tipo de porfiria, a deficiência enzimática associada, a transmissão genética, a expressão fenotípica e clínica e a classe de porfirina urinária alterada (DOSS, KÜHNEL, GROSS, 2000). A Figura 4 esquematiza as principais porfirias associadas às alterações na atividade enzimática da rota do heme.

Tabela I - Classificação das principais porfirias (DOSS, KÜHNEL, GROSS, 2000)

Porfíria	Deficiência Enzimática	Transmissão Genética	Expressão Fenotípica	Expressão Clínica	Fração Alterada (Urina)
1. Eritropoética					
CEP	<i>URO III sintase</i>	AR	Medula óssea	Fotossensibilidade	URO I e COPRO I
EEP	<i>Ferroquelase</i>	AD	Medula óssea e Fígado	Fotossensibilidade	COPRO
2. Hepática					
Agudas					
ADP	<i>ALA-D</i>	AR	Fígado	Visceral e Neurológica	ALA e COPRO
AIP	<i>PBG desaminase</i>	AD	Fígado	Visceral e Neurológica	ALA e PBG URO e COPRO
HCP	<i>COPRO-O</i>	AD	Fígado	Visceral Neurológica Fotossensibilidade	ALA, PBG e COPRO
VP	<i>PROTO-O</i>	AD	Fígado	Visceral Neurológica Fotossensibilidade	ALA, PBG e COPRO
Crônicas					
PCT	<i>URO-D</i>	V	Fígado	Fotossensibilidade	URO e HEPTA
HEP	<i>URO-D</i>	AR	Fígado e Medula óssea	Visceral Neurológica Fotossensibilidade	URO e HEPTA

CEP:porfíria eritropoética congênita EEP: protoporfíria eritrohepática ADP:porfíria por deficiência da ALA-D; AIP: porfíria intermitente aguda HCP:coproporfíria hereditária VP: porfíria variegata PCT: porfíria cutânea tarda HEP:porfíria hepatoeritropoética

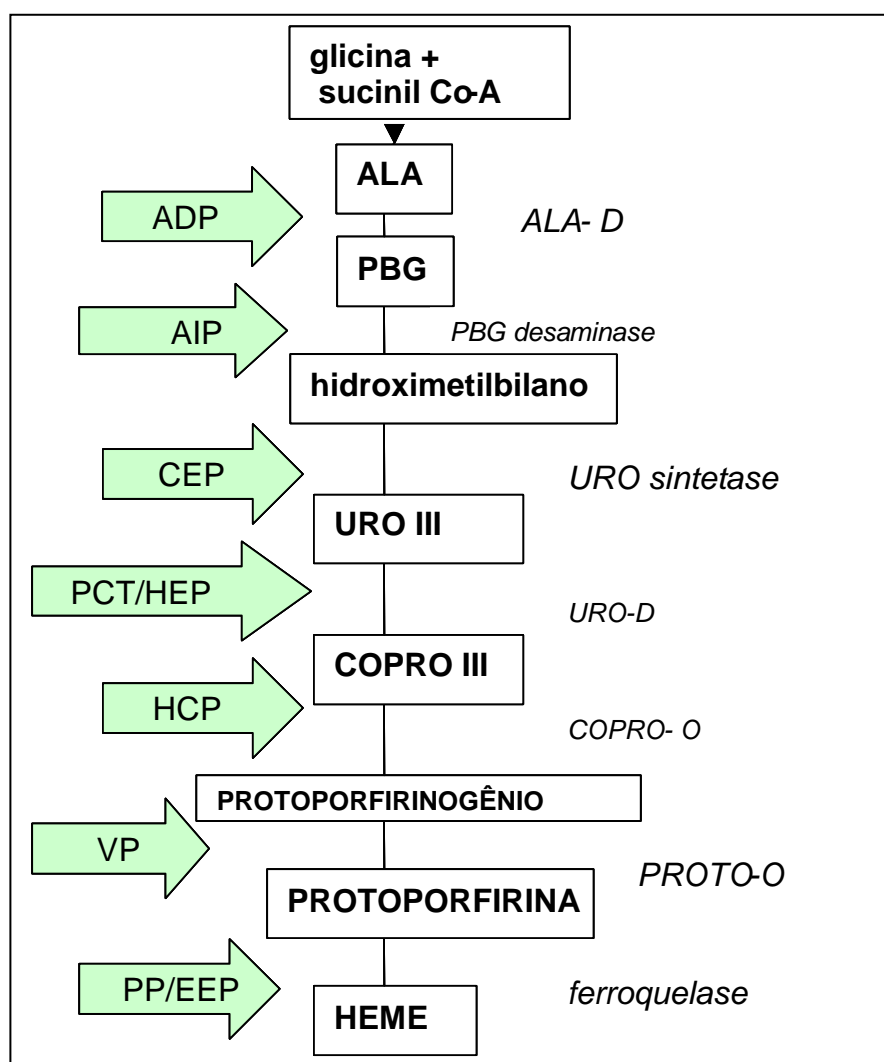


Figura 4 - Principais porfirias associadas às alterações na atividade enzimática da rota do heme

Nas porfirias de origem genética autossômicas recessivas (AR), os indivíduos heterozigotos afetados têm 50% dos níveis de atividade da enzima e, em condições normais, não manifestam a doença. É uma doença de difícil diagnóstico devido ao fato de ser pouco conhecida dos clínicos, além do mais, a frequência e a gravidade dos sintomas são muito variáveis entre os indivíduos (DOSS, KÜHNEL, GROSS, 2000).

Embora a PCT seja provavelmente a mais comum de todas as porfirias, a sua prevalência ainda não foi bem estimada e não há dados confiáveis publicados até o momento. Sabe-se que ocorre praticamente em todas as raças do mundo (MERCK & Co. INC, 1994-2004).

Segundo a MEDICAL COMMUNITY, 2005, estima-se que a prevalência da PCT nos Estados Unidos seja de 1/10.000, a AIP, PP e VP de 1/10.000 a 1/100.000, a HCP menor que 1/100.000 e as outras muito raras. Na África do Sul a VP tem prevalência de 1/400.

Nas últimas três décadas, tem havido importantes avanços na compreensão das enzimas específicas envolvidas nas porfirias, permitindo que diversos genes responsáveis pela codificação destas fossem isolados e localizados, bem como também muitas mutações a eles associadas fossem identificadas. Algumas enzimas da biossíntese do heme foram mapeadas para os cromossomos específicos (Tabela II). A natureza molecular das alterações enzimáticas é muito heterogênea e múltiplas alterações têm sido demonstradas para cada tipo de porfiria (NORDMANN, PUY, DEUBACH, 1999).

Tabela II - Número de mutações conhecidas para porfirias e “locus” do cromossomo (NORDMANN, PUY, DEUBACH, 1999)

Porfirias	Alteração Enzimática	“Locus” do Cromossoma	Número de Mutações Conhecidas
ADP	ALA-D	9q34	4
AIP	PBG desaminase	11q24	>140
CEP	URO III sintase	10q25	>20
PCT	URO-D	1q34	10
HCP	COPRO-O	3q12	8
VP	PROTO-O	1q23	7
PP	ferroquelase	9q34	4

No item a seguir detalharemos as porfirias do tipo hepática crônica, por estarem incluídas no grupo de porfirias adquiridas por estímulo externo e não genético, de interesse para a exposição ocupacional a agentes químicos porfirinogênicos.

2.2.3. Porfirias hepáticas crônicas

2.2.3.1. Porfíria cutânea tarda (PCT)

A PCT é o tipo de porfíria mais comum em humanos e é causada pela deficiência parcial de uma enzima hepática, a URO-D. É caracterizada por fotossensibilidade e fragilidade cutânea às custas da interação das porfirinas com a luz ultravioleta (UV) na pele (LANÇONI, 1999). Os precursores do heme, na pele, apresentam fluorescência quando expostos à luz UV de 400-

410 nm e, no estado excitado, interagem com macromoléculas celulares ou com oxigênio molecular gerando radicais livres que são citotóxicos e genotóxicos (CASARETT, 1996).

Bioquimicamente é caracterizada por um aumento de URO e HEPTA na urina (OZALLA *et al.*, 2002). Na análise cromatográfica geralmente os níveis de URO urinários estão aumentados de 4 a 250 vezes em relação ao valor de referência superior de URO. Em geral a HEPTA apresenta 25% do valor da URO (MAYO REFERENCE SERVICES, 2004). Este padrão pode ser diferenciado das porfirias agudas em que geralmente só aparece a fração URO aumentada (NUTTALL, 2001).

Quando ocorre a manifestação sintomática da porfíria, o nível do precursor do heme excretado está muito maior que o limite superior do valor de referência relatado para este. Nos relatos de PCT, a URO urinária está aumentada de 10 a 375 vezes. Assim, fases latentes, em que ainda não apareceram os sintomas clínicos na pele, podem ser identificadas através de discretas alterações no perfil urinário de porfirinas (DANIELL, 1997).

A PCT pode ser adquirida, do tipo I, denominada esporádica, do tipo II, hereditária, ou do tipo III, com herança não estabelecida (Tabela III). A sua freqüência está mais associada a condições esporádicas do que por herança genética. Diversos estudos realizados com a finalidade de caracterização dos tipos de PCT de acordo com as variações na deficiência da URO-D concluíram que a atividade da URO-D hepática está diminuída em todas as formas de PCT. Entretanto, a atividade da URO-D eritrocitária permanece normal na forma adquirida, mas está diminuída na forma genética (Tabela III) (DOSS, KÜHNEL, GROSS, 2000).

Tanto a forma genética como a esporádica de PCT podem ser desencadeadas pela exposição a substâncias químicas: hidrocarbonetos polihalogenados tais como HCB, bifenilas policloradas (PCBs), polibromadas (PBBs) e dioxinas (DOSS, KÜHNEL, GROSS, 2000).

A PCT também tem sido associada com infecções virais, principalmente o vírus da hepatite B e o citomegalovírus (DANIELL, 1997).

Em algumas áreas sabe-se estar associada a infecções crônicas pelo vírus da hepatite C (MERCK & Co. INC, 1994-2004).

O consumo de álcool e a utilização de estrógenos orais também podem desencadear a PCT. O consumo de álcool é o fator com maior associação à PCT em humanos, aproximadamente em dois terços dos casos. Esta associação pode ser explicada pelo efeito inibitório na URO-D e indução da *ALA sintase* (DOSS, KÜHNEL, GROSS, 2000).

A PCT do tipo III pode ser considerada como uma condição de deficiência enzimática parcial de URO-D que pode aumentar a susceptibilidade à doença (DANIELL, 1997).

Tabela III - Diferenciação dos tipos de PCT de acordo com as variações na atividade da URO-D (DOSS, KÜHNEL, GROSS, 2000).

Atividade da Uroporfirinogênio Descarboxilase (%)				
Tipo de PCT	Eritrócitos	Fígado	Número de Pacientes	Referências
Tipo I adquirida (esporádica)	100	39–57	~50	DOSS <i>et al.</i> , 1980
	100	16–47	~78	ELDER, 1998
Tipo II genética (do tipo AD)	50	ND	~50	DOSS <i>et al.</i> , 1991
	41–57	29-58	~22	ELDER, 1998
	50	ND	~28	HELD <i>et al.</i> , 1989
Tipo III familiar (herança não estabelecida)	100	6-15	<5	ELDER, 1998
PCT tóxica (adquirida ou toxicogenética induzida por hexaclorobenzeno e TCDD)	50	ND	-	DOSS, 1986

TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenzeno p-dioxina)

ND não determinado

2.2.3.2. Porfíria hepatoeritropoiética (HEP)

A HEP geralmente é uma forma mais grave da PCT, caracterizada bioquimicamente por um aumento na excreção das porfirinas policarboxiladas urinárias. A doença é o resultado de uma deficiência mais grave da atividade enzimática da URO-D (<10% da atividade normal). A HEP é uma doença de herança AR e a forma hereditária da PCT é dominante. Pelo menos 30 mutações diferentes do gene responsável pela síntese da URO-D já foram identificadas em pacientes com HEP e PCT

familiar, com o predomínio da mutação da substituição da glicina pelo ácido glutâmico no códon 281 (GED *et al.*, 2002)

2.2.3.3. Porfirias hepáticas crônicas induzidas por fatores porfirinogênicos

A manifestação de um quadro de porfiria pode estar associada ou ser exacerbada por uma série de agentes causais como (VERDON, POLLOCK, BRALLEY, 2004):

- exposição ambiental e ocupacional ao HCB, bifenilas polihalogenadas, dioxinas, cloreto de vinila, tetracloreto de carbono, benzeno, clorofórmio e metais pesados como Pb, As e Hg;
- hábito do alcoolismo;
- doenças hepáticas e infecciosas como cirrose, hepatite crônica ativa, hepatite infecciosa e tóxica, mononucleose, etc;
- doenças hematológicas como anemias aplásticas, sideroblásticas e hemolíticas, deficiência na eritropoese, anemia perniciosa, talassemia, leucemia, etc;
- distúrbios no metabolismo do ferro;
- efeito adverso de drogas como anticonvulsivantes (carbamazepina, difenilhidantoína, primidona e ácido valpróico), analgésicos e antitérmicos (dipirona sódica), antiespasmódicos (brometo de N-butilescopolamina), anestésicos (óxido nitroso), hormônios sexuais (estrógenos e progesterona sintéticos), antibióticos da classe das sulfonamidas, etc .

As porfirias induzidas por exposição a substâncias químicas caracterizam-se como hepáticas crônicas. O órgão atingido é o fígado, e a evolução é lenta com vários estágios subclínicos, bioquimicamente definidos, desencadeando a PCT (ELDER, URQUHART, 1987).

Os mecanismos pelos quais algumas substâncias produzem acúmulo e alterações no padrão de excreção das porfirinas e seus precursores podem ocorrer de maneira isolada ou concomitante (ELDER, URQUHART, 1987). São eles:

- inibição enzimática com acúmulo e excreção aumentada do substrato correspondente;
- atividade aumentada da *ALA-sintase*, por estímulo primário do fator exógeno ou como resposta ao aumento de ALA provocado pela inibição enzimática.

Baseado em experiências clínicas e evidências em experimentos com animais, DOSS, KÜHNEL, GROSS, 2000, descreveu o potencial de distúrbios crônicos não específicos, clinicamente latentes de porfiria hepática, progredirem a PCT, através de vários estágios, denominados A, B, C e D. As lesões hepáticas subclínicas evoluem progressivamente para o aparecimento das lesões cutâneas.

Estes estágios podem ser identificados no perfil de porfirinas urinárias. No estágio inicial, fase A, aparece uma coproporfinúria; na fase B, aparece um aumento discreto na fração URO; na C, aparece também o aumento da fração HEPTA; e na fase D é desencadeada a PCT (ELDER, URQUHART, 1987). Esta transição de coproporfinúria até PCT depende de uma inibição tóxica da atividade da URO-D no fígado que pode ou não estar associada também a uma alteração genética pré-existente.

2.2.4. Porfirinúrias secundárias

As porfirinúrias podem ser provocadas por porfirias decorrentes de diferentes condições patológicas e por uma variedade de fatores exógenos já citados no item anterior.

O termo porfirinúria secundária é utilizado em condições em que a alteração primária não é uma alteração enzimática na biossíntese do heme.

Nem sempre o acúmulo ou excreção de precursores da biossíntese do heme são provocados necessariamente por deficiência enzimática. Em geral envolve uma coproporfinúria discreta ou moderada, com presença ou não de URO. Esta pode ser útil para detectar estágios subclínicos no desenvolvimento das porfirias hepáticas crônicas provocadas por exposição a determinados agentes químicos já citados (DOSS,1987; VERDON, POLLOCK, BRALLEY, 2004).

O aumento de COPRO urinária sem alteração enzimática na biossíntese do heme pode ocorrer (DANIELL *et al.*, 1997):

- na eritropoese aumentada;
- nas alterações da excreção hepatobiliar pelo fato da COPRO ser excretada pela bile;
- no estímulo hepático à síntese do heme provocado por várias drogas;
- na exposição a substâncias que afetam a função tubular como o Pb e o Hg que alteram a excreção renal das porfirinas, principalmente a COPRO .

2.3. Exposição ambiental e ocupacional a agentes químicos porfirinogênicos

A exposição ocupacional e ambiental a agentes químicos da classe dos hidrocarbonetos halogenados e metais pesados, como já exposto no item 2.2.3.3, é capaz de provocar alterações enzimáticas na rota do heme e uma alteração do perfil de porfirinas urinárias. Estas, de acordo com as características da exposição, poderão evoluir para uma porfiria induzida quimicamente que se assemelha à PCT já descrita anteriormente.

A seguir serão descritas algumas características como fontes de exposição, toxicodinâmica e evidências de ação porfirinogênica no homem e

nos animais para os hidrocarbonetos halogenados e metais pesados como o Pb, Hg e As.

2.3.1. Hidrocarbonetos aromáticos polihalogenados

2.3.1.1. Generalidades e mecanismo de ação porfirinogênica

Definem-se hidrocarbonetos aromáticos polihalogenados (PHAs) como substâncias aromáticas que possuem átomos de halogênio (cloro, flúor, bromo, iodo) ligados a um anel benzênico simples ou policondensado. Na Tabela IV estão expostos alguns hidrocarbonetos halogenados e sua principal utilização (DELLA ROSA , MENDES, 1993).

Os PHAs interferem com o metabolismo das porfirinas, ao inibir a enzima URO-D hepática que, como se sabe, é a enzima que catalisa a descarboxilação passo a passo da porfirina com 8 carboxilas, a URO, até 4 carboxilas, a COPRO (DANIELL *et al.*, 1997).

Apesar das várias investigações, o mecanismo pelo qual os PHAs alteram a atividade da URO-D no fígado permanece obscuro. Supõe-se que o mecanismo de inativação ocorra por uma ligação direta do PHA, ou um produto de biotransformação no grupamento “tiol”, essencial para a atividade da enzima. A inativação enzimática gerada por conta de algumas formas reativas de oxigênio formadas na exposição a estes tipos de substâncias também deve ser considerada (ELDER, URQUHART, 1987).

A ação porfirinogênica ocorre também pela ação indutora do citocromo P450, acarretando um aumento na demanda de heme nos hepatócitos (CASARETT, 1996). O HCB tem ação indutora no complexo enzimático P450, ligando-se ao receptor aril do hidrocarbono no citocromo hepático P4502B (VAN BIRGELEN, 1998).

Os principais relatos de ação porfirinogênica para PHAs referem-se ao HCB, ao PCB e às dioxinas.

Tabela IV - Hidrocarbonetos halogenados e suas formas de utilização (DELLA ROSA , MENDES, 1993).

Hidrocarboneto Halogenado	Formas de Utilização
Clorobenzeno e derivados (diclorobenzeno, m-diclorobenzeno, p-diclorobenzeno)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ solventes e intermediários químicos
Diclorobenzenos (principalmente o <i>p</i> -diclorobenzeno)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ inseticidas e desinfetantes
Isômeros do triclorobenzeno	<ul style="list-style-type: none"> ▪ meios de transferência de calor, fluidos e solventes
Hexaclorobenzeno	<ul style="list-style-type: none"> ▪ fungicida ▪ intermediário na produção de corantes e hexafluorobenzeno ▪ matéria-prima para produção de borracha sintética ▪ plastificantes para o cloreto de polivinila ▪ aditivo para composições militares pirotécnicas ▪ agente de controle de porosidade na manufatura de eletrodos
Cloronaftalenos	<ul style="list-style-type: none"> ▪ meios de transferência de calor, fluidos e solventes ▪ aditivos de lubrificantes ▪ fluidos dielétricos
Hexaclorofeno	<ul style="list-style-type: none"> ▪ agente antibacteriano utilizado em sabões, detergentes e equipamentos hospitalares
Bifenilas policloradas (PCB)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ óleos não inflamáveis em transformadores elétricos e condensadores

2.3.1.2. Hexaclorobenzeno (HCB)

O HCB é um hidrocarboneto clorado que foi utilizado como fungicida em várias partes do mundo a partir da década de 30, quando começou sua produção industrial. A preocupação por sua presença no meio ambiente e as relações com a saúde humana nasceram, principalmente, a partir do acidente ocorrido no sul da Turquia, no final da década de 50, quando semente de trigo tratada por este fungicida foi utilizada para produção de pão e consumida por milhares de pessoas. Os efeitos da ingestão acidental de HCB sobre a saúde daquela população foram extremamente graves, tanto a curto como a médio prazo. Naquele acidente, a ingestão maciça de HCB pela população produziu uma epidemia denominada “porfíria túrcica” (DELLA ROSA, MENDES, 1993).

Hoje, o HCB ainda continua sendo produzido, porém como impureza ou subproduto de inúmeros processos industriais, principalmente na produção de produtos clorados (DELLA ROSA, MENDES, 1993) (Tabela V). A principal fonte de HCB é a emissão industrial originada na produção de organoclorados (OZALLA *et al.*, 2002).

Além disso, os clorados como o HCB são extremamente resistentes à degradação, estão amplamente dispersos no meio ambiente, acumulando-se também nas cadeias alimentares (DELLA ROSA, MENDES, 1993).

Tabela V - Lista de compostos associados com o HCB como subproduto ou contaminante (DELLA ROSA, MENDES, 1993)

Substâncias químicas de uso industrial com conhecida presença de HCB como subproduto
<ul style="list-style-type: none">▪ cloro▪ tetracloreto de carbono▪ percloroetileno▪ tricloroetileno▪ pentaclorobenzeno
Substâncias químicas de uso industrial com potencial de produzirem HCB como subproduto
<ul style="list-style-type: none">▪ solventes clorados: hexacloroetano (fundição de alumínio); 1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoroetano; 1,1,2-tricloroetano; dicloroetileno; bifenilas policloradas; naftaleno clorado (aditivos de lubrificantes, fluidos dielétricos); clorobenzenos (solventes e intermediários químicos); dicloropropenos▪ monômeros clorados na produção de plásticos: cloreto de vinila; 2-clorobutadieno▪ intermediários clorados: fosfogênio; hexaclorciclopentadieno; cloreto de etila; cloreto cianídrico; anidrido tetracloroftálico▪ substâncias químicas utilizadas em eletrólise: sódio metálico; perclorato de sódio▪ produção de outras substâncias químicas: dióxido de titânio; diisocianato de tolueno; reativos de azo-corantes do cloreto cianídrico; corantes de ftalocianina e pigmentos

A administração de HCB em animais experimentais causa uma deficiência hepática da URO-D, embora permaneça inalterada nos eritrócitos (SELDEN *et al.*, 1999; MYLCHREEST, CHARBONNEAU, 1997). O padrão de acúmulo de porfirinas se assemelha muito à PCT em humanos (DANIELL *et al.*, 1997), caracterizada bioquimicamente por aumento de URO e HEPTA na urina (OZALLA *et al.*, 2002).

Porfirias experimentais induzidas pela ingestão de HCB em animais de laboratório produziram inicialmente um aumento moderado de COPRO e posteriormente um aumento das porfirinas carboxiladas, como a URO e a HEPTA (ELDER, 1976).

Num estudo realizado em Flix, Catalonia, Espanha, numa vila de 5.000 habitantes localizada nas redondezas de uma indústria eletroquímica, em sua população exposta a altos níveis de HCB (média de 35 µg/m³) foi observado que os níveis de porfirinas urinárias (URO, HEPTA e COPRO) não se correlacionavam com o aumento dos níveis séricos de HCB. Em contrapartida, ao contrário dos estudos em animais, a fração COPRO era mais baixa nos indivíduos com os níveis mais altos de HCB (SUNYER, 2002).

Estudos realizados em trabalhadores de uma fundição de alumínio na Suíça, cujo processo industrial gerava HCB e octacloroestireno a partir do hexacloroetano, concluíram que esta exposição gerava alterações de longo prazo no metabolismo de porfirinas. Comparando trabalhadores expostos e não-expostos, observou-se que a COPRO era mais alta nos expostos. As alterações metabólicas observadas eram discretas e clinicamente insignificantes, mas identificáveis como uma coproporfinúria secundária, a primeira fase do desenvolvimento de uma porfiria hepática crônica induzida por aromáticos polihalogenados (SELDEN *et al.*, 1999).

2.3.1.3. Pentaclorofenol (PCP)

O PCP tem sido usado em vários produtos devido à sua ação como herbicida, algicida, conservante de madeira, germicida, fungicida e controle de moluscos. O PCP comercial contém altos níveis de impurezas de dibenzo-*p*-dioxinas cloradas e dibenzofuranos clorados (MORGAN, 1989).

Num estudo populacional realizado em 1986 e publicado por HRYHORCZUK, 1998, foram comparados indivíduos expostos e não-

expostos ocupacionalmente a PCP numa mesma indústria de 1938 a 1978. Nos trabalhadores que apresentavam cloroacne foram encontrados níveis médios diferentes de COPRO urinárias comparando-se os 2 grupos (117 $\mu\text{g}/24\text{horas}$ nos expostos e 90,6 $\mu\text{g}/24\text{horas}$ nos não-expostos). Neste estudo concluiu-se que trabalhadores com cloroacne que tinham sido expostos a PCP apresentavam aumento significativamente mais alto na excreção urinária de HEPTA, HEXA, PENTA e COPRO do que os não-expostos e que as alterações bioquímicas persistiam alguns anos após cessada a exposição.

2.3.1.4. Dioxinas

As 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxinas, também conhecidas como dioxinas e TCDDs, são produzidas como contaminadoras indesejáveis durante a manufatura de clorobenzenos, clorofenóis e seus derivados tais como o ácido 2,4,5-triclorofenoacético, o ingrediente ativo do herbicida chamado popularmente de “agente laranja” (IARC, 1977; CASARETT, 1996).

As TCDDs são um dos mais potentes agentes porfirinogênicos conhecidos. Além do mecanismo de ação já conhecido para o PHAs de inibição da atividade da URO-D, também é responsável pela indução da *ALA-sintase* hepática (ELDER, URQUHART, 1987).

Experimentos em animais demonstraram que as TCDDs são porfirinogênicas em roedores após exposição crônica (ELDER, URQUHART, 1987). As principais evidências para a espécie humana são provenientes de relatos de exposição em ambiente de trabalho e durante episódios de utilização de armas químicas em guerras.

Num estudo realizado em 1964 numa indústria em Nova Jersey, USA, que produzia herbicidas como o ácido 2,4-diclorofenoacético (2,4-D) e ácido 2,4,5 triclorofenoacético (2,4,5-D), foram observados o desenvolvimento de PCT em 2 trabalhadores e a fração URO aumentada na

urina de 8 dos 25 trabalhadores analisados (BLEIBERG *et al.*, 1964). Posteriormente na mesma indústria em Nova Jersey outros estudos realizados não demonstraram excreção urinária anormal dos precursores do heme, exceto em um trabalhador que apresentava PCT. Trabalhadores da manutenção que estavam expostos aos mais altos níveis de TCDDs apresentaram uma média de COPRO urinária mais alta, mas dentro da faixa de normalidade (CALVERT *et al.*, 1994).

Num estudo realizado em 115 moradores de Seveso, Itália, foi encontrado 84% da população com porfiria hepática do tipo A. Havia prevalência desta alteração nos moradores das áreas com maior grau de contaminação por dioxinas (CENTEN, STRIK, COLOMBI, 1979).

Na Tchecoslováquia, em estudos realizados com 55 trabalhadores de uma indústria de produção de herbicidas, foi observado que 11% dos indivíduos apresentavam PCT e 21% um aumento discreto de URO urinária (PAZDEROVA-VEJLUPKOVA *et al.*, 1981).

Em dois estudos de comunidades habitantes do Missouri, USA, onde havia contaminação ambiental por TCDDs, não foi encontrado nenhum caso de PCT, mas os níveis de URO na urina dos indivíduos expostos se apresentaram elevados em relação a um grupo controle (HOFFMAN *et al.*, 1986; WEBB *et al.*, 1987)

Em 1993 o Departamento de Veteranos do Vietnã aceitou uma recomendação do Instituto de Medicina para pagar uma compensação para os veteranos da Guerra do Vietnã que haviam adquirido PCT, assumindo que esta tinha sido provocada ou agravada pela exposição ao “agente laranja” (DONNAY, ZIEM, 2000).

2.3.1.5. Outros hidrocarbonetos halogenados

Além dos agentes químicos já citados existem também relatos de casos de PCT para outros agentes químicos como o DDT em trabalhadores

que o aplicavam na agricultura (HABERMAN, ROSENBERG, MENON, 1975).

LYNCH, LEE, KUSHNER, 1975, relataram um caso de PCT associado à hepatite, atribuído a uma presumível exposição crônica a fenóis policlorados originados na mistura acidental de benzilclorofenol e hipoclorito de sódio no preparo de solução para limpeza ambiental.

Na avaliação da exposição a cloreto de vinila em 46 trabalhadores de um processo de produção de cloreto de polivinila foi verificado que 36 desses apresentavam coproporfinúria e 4 desse mesmo grupo apresentaram aumento discreto de URO e HEPTA urinárias (DOSS, LANGE, VELTMAN, 1984).

Com relação às bifenilas polibromadas (PBBs), num estudo realizado em uma área rural de Michigan por STRIK *et al.*, 1979, de 126 pessoas expostas aos PBBs através da ingestão de carne e laticínios, 11 apresentaram coproporfinúria (93-128 μ g/L, VR <78 μ g/L). Dos 11 indivíduos analisados, 4 apresentaram discreta uroporfirinúria (29-59 μ g/L, VR <24 μ g/L).

Em Taiwan, de 20 indivíduos que consumiram óleo contaminado com PCBs pelo período de dois anos, 8 apresentaram alterações no padrão de excreção de URO e COPRO urinárias em relação a um grupo controle: 3 apresentaram uroporfirinúria (50-139 μ g/L, grupo controle: 7-22 μ g/L) e 5 coproporfunúria (61-255 μ g/L, grupo controle 2-48 μ g/L) (SEKI, KAWANUSHI, SANO, 1987).

2.3.2. Metais pesados - Fontes de exposição, toxicodinâmica e efeitos tóxicos relacionados com porfirias

O mecanismo de indução de porfirias por exposição a metais está relacionado à formação de espécies reativas de oxigênio e complexos com a glutatona comprometendo o poder antioxidante desta. A inibição de algumas funções enzimáticas está relacionada com a complexação dos metais com o grupamento tiol. O resultado final é lesão celular induzida por estresse oxidativo e a oxidação de porfirinogênios à porfirinas que são excretados na urina produzindo porfirinúrias (VERDON, POLLOCK, BRALLEY, 2004).

2.3.2.1. Arsênio (As)

O As na natureza ocorre numa variedade de complexos compostos sulfídricos. Uma das fontes ambientais de contaminação é originada no evento de erupções vulcânicas. Da metade do século XIX até a década de 40 do século XX os compostos inorgânicos de As foram os principais pesticidas utilizados na agricultura. Apesar de ter tido seu uso descontinuado a partir da década de 60, ainda hoje é utilizado na preservação da madeira e em pesticidas, na produção de ligas não-ferrosas, na manufatura de semicondutores e na indústria de vidro, constituindo um fator importante de contaminação ambiental (ar, água e alimentos) (NLM/NIH, USA).

O As interfere na atividade de várias enzimas envolvidas na biossíntese do heme, alterando o perfil de porfirinas urinárias (GARCIA-VARGAS, HERNANDEZ-ZAVALA, 1996).

Em estudos populacionais realizados no México em áreas onde a água fornecida para a população apresentava níveis elevados de As foram observadas as seguintes alterações no metabolismo do heme:

- discreto aumento nas atividades das PBG-*desaminase* e URO-D dos eritrócitos;
- aumento da excreção total de porfirinas urinárias, devido ao aumento da COPRO III e URO III;
- aumento da relação COPRO/URO e da COPROIII/COPRO I;

Estes estudos sugerem a relação direta entre o aumento da atividade enzimática e porfirinas totais e concluem que a exposição crônica ao As leva a alterações na biossíntese do heme, mas os efeitos dependem das características da exposição ainda não bem definidas e estudadas (HERNANDEZ-ZAVALA, 1999).

Em estudos realizados na China, comparando-se os níveis de As e porfirinas urinárias em população exposta (áreas endêmicas) e não-exposta, concluiu-se que há uma correlação positiva dos níveis urinários de As com o aumento das porfirinas urinárias. Como a população exposta com idade menor que 20 anos já apresentava alterações nas porfirinas, conclui-se que o perfil de porfirinas urinárias tem potencial a ser utilizado como indicador biológico de efeito para exposição crônica ao As (WANG, 2002).

Num estudo realizado por APOSTOLI, SARNICO, BAVAZZANO, 2002, com o objetivo de avaliar trabalhadores expostos a As na indústria de vidro, correlacionou-se o perfil de porfirinas urinárias com os níveis de As nas diferentes formas encontradas (trivalente e pentavalente, ácido monometil arsônico, ácido dimetil arsênico e arsenobetaina). A exposição a As trivalente apresentou correlação com aumento na excreção urinária de URO e PENTA, assim concluiu-se que o aumento na excreção urinária de algumas porfirinas é compatível com a inibição da URO-D na biossíntese do heme e pode ser útil para detectar efeitos precoces ou susceptibilidade ao As.

2.3.2.2. Mercúrio (Hg)

A mineração mundial de Hg (na forma de sulfeto mercúrico) é estimada em aproximadamente 10.000 toneladas por ano (WHO, 1990).

O Hg na forma elementar é utilizado em barômetros, termômetros, hidrômetros e pirômetros. As principais utilizações tanto na forma elementar como na forma de compostos inorgânicos são:

- 50% em produtos elétricos como baterias secas e bulbos de lâmpadas fluorescentes;
- 25% em preparações eletrolíticas (indústria de cloro-álcalis);
- 12% na manufatura de tintas;
- 3% preparações para uso odontológico;
- em menor quantidade: pesticidas (tratamento de sementes), usos gerais laboratoriais e compostos farmacêuticos (na forma de compostos mercuriais).

As alterações que aparecem no padrão de excreção de porfirinas urinárias durante a exposição prolongada ao Hg são atribuídas principalmente ao acúmulo de Hg^{2+} no rim. O Hg altera o metabolismo das porfirinas nas células renais dos túbulos proximais, levando a um padrão de excreção de porfirinas urinárias alterado (PINGREE *et al.*, 2001). Estudos realizados em ratos expostos a Hg de forma prolongada, tanto na forma elementar como na forma de compostos mercuriais, na forma de metilmercúrio, apresentaram um aumento na excreção de PENTA e COPRO e o aparecimento de uma fração atípica entre estas duas frações, denominada de pré-coproporfirina, sendo que estas alterações foram correlacionadas como a dose e duração da exposição, persistindo por 20 semanas cessada a exposição (WOODS, 1993).

Na tentativa de avaliar a utilização do padrão de porfirinas urinárias com a exposição a Hg elementar, foi realizado um estudo em dentistas em que se observou que aqueles que apresentavam níveis de Hg acima de 20 $\mu g/L$ tinham um aumento de excreção de PENTA e COPRO três vezes

acima dos dentistas que não tinham Hg detectável pela análise urinária. Nos dentistas considerados expostos a Hg também apareceu a fração atípica semelhante àquela encontrada em estudo com ratos, a pré-coproporfirina. Quando foram utilizadas urinas de amostra isolada e corrigidas pela creatinina, o mesmo padrão se observou, levando a crer que o padrão de porfirinas urinárias pode ser muito útil como biomarcador de exposição ao Hg tanto em estudos populacionais como na prevenção de doenças relacionadas à exposição ocupacional (WOODS,1993).

Num estudo realizado em 52 trabalhadores expostos à Hg orgânico e inorgânico, 23% apresentaram níveis elevados de COPRO urinário comparado com um grupo controle (GOLDWATER, JOSELOW, 1967).

2.3.2.3. Chumbo (Pb)

O Pb é um metal com as mais variadas utilizações. A principal utilização do Pb é na composição de baterias (86,9%), seguida por produtos metálicos (7,8%).

Os produtos metálicos incluem munição como balas para armas, produção de latão e bronze, revestimento de cabos, folhas de metais e soldas (US Department of Interior; U.S. Geological Survey, mineral information,1999).

A alteração da síntese do heme provocada pela exposição quer aguda ou crônica ao Pb é bem conhecida. A inibição da atividade da ALA-D tem correlação negativa com os níveis de Pb no sangue. O Pb também interfere com a atividade da COPRO-O e da *ferroquelase*. Esta última, responsável pela incorporação de Fe ao anel porfirínico, resultando num aumento de protoporfirina circulante e depressão na formação do heme. Como consequência ocorre a quelação do Zn no lugar do Fe e a formação de zinco-protoporfirina (ZPP) (CASARETT, 1996).

Estas inibições enzimáticas na biossíntese do heme provocam o aparecimento de zinco-protoporfirina (ZPP) nos eritrócitos e aumento nos níveis urinários urinário de ALA e COPRO. A intoxicação pelo Pb é classificada como uma porfirinúria secundária, apresentando similaridade com as porfirias agudas (DANIELL *et al.*, 1997) (Tabela VI).

Tabela VI - Relação de porfirias com as alterações originadas na exposição ao Pb (DANIELL,1997)

Porfirias	Herança Genética	Inibição Enzimática	Principal Origem do Precursor do Heme		Padrão de Sintomas	
			Eritropoética	Hepática	Aguda	Crônica
ADP	AR	ALA-D	desconhecida	desconhecida	+	
AIP	AD	PBG <i>desaminase</i>		+	+	
CEP	AR	URO III <i>sintase</i>	+	+		+
PCT	AD	URO-D		+		+
	adquirida	URO-D		+		+
HEP	AR	URO-D	+	±		+
HCP	AD	COPRO-O		+	+	
VP	AD	PROTO-O		+	±	±
EPP	AD	<i>ferroquelase</i>	+	±	±	+
Intoxicação Pb	adquirida	ALA-D COPRO-O <i>ferroquelase</i>	+	+	+	+

+usualmente presente ± presença variável

2. 4. Valores de referência de porfirinas urinárias

2.4.1. Conceito de valores de referência e intervalo de referência de bioindicadores

Os valores de referência (VR) de bioindicadores são valores da concentração do xenobiótico, de seu metabólito ou de qualquer parâmetro bioquímico relacionado à exposição ao toxicante detectados em indivíduos não-expostos ocupacionalmente aos mesmos (OLIVEIRA, SIQUEIRA, 2003).

Intervalo de referência é o que contém a maioria dos valores de referência da população, geralmente compreende 95% dos resultados (OLIVEIRA, SIQUEIRA, 2003).

2.4.2. Tipo de coleta de urina para valores de referência de porfirinas urinárias

2.4.2.1. Coleta de amostra de urina de 24 horas

Em laboratórios de análises clínicas, em geral, a solicitação da análise de porfirinas urinárias tem a intenção de detectar patologias já instaladas no indivíduo e é realizada em urina de 24 horas, considerando que a excreção é variável ao longo do dia. Neste contexto, o significado está associado à ausência de doença (APOSTOLI, 1999).

FORD, OU, ELLEFSON, 1981; NUTTALL, PINGREE, ASHWOOD, 1996, a Clínica Mayo, 2005 (Minnesota, USA) e a Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (DLC-HCFMUSP, 2005) adotam diferentes valores de referência para as frações de porfirinas urinárias obtidas na análise cromatográfica de urina com coleta de 24 horas (Tabela VII)

Tabela VII – Valores de referência adotados para frações de porfirinas em coleta de 24 horas

URO μg/dia	HEPTA μg/dia	HEXA μg/dia	PENTA μg/dia	COPRO μg/dia	Referência
23,6 - 52,3	ND	ND	ND	126,8- 208,0	NUTTALL, PINGREE , ASHWOOD, 1996
3-25	0-7	0-6	0-6	homens:25-150 mulheres:8-110	CLÍNICA MAYO, 2005
<25	<8	<8	<8	homens:25-150 mulheres:8-110	DLC-HCFMUSP, 2005
8-44	0-12	0-5	0-4	10-109	FORD, OU, ELLEFSON, 1981

2.4.2.2. Coleta de amostra isolada de urina como indicador biológico de efeito na exposição a agentes porfirinogênicos

Indicadores biológicos são parâmetros que podem estar alterados em consequência da interação entre um agente químico e o organismo. Estes devem ter a característica de se relacionar proporcionalmente à intensidade de exposição e/ou à intensidade de efeitos. Os indicadores podem ser de dose interna ou de efeito (OGA, 1996).

A monitorização biológica através da dosagem de indicadores biológicos de efeito tem o objetivo de detectar a exposição ao toxicante em estágios precoces e presumivelmente reversíveis. Em outras palavras mede uma grandeza que evidencia um efeito direta ou indiretamente relacionado com a exposição ao agente químico (OGA, 1996).

As frações das porfirinas eliminadas pela urina são proporcionais à sua concentração no fígado, e o padrão de excreção urinária das porfirinas reflete o padrão deste órgão (DELLA ROSA, MENDES, 1993).

A coleta de amostra isolada de urina e corrigida pela creatinina tem sido o material de escolha para os indicadores biológicos utilizados na monitorização de exposições ocupacionais a diversos toxicantes (Manuais de Legislação Atlas, 1996).

BURATTI *et al.*, 1987, realizaram um estudo em 78 indivíduos do sexo masculino a fim de estabelecer o valor de referência das frações URO e COPRO das porfirinas urinárias totais em amostras isoladas. A correção pela creatinina foi realizada apenas para porfirinas totais. A Tabela VIII demonstra os resultados obtidos para porfirinas totais em termos de média, mediana e desvio padrão. Os resultados de URO e COPRO foram apresentados em $\mu\text{g/L}$ sem a correção pela creatinina.

Tabela VIII - Valores de média, mediana e dp de porfirinas urinárias em amostra isolada (BURATTI *et al.*, 1987).

Porfirinas totais ($\mu\text{g/g}$ de creatinina)	
m	50,5
mediana	48,0
dp	19,9

3. OBJETIVO

Tendo em vista a importância do conhecimento de valores de referência para as diferentes classes de porfirinas eliminadas fisiologicamente pela urina, o objetivo deste trabalho é:

- Validar uma metodologia para análise de URO, HEPTA, HEXA, PENTA e COPRO numa mesma corrida cromatográfica.
- Estimar os valores de referência e o perfil de porfirinas urinárias em amostra isolada e corrigida pela creatinina, numa população não-exposta a agentes químicos porfirinogênicos em indivíduos da cidade de São Paulo, Brasil.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Materiais

4.1.1. Soluções-padrão

Foi utilizado como padrão um calibrador de porfirinas comercial que consiste num liofilizado de urina humana da Immundiagnostik (Bensheim, Alemanha KC3601ka) com concentrações especificadas de URO (8-carboxil porfirina), HEPTA (7-carboxil-porfirina), HEXA (6-carboxil porfirina), PENTA (5-carboxil porfirina), COPRO I e III (4-carboxil porfirinas) e mesoporfirina IX (Tabela IX). Este material foi armazenado em temperatura abaixo de -8°C , conforme recomendações do fabricante, até o momento do uso.

A partir do material liofilizado foi preparada a solução-mãe ressuspendendo o liofilizado no dia do uso com água grau I (NCCLS National Committee for Clinical Laboratory Standards C3-A3, 1997) acidificada com HCl 100mM. As concentrações obtidas, fornecidas pelo fabricante, estão descritas na Tabela IX.

Tabela IX - Concentrações das frações de porfirinas do calibrador comercial utilizado para a validação da metodologia

Fração	µg/L
URO	90,8
HEPTA	86,9
HEXA	88,8
PENTA	118,8
COPRO	187,2

As soluções para determinar a linearidade foram preparadas em diferentes concentrações a partir da diluição do liofilizado com solução de HCl 100mM.

4.1.2. Reagentes e outros materiais

- acetato de amônio p. a (Synth, SP, Brasil);
- tampão de acetato de amônio 1 M, pH 4;
- frascos de polipropileno para coleta de urina com capacidade para 50 mL (J. Prolab, PR, Brasil);
- unidade filtrante descartável Millex HV 0,45 µm, membrana durapore PVDF, 13 mm diâmetro, não estéril Millipore® (MA, USA);
- tira indicadora de pH 0-14 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha);
- metanol grau HPLC (Em Science, NJ, USA em associação com Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha);
- ácido acético glacial e HCl (37%) foram obtidos da Néon;

- controle comercial liofilizado de urina humana da Immundiagnostik (Bensheim, Alemanha).

4.1.3. Equipamentos e acessórios

- tubos de polipropileno de 12x75 mm, volume de 5 mL (Cral Artigos para Laboratório São Paulo, Brasil);
- pipetas calibradas volume variável de 1-5 mL Jencons® (Scientific Ltd, Beds, Grã-Bretanha) e 5-50 µL Transferpette® (Schott AG Ibérica, Sant Adria de Besos, Espanha);
- frascos para injeção automática de amostra de 200 µL e 1,5 mL (Shimadzu Co., Kioto, Japão);
- centrífuga não-refrigerada, modelo LS-II (CELM Cia. Equipadora de Laboratórios Modernos, São Paulo, Brasil);
- cromatógrafo líquido (Shimadzu Co., Kioto, Japão) composto de: 1 desgaseificador (DGU-2 A), 2 bombas (LC-10AD), controlador (SCL-10 A), forno de coluna (CTO-10 A), injetor automático (SIL-10A) e detector de fluorescência (RF-535) e integrador (CR7A PLUS);
- coluna de fase reversa LiChroCART® 100 RP-18 (12,5 cm x 14 mm e partícula de 5 µm) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha);
- pré-coluna LiChroCART® 100 RP-18 (4 cm x 4 mm partícula de 5 µm) (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha);
- hélio para desgaseificação dos eluentes da fase móvel.

As dosagens de creatinina urinária e a urinálise foram realizadas na Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - Serviço de Bioquímica Clínica (DLC-HCFMUSP).

A metodologia utilizada para dosagem de creatinina foi a reação de Jaffé pelo teste colorimétrico cinético e utilização de branco de amostra, no

analisador bioquímico Roche/Hitachi, modelo MODULAR PP (Roche Laboratory Systems, Mannheim, Alemanha).

A urinálise foi realizada em duas etapas:

a) Leitura semi-automatizada em analisador bioquímico (MIDRITON M Roche diagnóstica, Basiléia, Suíça) pelo princípio da reflectometria com comprimentos de onda de 555 nm, 620 nm e 660 nm para análise de 10 parâmetros da tira reativa: pH, gravidade específica, leucócitos, nitrito, proteínas, glicose, corpos cetônicos, urobilinogênio, bilirrubina, eritrócitos.

b) microscopia do sedimento a fresco em campo claro (aumento 100 e 400) onde foram observadas a presença e a contagem de células epiteliais, filamentos de muco, leucócitos, eritrócitos, cilindros, cristais e outros elementos.

4.1.4. População de referência

4.1.4.1. Características geográficas e ambientais da cidade de São Paulo

A população não-exposta foi de trabalhadores do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, moradores de diferentes regiões da cidade de São Paulo, bem como de cidades próximas consideradas pertencentes à Grande São Paulo.

A cidade de São Paulo (latitude 23° 32' 51" S, longitude 46 °38'10" W) está localizada no planalto Atlântico com uma topografia que varia de 650 a 1200 metros de altura. O sítio urbano apresenta uma altura de 715 a 900 metros e o clima pode ser resumido como seco no inverno e úmido no verão. A precipitação anual é de 1300 mm e a temperatura média varia entre 15-22°C (SUMITA, 2002).

A região metropolitana de São Paulo tem sua qualidade do ar determinada por um complexo sistema de fontes móveis (veículos automotores) e fixas (indústrias), pela topografia e condições meteorológicas da região. As emissões veiculares desempenham hoje um papel de destaque no nível de poluição do ar da cidade, as emissões industriais de dióxido de enxofre e material particulado são controladas e monitoradas pela CETESB (Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental). A CETESB possui uma rede automática de monitoramento da qualidade do ar em diferentes regiões da cidade de São Paulo que funciona desde 1981.

4.1.4.2. População estudada e fatores de exclusão

Foram obtidas amostras de 141 indivíduos entre 18 e 65 anos não-expostos a agentes porfirinogênicos no ambiente de trabalho (61 homens e 80 mulheres) e um indivíduo com PCT clinicamente definida que não pertencia à população de estudo. As amostras foram obtidas no período que compreendeu de julho a dezembro de 2004, abrangendo as estações de inverno e primavera.

Os indivíduos excluídos do estudo foram os que apresentaram valores de creatinina abaixo de 0,2 g/L e parâmetros bioquímicos e microscópicos para a urinálise alterados quando comparados com os valores de referência estabelecidos para o método (DLC-HCFMUSP, 2005). No total da população, 15 voluntários foram excluídos do estudo: 4 apresentaram glicose positiva na urina, 5 apresentaram sangue positivo na leitura da tira e presença de hemácias na leitura microscópica do sedimento, 4 indivíduos coletaram urina com creatinina abaixo de 0,2 g/L, e 2 eram portadores de hemoglobinopatias, ocorrência que seria uma das causas de porfirinúrias secundárias. Portanto, o número de indivíduos da população cujos resultados estão incluídos nos valores de referência de porfirinas urinárias e frações foi de 126.

Foi coletada a segunda urina da manhã, entre 8 e 10 horas em recipiente plástico e revestido em papel alumínio a fim de proteger da luz. Após a dosagem de creatinina e a urinálise, as amostras foram alíquotadas com bicarbonato de sódio 5 g/L a fim de manter o pH por volta de 9, em freezer abaixo de -8°C.

Foi utilizado um questionário a fim de coletar informações sobre sexo, idade e hábitos (tipo de dieta, tabagismo, ingestão de álcool e atividades de lazer), área de residência com relação ao grau de urbanização e a intensidade do tráfego, o tipo de atividade ocupacional, utilização de medicamentos e se o indivíduo era portador de alguma hepatopatia ou nefropatia (ANEXO B). Em todas as amostras foram realizadas urinálise e a dosagem de creatinina.

A população de estudo foi classificada por idade, sexo, tipo de atividade ocupacional, hábito de fumar e consumir bebidas alcoólicas.

O tipo de atividade ocupacional foi dividido em 2 grupos: técnicos e administrativos. Foram considerados como pertencentes ao grupo de técnicos os profissionais que executam diretamente as análises laboratoriais, tais como: farmacêuticos, biólogos e técnicos de laboratório. O grupo ao qual foi atribuída atividade administrativa foram os profissionais que exercem funções de administração, suporte e apoio às análises laboratoriais como médicos patologistas, profissionais ligados à enfermagem, informática, oficiais administrativos, manutenção e auxiliares de limpeza.

Os fumantes foram classificados em 4 grupos, pelo número de cigarros consumidos: <5; 5–10; 11–20 e >20. Os não-fumantes em 2 grupos: não-fumantes e ex-fumantes (aqueles que deixaram o hábito há mais de 6 meses).

Para o consumo de álcool a classificação foi: abstinência (nunca consome), consumo eventual (1 a 2 vezes por semana <20g por semana, bebidas com concentração alcoólica menor que 12%v/v) e consumo habitual (mais de 2 vezes por semana incluindo bebidas com concentrações alcoólicas variadas de 2-6%, como a cerveja, até 35-45%, no caso dos destilados).

O protocolo foi aprovado pela Comissão de Ética da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo onde foi realizado o trabalho experimental e pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (ANEXO A).

4.1.4.3. Dimensionamento da amostra e análise estatística

O dimensionamento da amostra foi baseado nas recomendações da IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) (POULSEN, HOLST, CHRISTENSEN, 1997) e da NCCLS C28-A (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1995) que recomendam uma amostra de pelo menos 120 indivíduos para cálculo de intervalo de referência (ou confiança) para 95% da população.

Após a análise do perfil de porfirinas, as frações URO, COPRO e porfirinas totais (somatória de URO+COPRO) foram analisadas separadamente. Os dados obtidos foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov para verificar a normalidade da distribuição com um nível de significância de 5%. A dispersão e distribuição dos dados foram ilustradas através de gráficos de dispersão e histogramas. Para os resultados obtidos foram calculados e apresentados em forma de tabela os seguintes parâmetros:

- a) "m" média;
- b) mediana;
- c) "dp" desvio padrão;
- d) média \pm 2 dp;
- e) IC 95% da população representado, intervalo compreendido entre os percentis 2,5 e 97,5% da população

f) intervalo experimental, delimitado pelo menor e maior valor observado;

g) intervalo de incerteza, delimitado por média + 2dp e pelo maior valor observado.

A comparação para detectar diferenças estatisticamente significantes entre os grupos foi realizada em termos de atividade ocupacional, tabagismo, faixa etária e consumo de álcool. Foi aplicado o teste de Mann-Whitney (CONOVER, 1980) para comparar grupos. Para o consumo de álcool, como as variáveis foram estratificadas em 3 grupos, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis. O nível de significância do teste adotado foi igual a 5% (0,05). Para análise dos dados foi utilizado o “SOFTWARE” SPSS (Statistical Package for the Social Sciences).

4.2. Desenvolvimento da metodologia de dosagem de porfirinas urinárias por CLAE/detector de fluorescência

4.2.1. Padronização do método

A princípio o método foi desenvolvido em 2001 (ALVES, *et al.*, 2003) utilizando-se um conjunto diagnóstico comercial para dosagem de porfirinas urinárias por CLAE Immundiagnostik (Bensheim, Alemanha) constituído por eluentes denominados de A e B (A=solução tampão de pH próximo a 5 e B=solvente orgânico); calibrador e controles alto e baixo liofilizados; solução de HCl 25% e solução para reconstituição do calibrador. Apesar dos resultados obtidos na validação terem apresentado linearidade de até 120 µg/L e limite de detecção de 2,5 µg/L para todas as frações, ao longo do tempo ocorreram problemas de fornecimento e conservação dos eluentes por parte do fornecedor.

A partir de um estudo dos eluentes utilizados em metodologias para dosagem de porfirinas urinárias por CLAE (vide Tabela X), foi desenvolvido um método adaptado de SUNYER *et al.*, 2002, em que foram utilizados como eluentes metanol e tampão de acetato de amônio 1 M, pH 4. Nesta metodologia as frações URO, HEPTA, HEXA, PENTA e COPRO (somatória de COPRO I e III) puderam ser identificadas e quantificadas numa mesma análise cromatográfica.

Tabela X - Eluentes encontrados na literatura para dosagem de porfirinas urinárias por CLAE

Fase Móvel	Referência
A=metanol	FORD, OU, ELLEFSON, 1981
B=fosfato de sódio pH 3,5 sem gradiente	
A= acetonitrila	SUNYER <i>et al.</i> , 2002
B= acetato de amônio 1M, pH 5,16 com gradiente	
A= metanol 650 mL/L em tampão fosfato pH 3,0	SCHREIBER, RAISYS, LABBÉ, 1983
B= metanol 850 mL/L em tampão fosfato pH 3,0 com gradiente	
A=metanol	JOHNSON, PERKINS, KENNEDY, 1988
B= tampão fosfato de sódio 0,1 mol/L, pH 3,5 com gradiente	

4.2.2. Preparo da amostra

Após o descongelamento das amostras foi retirada uma alíquota de 2 mL, acidificada com HCl 37% a pH <3,0 e centrifugada. O sobrenadante foi submetido a uma filtração com porosidade de 0,45 μ m diretamente para o frasco de amostra para injeção automática no equipamento (vide Figura 5).

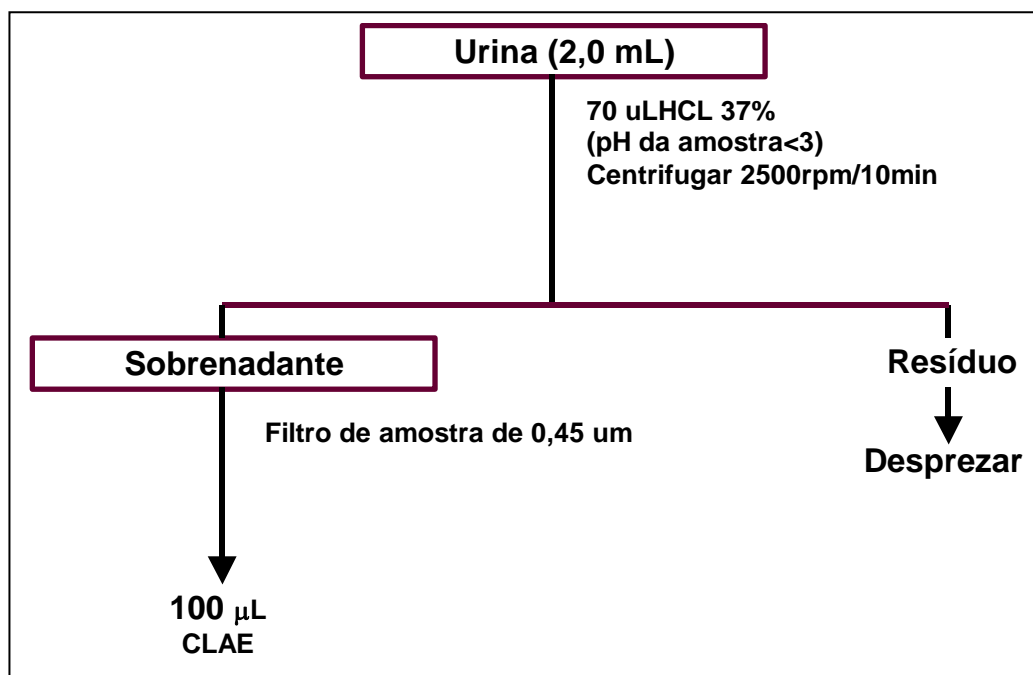


Figura 5 - Fluxograma do procedimento para a preparação de amostras

4.2.3. Condições cromatográficas

- Volume de amostra, 100 μ L
- Fluxo 1 mL/min
- Tempo total de análise = 21 minutos

Programa com gradiente passando de 10 a 95% de metanol em 14 minutos (vide Tabela XI). O programa de gradiente utilizado teve como objetivo separar as frações das porfirinas às custas das diferenças de polaridade devido ao número de carboxilas.

- Detector de fluorescência foi programado para excitação de 400 nm e emissão de 620 nm.

Tabela XI - Programa de gradiente utilizado para a separação das frações de acordo com a polaridade

Tempo (minutos)	% de Metanol	% de Tampão Acetato de Amônio, 1 M, pH 4
0,01	10	90
14,00	95	5
15,00	95	5
18,00	10	90
20,00	10	90
21,00	fim	-

4.2.4. Validação do método

A validação do método foi baseada nos princípios gerais da padronização de um ensaio em métodos cromatográficos (ANVISA, 2003; CHASIN, CHASIN, SALVADORI, 1994; SHAH, MIDHA, DIGHE *et al.*, 1992) que consiste no estabelecimento da linearidade, precisão intra e interensaio, limite de detecção, limite de quantificação e estabilidade da substância na matriz.

4.2.4.1. Linearidade

O estudo da linearidade foi realizado a partir da diluição da solução de calibrador em 6 concentrações diferentes das frações URO, HEPTA, HEXA, PENTA e COPRO. Estas foram submetidas à análise cromatográfica em triplicata.

A curva de calibração foi submetida a um tratamento estatístico em que foram calculados o desvio padrão e o coeficiente de variação (CV) de cada ponto. O intervalo dinâmico, isto é, a faixa linear utilizável, foi calculado até a concentração em que o CV para a triplicata era no máximo 10%. As curvas de calibração foram construídas e os coeficientes de correlação de Pearson (r^2) e as respectivas equações de regressão linear foram estimados.

4.2.4.2. Limite de quantificação e detecção

Baseado no princípio em que o limite de quantificação (LOQ) é a menor concentração precisamente medida e que deve estar incluída na

curva de calibração (ANVISA, 2003; CHASIN, CHASIN, SALVADORI, 1994), utilizou-se o critério de reprodutibilidade de resposta (precisão), que consiste em analisar uma série de amostras contendo quantidades decrescentes do analito. O LOQ foi a menor concentração que apresentou um CV que não excedeu o limite de 10%.

O limite de detecção (LOD) é a menor concentração da substância em análise que o processo analítico pode diferenciar, relacionados à linha de base do detector cromatográfico (ANVISA, 2003; CHASIN, CHASIN, SALVADORI, 1994). Baseado neste conceito o LOD foi calculado pela concentração que equivaleria a uma área de 500 na análise cromatográfica, conforme o programa fixado para esta análise.

4.2.4.3. Precisão intra e interensaio

A precisão intra-ensaio foi determinada indiretamente pelo cálculo do CV. O estudo foi conduzido analisando-se urinas com concentrações conhecidas de URO, HEPTA, HEXA, PENTA e COPRO com concentrações de 79, 93, 98, 81 e 141 μ g/L respectivamente com 5 repetições para cada concentração.

A precisão interensaio foi também estimada pelo cálculo do CV com amostras analisadas em 4 dias diferentes. Foi calculada para as frações URO e COPRO.

4.2.4.4. Estabilidade dos analitos na matriz

A estabilidade dos analitos na matriz foi testada para as frações URO e COPRO para amostra conservada em geladeira (2-8°C) em pH fisiológico de urina (pH 5-6) e em pH 9, com conservante alcalino. Para as amostras

conservadas em freezer ($< -8^{\circ}\text{C}$) foi testada a estabilidade em pH 9. Os resultados obtidos ao longo de 7, 14, 21, 30 e 60 dias estão representados em termos de % de perda ou ganho em relação à concentração de URO e COPRO obtida no tempo zero dias. Para as amostras conservadas em geladeira o teste foi realizado por 7 dias.

4.2.4.5. Sistema de qualidade e controle de qualidade

O controle de qualidade do experimento é um item contemplado pelo sistema de qualidade. Durante as análises foi realizado o controle de qualidade com o controle comercial C2 Immundiagnostik (Bensheim, Alemanha KC3601ka).

Os parâmetros de validação e as análises foram efetuados num laboratório com certificação NBR ISO 9001:2000. A certificação pressupõe que exista uma uniformidade na realização do experimento no que diz respeito a prazo de validade de materiais, rastreabilidade, controle de qualidade, validação de processos e equipamentos, manutenção e calibração de instrumentos.

5. RESULTADOS

Neste módulo serão apresentados inicialmente os resultados da validação do método analítico desenvolvido e adaptado para as condições técnicas, com os cromatogramas e os perfis característicos de porfirinas urinárias.

A seguir serão apresentados os resultados obtidos para o perfil de porfirinas em população não-exposta a agentes químicos porfirinogênicos e os valores de referência de URO, COPRO e porfirinas totais, estimados para a população estudada após tratamento estatístico. Os resultados obtidos também foram estratificados para os grupos de sexo, faixa etária, hábito de fumar, ingestão de álcool e atividade ocupacional e foram comparados estatisticamente por metodologia descrita no item correspondente.

5.1. Cromatogramas característicos do perfil de porfirinas urinários

Na Figura 6 é apresentado o perfil cromatográfico obtido com o padrão de porfirinas contendo concentrações conhecidas das frações: URO, HEPTA, HEXA, PENTA E COPRO na seqüência do tempo de retenção menor para o maior. A fração de MESO (mesoporfirina IX) que aparece na amostra não foi quantificada, pois a concentração não foi fornecida pelo fabricante do padrão.

Na Figura 7 está apresentado o perfil obtido para indivíduos sadios e não-expostos a agentes porfirinogênicos em que aparece apenas a fração URO e COPRO. O perfil característico de um indivíduo que apresenta PCT está apresentado na Figura 8 com o destaque para a fração URO que aparece aumentada com relação ao perfil da Figura 7. A Figura 8 mostra o

cromatograma de um indivíduo não pertencente à população de estudo, com diagnóstico de PCT de causa desconhecida. Os níveis de URO e COPRO ficaram bem acima da faixa de estudo do método e a amostra foi diluída para que as frações pudessem ser quantificadas.

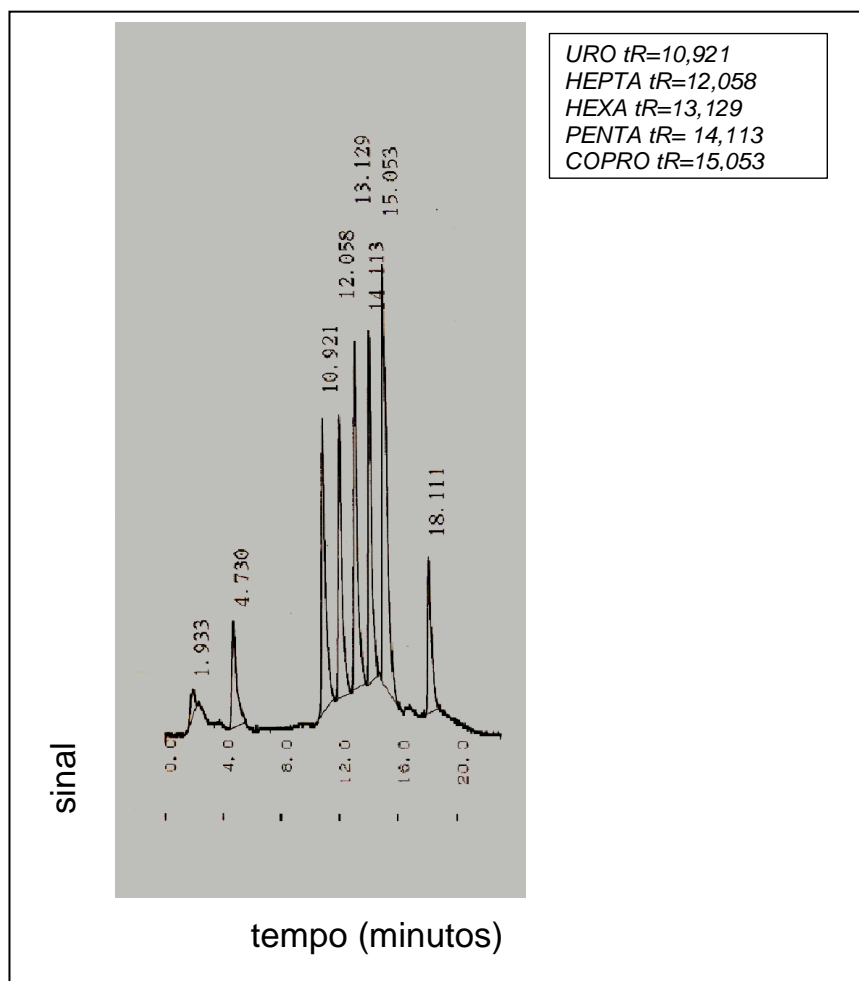


Figura 6 - Cromatograma do padrão de URO, HEPTA, HEXA, PENTA E COPRO com concentrações de 90,8; 86,9; 88,8; 118,8; 187,2 μ g/L respectivamente

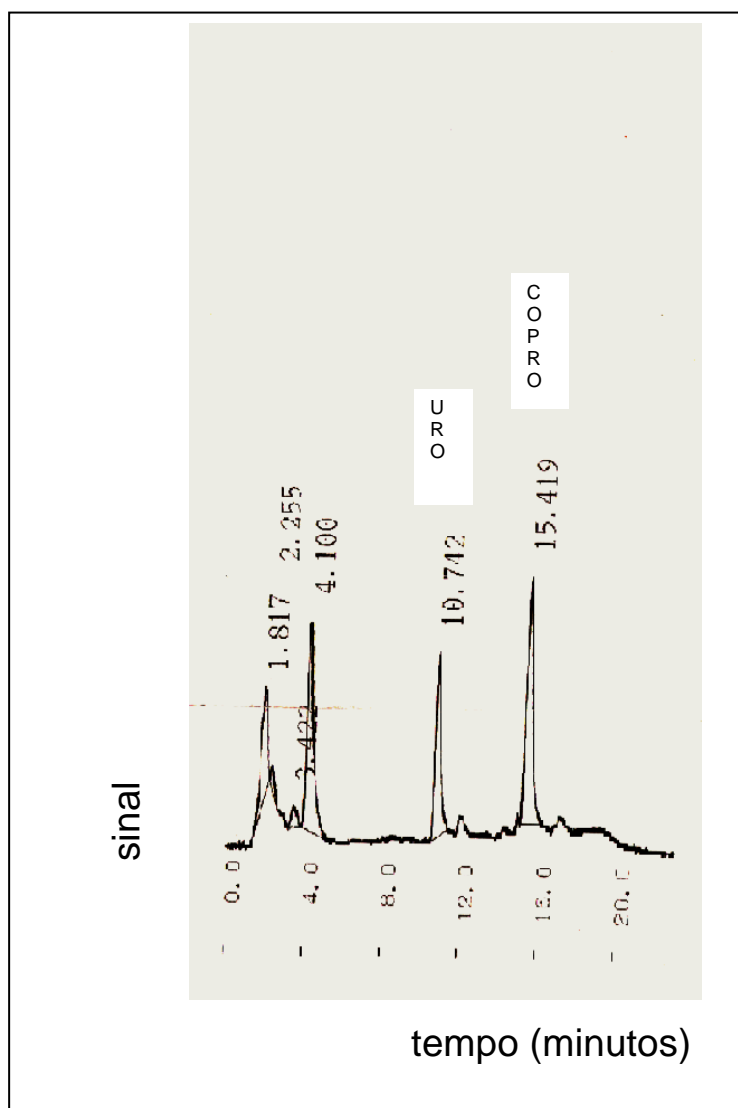


Figura 7 - Indivíduo não-exposto a agentes porfirinogênicos – Cromatograma de porfirinas urinárias com as frações URO e COPRO (tempo de retenção 10,742 e 15,419 min, respectivamente)

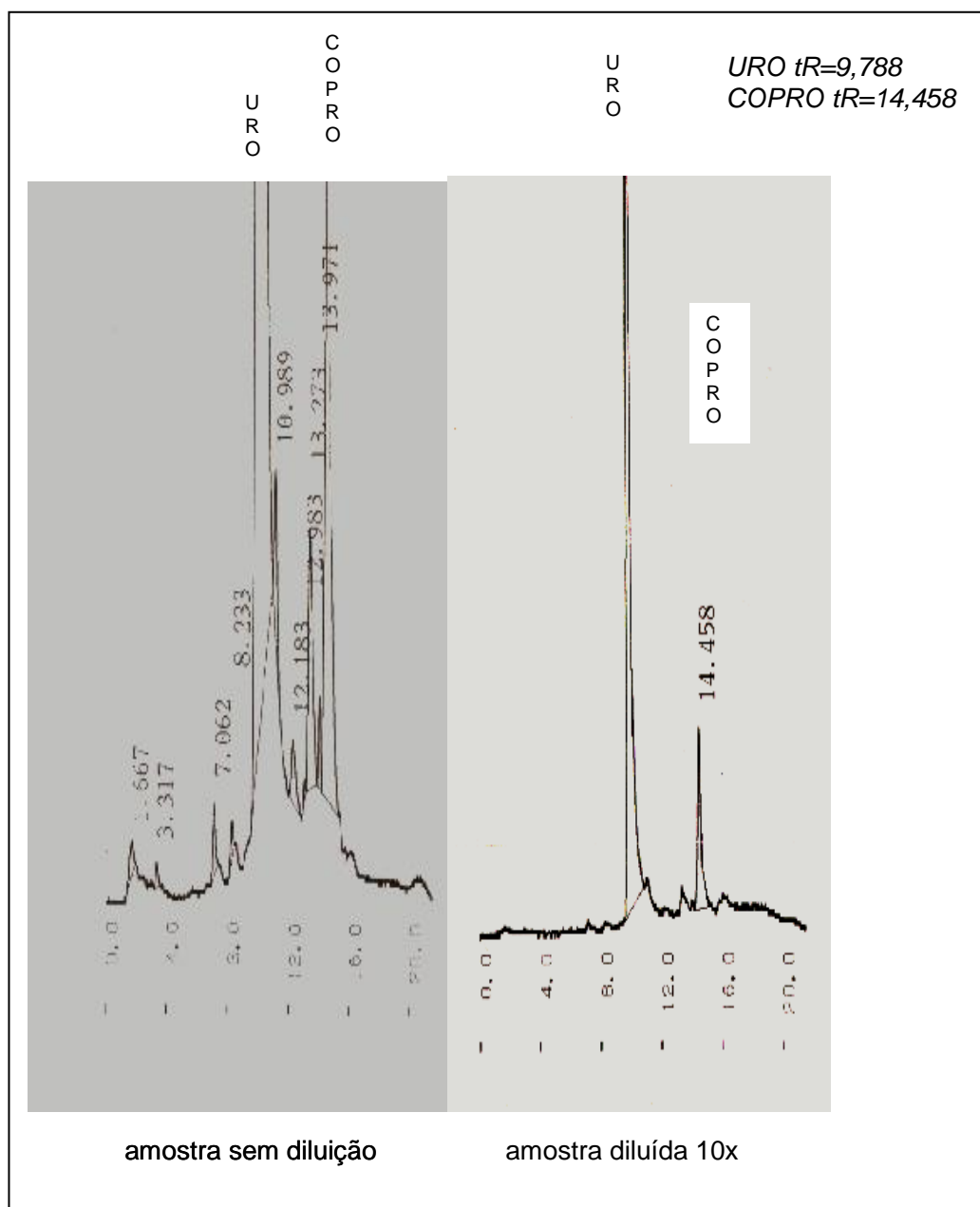


Figura 8 - Cromatogramas de porfirinas urinárias de um indivíduo não pertencente à população estudada com um perfil compatível com PCT

5.2. Resultados da validação do método para determinação das frações URO, HEPTA, HEXA, PENTA E COPROPORFIRINAS

5.2.1. Linearidade

O método, segundo os resultados, mostrou ser linear na faixa de concentração estudada para as diferentes frações das porfirinas. O coeficiente de correlação linear de Pearson (r^2) apresentou resultados próximos a 0,99; mostrando a linearidade do método para a faixa de estudo. Na Tabela XII estão expostos a faixa de concentração estudada, a correlação e a equação de regressão linear para as respectivas frações estudadas.

Tabela XII - Correlação e equação de regressão linear obtida para URO, HEPTA, HEXA, PENTA, COPRO na faixa de estudo

Fração	Faixa de Estudo (µg/L)	Correlação (r^2)	Equação de Regressão Linear
URO	7,4 - 90,8	0,998858	$y = 203,8x - 676,3$
HEPTA	6,8 - 86,9	0,999969	$y = 192,7x - 344,9$
HEXA	8,9 - 88,8	0,999827	$y = 168,6x - 377,0$
PENTA	8,5 - 118,8	0,999655	$y = 157,4x - 307,8$
COPRO	8,3 - 187,2	0,999543	$y = 119,0x + 409,9$

5.2.2. Precisão intra e interensaio

Os valores de precisão intra-ensaio, definido pelo CV dos 5 resultados obtidos para cada fração, estão descritos na Tabela XIII. Considerando-se que os resultados desejados para precisão, avaliado pelo CV obtido, devem ser menores que 15% (CHASIN, CHASIN, SALVADORI, 1994), os dados obtidos na validação desta metodologia apresentaram precisão adequada, variando de 3,8% para HEXA até 3,1% para PENTA na precisão intra-ensaio.

Tabela XIII - Valores de precisão intra-ensaio (CV%) obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de urina adicionadas com URO, HEPTA, HEXA, PENTA e COPRO

Precisão Intra-Ensaio CV (%)					
Fração	URO	HEPTA	HEXA	PENTA	COPRO
Concentração ($\mu\text{g/L}$)	79	93	98	81	141
CV (%)	3,3	3,2	3,8	3,1	3,5

Para a precisão interensaio determinada pelo cálculo do CV com amostras analisadas em 4 dias diferentes para as frações URO e COPRO, os resultados de CV ficaram abaixo de 5,1% (Tabela XIV).

Tabela XIV - Valores de precisão interensaio (CV%) obtidos com a aplicação do método proposto em amostras de urina adicionadas com URO e COPRO

(%)Precisão Interensaio CV		
FRAÇÃO	URO	COPRO
Concentração ($\mu\text{g/L}$)	65	128
CV (%)	5,1	2,1

5.2.3. Limite de quantificação e detecção

Os LOQ apresentados foram calculados de acordo com a reprodutibilidade da resposta, a menor concentração que não excedeu o CV de 10% para cada fração e o LOD pelo conceito relacionado à linha base e área mínima de leitura do detector e integração. Os dados obtidos atendem à aplicabilidade do método para determinar valores de referência de porfirinas urinárias e frações (Tabela XV).

Tabela XV - Limites de quantificação e detecção obtidos para as frações de porfirinas urinárias

Fração	URO	HEPTA	HEXA	PENTA	COPRO
LOQ ($\mu\text{g/L}$)	7,4	6,8	8,9	8,5	8,3
LOD ($\mu\text{g/L}$)	3,3	3,4	4,0	4,8	3,6

5.2.4. Estabilidade dos analitos na matriz

A concentração inicial da fração URO era de 81,1µg/L e a fração COPRO de 173,2µg/L. Tanto para a fração URO como para a COPRO a amostra conservada em freezer (abaixo de -8°C) em pH 9 apresentou estabilidade por pelo menos 60 dias, com variações obtidas dentro dos limites de precisão do método. Para a amostra conservada em geladeira em pH 5-6 e pH 9 a estabilidade testada por 7 dias apresentou uma perda próxima a 10% para conservação em pH fisiológico, para o pH 9 a amostra mostrou-se mais estável tanto para URO como para COPRO (Tabela XVI). Os dados obtidos mostram que a melhor estabilidade foi obtida para conservação em freezer em pH 9.

Tabela XVI – Estabilidade da amostra para a fração URO e COPRO conservada em freezer e geladeira em pH 5-6 e pH 9

Tempo (Dias)	Diferença de Concentração em % em Relação ao T=0, Fração URO			Diferença de Concentração em % em Relação ao T=0, Fração COPRO		
	Freezer pH9	geladeira pH5-6	geladeira pH 9	Freezer pH9	geladeira pH5-6	geladeira pH 9
0	0	0	0	0	0	0
7	+2	-10	-3	+3,9	-8	-6
14	-8	nd	nd	+6,5	nd	nd
21	+6	nd	nd	-6,5	nd	nd
30	-8	nd	nd	+6	nd	nd
60	-3	nd	nd	-1,4	nd	nd

t = tempo em dias

nd = não determinado

5.3. Dados demográficos da população de referência analisada

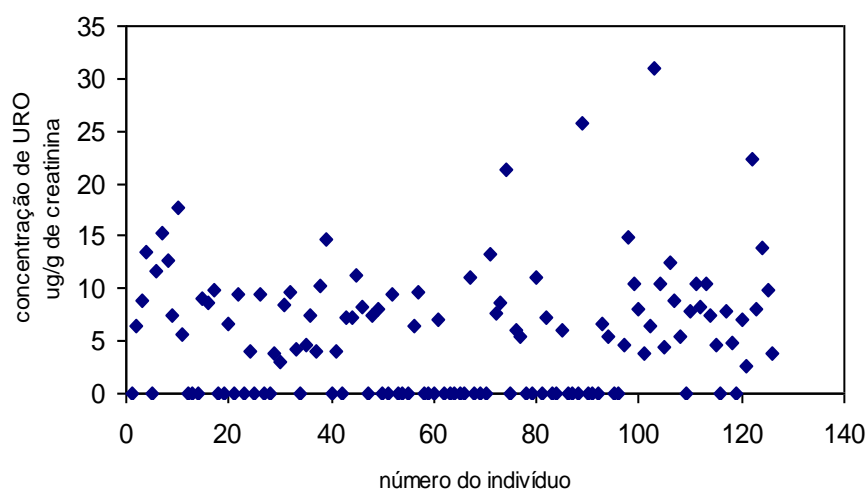
A Tabela XVII sumariza os dados demográficos da população total (n=126) com relação à idade, sexo, hábitos de tabagismo, consumo de álcool e atividade ocupacional. Há um predomínio da faixa de idade de 18 a 40 anos para a população de estudo. Com relação aos hábitos, o tabagismo ocorre com a frequência de apenas 13,5%, enquanto que o consumo eventual de álcool, 57,1%. Para as atividades técnicas há um predomínio dos indivíduos do sexo feminino (71,7%), o inverso ocorre para o sexo masculino com predomínio das funções administrativas (65,2%), resultando num equilíbrio em relação ao total de indivíduos da população de estudo que exercem atividades técnicas e administrativas.

Tabela XVII -Dados demográficos da população de voluntários com relação à idade, sexo, hábitos de tabagismo e atividade ocupacional

Dado Demográfico	Homens N=59	Mulheres N=67	Total N=126
Idade (m±dp)	39,5 ± 6,0 (19-59)	40,9±6,2 (18-65)	40,2±6,1 (18-65)
18-40 anos (m±dp)	41 (30,1±6,2)	31 (33,5±5,5)	72 (31,8±5,9)
>40 anos (m±dp)	18 (48,9±5,8)	36 (48,2±6,9)	54 (48,6±6,4)
<i>Consumo de Álcool</i>			
Abstêmio	18	24	42
eventual(<20g/semana)	32	42	74
habitual(>20g/semana)	9	1	10
<i>Tabagismo</i>			
não-fumantes	53	56	109
ex-fumantes	8	10	18
Fumantes	6	11	17
Fumantes (5-10 cigarros/dia)	2	3	4
Fumantes (11-20 cigarros/dia)	4	9	13
<i>Atividade Ocupacional</i>			
Técnica	16	43	59
Administrativa	43	24	67

5.4. Análise estatística dos dados obtidos das frações URO e COPRO e das porfirinas totais

A distribuição dos resultados obtidos para URO, COPRO e Porfirinas Totais (URO+COPRO) e o histograma estão ilustrados nas figuras 9, 10 e 11 respectivamente.



URO

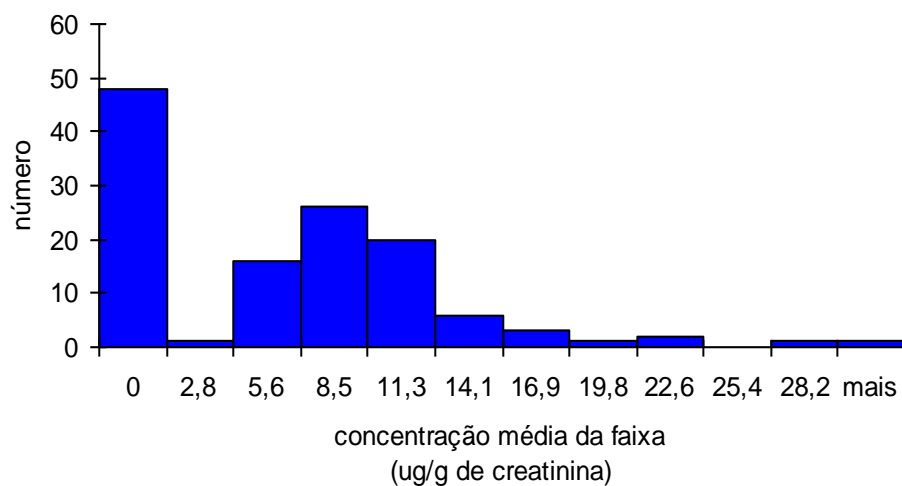
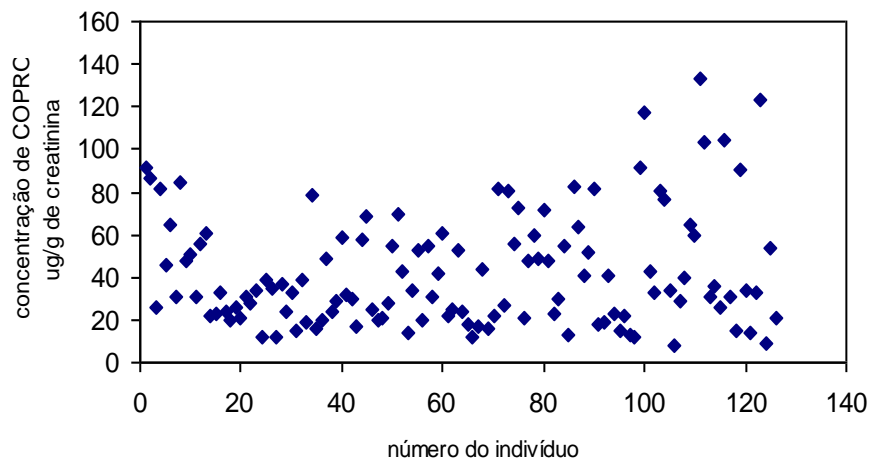


Figura 9 - Gráfico de dispersão e histograma obtido para URO na população de referência

Para URO, a maioria da população estudada está dentro da faixa de valor de referência calculado e apenas 4 amostras estariam acima deste valor, isto é, no intervalo de incerteza.



COPRO

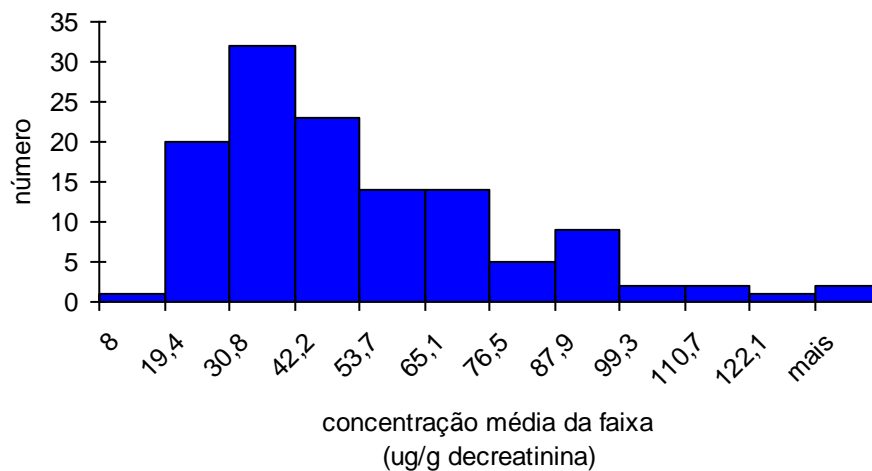
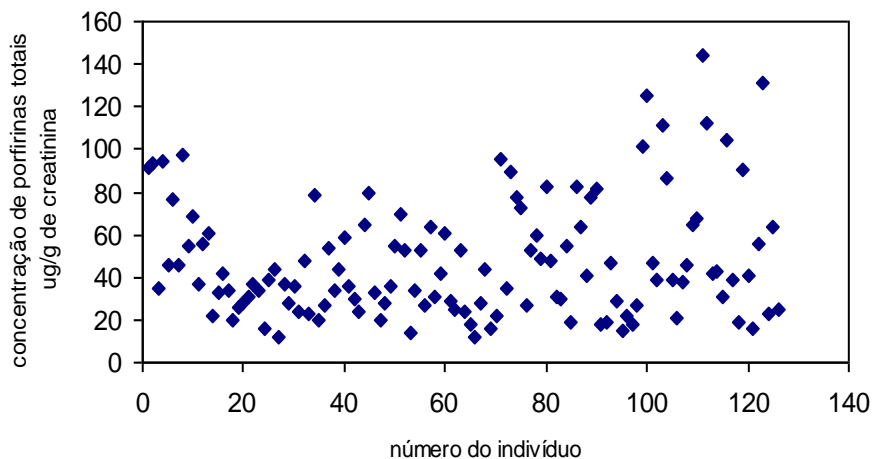


Figura 10 - Gráfico de dispersão e histograma obtido para COPRO na população de referência

Para COPRO, a maioria da população estudada está dentro da faixa de valor de referência calculado e apenas 5 amostras estariam acima deste valor, isto é, no intervalo de incerteza.



PORFIRINAS TOTAIS

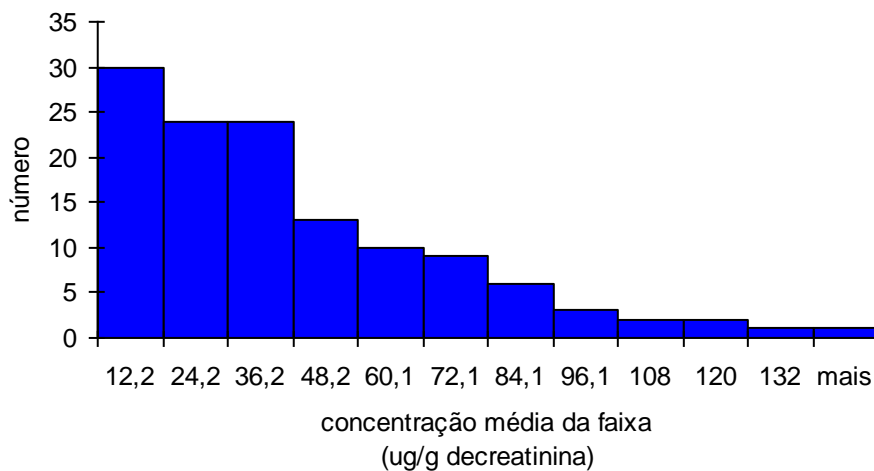


Figura 11 - Gráfico de dispersão e histograma obtido para porfirinas totais na população de referência

Para porfirinas totais, a maioria da população estudada está dentro da faixa de valor de referência calculado e apenas 5 amostras estariam acima deste valor, isto é, no intervalo de incerteza.

Os resultados do teste de Kolmogorov-Smirnov com um nível de significância de 5% (CONOVER, 1980) para as medidas de URO foi $p < 0,001$, para COPRO $p = 0,020$ e para porfirinas totais $p = 0,071$; apresentando evidência de que a distribuição não é gaussiana. Apenas as porfirinas totais apresentam evidência de normalidade dos dados, porém como o valor de “p” está muito próximo do nível de significância, os dados também foram tratados como não-paramétricos.

Os resultados obtidos na análise estatística dos dados obtidos para as frações URO e COPRO e porfirinas totais estão apresentados na Tabela XVIII.

Tabela XVIII - Análise estatística para as frações URO, COPRO e porfirinas totais para a população estudada

Fração	m	mediana	dp	$m \pm 2dp$	IC95% (P2,5-P97,5)*	Intervalo experimental	Intervalo de incerteza
URO	5,3	4,7	6,0	< 17,3	0 - 20,8	0-25,8	17,5-25,8
COPRO	42,8	34,0	26,4	< 95,6	22,0-104,2	7,4-133,6	95,6-133,6
Porfirinas totais	48,1	41,1	27,7	< 103,5	27,2-112,0	7,4-159,4	103,5-159,4

*P2,5-P97,5=intervalo compreendido entre o percentil 2,5-97,5%

Para a verificação da existência de variação nas medidas de URO, COPRO e porfirinas totais entre as categorias das variáveis observadas foram aplicados testes não paramétricos de Mann-Whitney (CONOVER, 1980), vide Tabelas XIX, XX e XXI.

Tabela XIX - Resultado dos testes Mann-Whitney para todas as observações para as medidas de URO

Variável	Categorias	Média	Desvio Padrão	Mediana	n	p-value
Sexo	F	5,30	6,08	4,55	67	0,921
	M	5,39	5,95	4,71	59	
Atividade ocupacional	Administrativa	5,42	6,24	4,63	67	0,949
	Técnica	5,25	5,75	5,72	59	
Tabagismo	Não fumante	5,14	5,82	4,55	109	0,510
	Fumante (>5 cigarros/dia)	6,41	7,24	7,22	17	
Faixa etária	<= 40 anos	5,17	4,42	5,60	72	0,499
	Mais de 40 anos	5,57	7,64	0,00	54	
Consumo de álcool	Abstêmios	5,42	5,35	5,71	42	0,857*
	Consumo eventual	5,13	5,85	4,48	74	
	Consumo habitual	6,55	9,43	4,30	10	
Total		5,34	5,99	4,67	126	

*Resultado do teste Kruskal-Wallis

Pela Tabela XIX, tem-se que não há variação nos valores de URO entre os grupos pareados de categorias, os valores de “p” são maiores que 0,05. Como em “consumo de álcool” há 3 categorias, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis.

Tabela XX - Resultado dos testes Mann-Whitney para todas as observações para as medidas de COPRO

Variável	Categorias	Média	Desvio Padrão	Mediana	n	p-value
Sexo	F	41,73	22,10	34,77	67	0,756
	M	43,98	30,75	33,83	59	
Atividade ocupacional	Administrativa	37,74	26,68	30,47	67	0,004
	Técnica	48,52	25,13	45,45	59	
Tabagismo	Não fumante	44,79	26,51	37,19	109	0,008
	Fumante (>5 cigarros/dia)	29,42	23,16	22,49	17	
Faixa etária	<= 40 anos	41,45	26,14	33,64	72	0,472
	Mais de 40 anos	44,57	26,93	38,43	54	
Consumo de álcool	Abstêmios	40,55	23,16	33,64	42	0,160*
	Consumo eventual	41,21	25,77	31,89	74	
	Consumo habitual	63,86	36,42	70,61	10	
Total		42,79	26,42	34,01	126	

*Resultado do teste Kruskal-Wallis

Pela Tabela XX, tem-se que há diferenças estatisticamente significantes entre os valores de COPRO para as atividades ocupacionais (Figura 12) e o hábito de fumar (Figura 13). O valor de COPRO para pessoas que realizam funções administrativas é estatisticamente menor do que quem realiza funções técnicas ($p=0,004$). Para fumantes, os valores de COPRO são menores do que para os não fumantes ($p=0,008$).

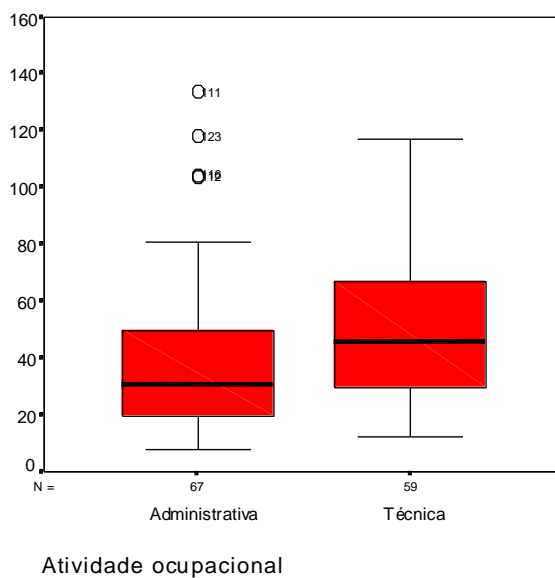


Figura 12 - “Box-and-whisker plot” para os níveis de coproporfirinas urinárias nas atividades administrativas e técnicas da população estudada da cidade de São Paulo, SP, Brasil

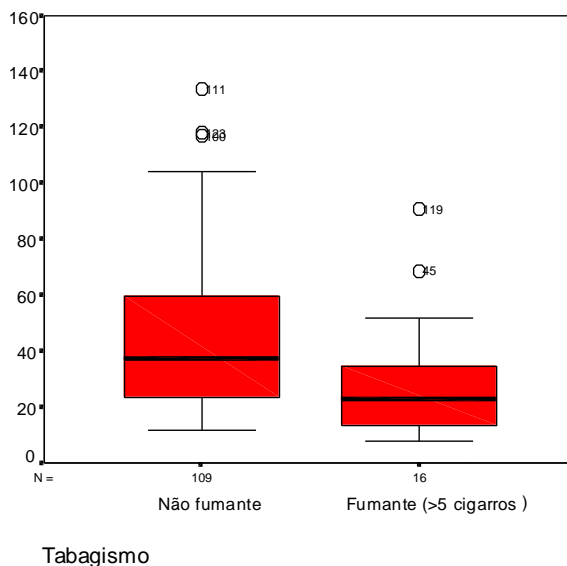


Figura 13 - “Box-and-whisker plot” para os níveis de coproporfirinas urinárias nas categorias de não-fumantes e fumantes (>5 cigarros por/dia) da população estudada da cidade de São Paulo, SP, Brasil

Tabela XXI - Resultado dos testes Mann-Whitney para todas as observações para as medidas de porfirinas totais

Variável	Categorias	Média	Desvio Padrão	Mediana	n	p-value
Sexo	F	47,03	23,33	42,87	67	0,782
	M	49,37	32,05	40,83	59	
Atividade ocupacional	Administrativa	43,16	27,83	34,85	67	0,007
	Técnica	53,77	26,59	47,31	59	
Tabagismo	Não fumante	49,93	27,82	43,48	109	0,019
	Fumante (>5 cigarros/dia)	35,84	24,87	27,18	17	
Faixa etária	<= 40 anos	46,62	27,62	40,03	72	0,394
	Mais de 40 anos	50,14	27,86	42,58	54	
Consumo de álcool	Abstêmios	45,97	25,11	39,00	42	0,160*
	Consumo eventual	46,34	26,33	40,46	74	
	Consumo habitual	70,41	39,20	75,79	10	
Total		48,13	27,66	41,10	126	

*Resultado do teste Kruskal-Wallis

Pela Tabela XXI, Figuras 14 e 15, tem-se que há diferenças estatisticamente significantes entre os valores de porfirinas totais entre as atividades ocupacionais e o hábito de fumar. A população de pessoas que realizam funções administrativas tem resultados de porfirinas totais menores do que a que realiza funções técnicas ($p=0,007$). Os fumantes possuem valores de porfirinas totais menores do que não fumantes ($p=0,019$).

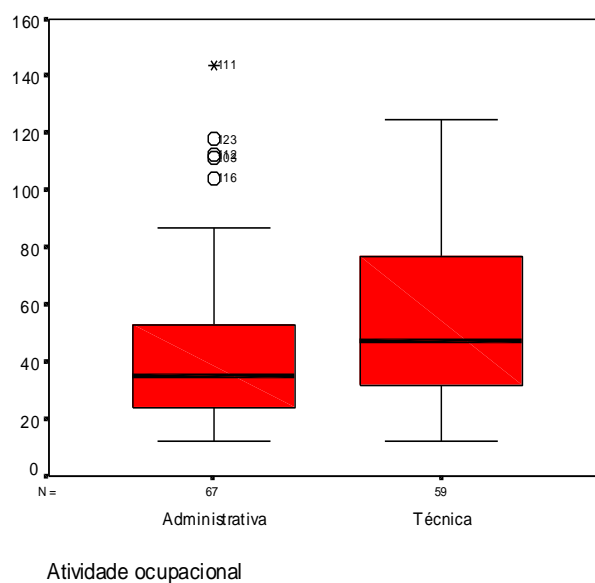


Figura 14 - “Box-and-whisker plot” para os níveis de porfirinas urinárias nas atividades administrativas e técnicas da população estudada da cidade de São Paulo, SP, Brasil

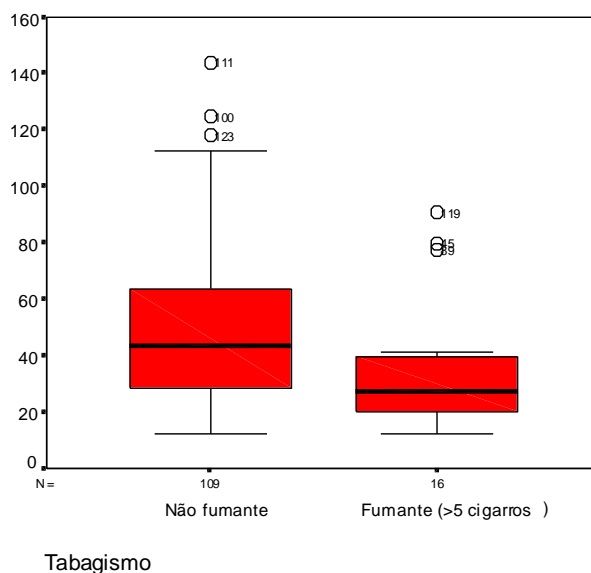


Figura 15 - “Box-and-whisker plot” para os níveis de porfirinas urinárias nas categorias de não-fumantes e fumantes (>5 cigarros por/dia) da população estudada da cidade de São Paulo, SP, Brasil

6. DISCUSSÃO

É evidente que a exposição ocupacional a agentes porfirinogênicos, como alguns organoclorados e metais pesados, pode desencadear alterações na biossíntese do heme. O fato dessa exposição desencadear porfirias do tipo hepática crônica é dependente das condições de exposição (DANIELL, 1997). É importante salientar que o aparecimento da porfiria também pode ter relação com a existência de um fator hereditário sem manifestação clínica que pode ser desencadeado pela exposição a estes agentes (DANIELL, 1997).

Diversos estudos da ação porfirinogênica do HCB em animais e em seres humanos já foram feitos, tanto para exposição ocupacional como acidental (ELDER, 1976; SELDEN *et al.*, 1999; MYLCHREEST, CHARBONNEAU, 1997; OZALLA *et al.*, 2002; SUNYER, 2002). Apesar da ação reconhecidamente porfirinogênica do HCB, os estudos realizados em diferentes condições de exposição não possibilitam a comparação do tipo de porfirinúria com os níveis de exposição a este. O PCP, as dioxinas e outros hidrocarbonetos halogenados também já foram responsáveis por desenvolvimento de PCT em exposição ocupacional e acidental (HRYHORCZUK, 1998, DANIELL *et al.*, 1997).

Quanto aos metais pesados, com relação ao As, diversos estudos realizados concluíram que há uma correlação positiva nos níveis de As e o aumento de porfirinas urinárias (WANG, 2002; APOSTOLI, SARNICO, BAVAZZANO, 2002). Para o Hg, estudos comparando população exposta e não-exposta comprovam a correlação dos níveis de Hg na urina com o aumento da fração COPRO e o aparecimento da fração atípica pré-coproporfirina (WOODS, 1993). Com relação ao Pb, já são bem conhecidas e estudadas as alterações que acarretam na biossíntese do heme (DANIELL *et al.*, 1997). As determinações de δ -ALA e de COPRO urinárias constituem indicadores biológicos de efeito do Pb sobre a síntese do heme (OGA,

1996). As enzimas *ferroquelase*, *ALA sintase* e *ALA desidratase* contêm grupos sulfidrilas e são altamente sensíveis à inibição por metais pesados (KING, MARCHESINI, 2005).

De acordo com estudos realizados, as porfirias adquiridas têm evolução crônica, que se inicia com uma coproporfinúria discreta, evoluindo para um aumento discreto de URO seguido de um aumento de URO e HEPTA concomitantemente até o aparecimento da PCT (ELDER, URQUHART, 1987; DOSS, KÜHNEL, GROSS, 2000). Estas fases podem ser identificadas na análise quantitativa das frações das porfirinas urinárias.

A maioria dos métodos utilizados para dosar porfirinas até a década de 70 era de extração com leitura espectrofotométrica da fração URO e das porfirinas totais. A fração COPRO era obtida por diferença das porfirinas totais e da fração URO e o limite de quantificação não era sensível o suficiente para detectar alterações discretas nos níveis de porfirinas urinárias (SCHREIBER, RAYSSIS, LABBÉ, 1983).

A partir da evolução do conhecimento das causas que podiam originar as porfirias, verificou-se que os indivíduos afetados, de acordo com a evolução e a causa da patologia, podiam apresentar alterações muito discretas nas frações de porfirinas. Estes níveis subclínicos só podem ser detectados através de metodologias mais sensíveis, como a CLAE com detecção de fluorescência pelo fato das moléculas de porfirina apresentarem fluorescência em comprimentos de onda específicos.

A metodologia selecionada foi adaptada do método proposto por SUNYER *et al.*, 2002, e o perfil de porfirinas urinárias foi determinado por CLAE com detecção por fluorescência. A característica de sensibilidade do método permitiu separar e quantificar 5 frações de porfirinas, condição necessária para estimar os VRs das frações de porfirinas encontradas em urina de população não-exposta.

No desenvolvimento da metodologia, foi utilizado inicialmente um conjunto diagnóstico da Immundiagnostik (Bensheim, Alemanha KC3601ka), com eluentes (tampão e metanol) e padrão. Estes eluentes apresentaram problemas na separação dos picos e optou-se por desenvolver uma

metodologia com tampão acetato de amônio 1M, pH 4 e metanol, cujo perfil de porfirinas urinárias mais se assemelhou ao determinado para o padrão, com a diferença de não apresentar a separação da fração COPRO e I e III. O programa de gradiente utilizado teve como objetivo separar as frações das porfirinas às custas das diferenças de polaridade devido ao número de carboxilas. Passando de 8 carboxilas na URO até 4 carboxilas na COPRO.

A validação da metodologia foi realizada segundo padrões recomendados pela literatura para métodos cromatográficos e apresentou resultados que garantem a confiabilidade nos resultados obtidos para a população estudada (ANVISA, 2003; CHASIN, CHASIN, SALVADORI, 1994; SHAH, MIDHA, DIGHE *et al.*, 1992).

ZUIJDERHOUDT *et al.*, 2000, em estudos de precisão da dosagem de porfirinas por CLAE encontraram CV menor que 15% para URO, HEPTA e COPRO; o que está de acordo também com os resultados obtidos neste trabalho. Os resultados de precisão intra-ensaio encontrados para esta metodologia são muito semelhantes ao relatados pelo fabricante do calibrador e controle Immundiagnostik (Kc 2601Ka Bensheim, Alemanha) quando se utiliza o conjunto diagnóstico comercial por eles fornecido (Tabela XXII).

Tabela XXII - Estudo comparativo de precisão intra-ensaio para dosagem de porfirinas urinárias por CLAE

Precisão Intra-Ensaio CV (%)					
<i>Frações</i>					
Origem	URO	HEPTA	HEXA	PENTA	COPRO
Conjunto Diagnóstico Immundiagnostik	1,9	3,8	3,7	3,5	3,5
Metodologia Aplicada	3,3	3,2	3,8	3,1	3,5

Os parâmetros estudados na validação da metodologia, bem como a realização num laboratório com certificação NBR ISO 9001: 2000, implicam em temperaturas de geladeira e freezer monitoradas continuamente, manutenção preventiva dos equipamentos, e também calibrações periódicas de pipetas e equipamentos por órgãos certificados, assegurando a qualidade do trabalho analítico e conseqüentemente a obtenção de resultados laboratoriais confiáveis.

A população de referência escolhida, moradores da cidade de São Paulo, tem a vantagem de possuir muitos descendentes de imigrantes da raça branca, amarela e também indivíduos mulatos, além de indivíduos originados da miscigenação destas raças. Esta população possui pessoas migrantes de diversas regiões do país, o que garante uma variabilidade populacional, uma importante característica para se estabelecer valores de referência.

A cidade de São Paulo é um importante centro urbano do país, altamente industrializado e com tráfego intenso. A CETESB utiliza o controle de indicadores de qualidade do ar aceitos universalmente como partículas totais em suspensão, partículas inaláveis e fumaça, dióxido de enxofre, dióxido de nitrogênio, monóxido de carbono e ozônio. O histórico destas ocorrências é relatado anualmente e boletins são emitidos diariamente. Apesar de não se conhecer até o presente qualquer tipo de ação porfirinogênica destes indicadores para o homem, é inegável a importância da caracterização, mesmo que de maneira genérica, do tipo de exposição ambiental a que a população estudada estava submetida no período de coleta.

Foram coletadas amostras de 141 indivíduos, conforme indicações da IFCC (International Federation of Clinical Chemistry) (POULSEN, HOLST, CHRISTENSEN, 1997) e da NCCLS C28-A (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1995), que recomendam uma amostra de pelo menos 120 indivíduos para cálculo de intervalo de referência (ou confiança) para 95% da população.

Foi aplicado um questionário a fim de caracterizar o sexo, idade, hábitos e atividades ocupacionais da população estudada. Este também permitiu pré-excluir indivíduos que poderiam ter porfirinúrias por causas já conhecidas, como: exposição a substâncias químicas porfirinogênicas na atividade ocupacional, etilismo, nefropatias, doenças hepáticas e hematológicas (VERDON, POLLOCK, BRALLEY, 2004). O questionário abrangia dados sobre o tipo de dieta: mista ou vegetariana e as condições de tráfego no local residencial que não foram utilizados na estratificação da população. A dieta vegetariana foi declarada por apenas 1,5% da população, portanto, não foi tratada como uma variável populacional importante. Com relação à intensidade de tráfego na região de moradia, as informações obtidas foram muito subjetivas, os indivíduos questionados possuíam percepções conflitantes com relação a este dado. Este fato pode ser atribuído ao grande número de opções que não ficaram muito esclarecidas para os indivíduos (vide questionário no ANEXO B).

Os dados demográficos da população estudada (n=126) revelam que esta possui um número relativamente equilibrado entre homens (n=59) e mulheres (n=67). Nas faixas etárias de estudo determinadas, há um discreto predomínio de indivíduos entre 18 e 40 anos. Para a atividade ocupacional, segmentada em técnica e administrativa, há um equilíbrio entre o número de indivíduos.

Com relação ao consumo de álcool, apenas 10 indivíduos declararam ser consumidores habituais (acima de 20g/semana). Em outros estudos epidemiológicos cita-se a dificuldade em obter dados confiáveis com relação a este tipo de hábito (SELDEN *et al.*, 1999). Como obtivemos um baixo número de consumidores habituais (8,6%) considero que tivemos a mesma dificuldade, talvez pelo tipo de questionário aplicado. Informações sobre o consumo de álcool é um dado importante visto que é uma das causas de PCT adquirida (SELDEN *et al.*, 1999).

Os fumantes, aparentemente, subestimam o número de cigarros consumidos por dia, visto que nenhum voluntário declarou consumo acima de 20 cigarros por dia o que corresponderia a um maço diário. O número de

fumantes, representado por apenas 17 indivíduos (13,5%), é pouco representativo.

O HCFMUSP possui em média 15.000 funcionários exercendo funções as mais variadas. A DLC-HCFMUSP é uma divisão ligada ao complexo e possui aproximadamente 350 funcionários. A adesão ao protocolo foi totalmente voluntária, mesmo porque os indivíduos têm fácil acesso a realizarem exames laboratoriais e, portanto, os que aderiram sabiam que estavam fornecendo material para a realização de uma análise sem valor de referência. Este fato é um dado importante, pois na maioria dos trabalhos populacionais a adesão gira mais pelo interesse de se fazer exames laboratoriais em população que não tem acesso fácil a este tipo de atendimento.

Com relação ao tipo de amostra, a urina de amostra isolada e corrigida pela creatinina tem sido o material de escolha para o acompanhamento de exposições ambientais e ocupacionais, devido à facilidade em ser coletada e armazenada (ALIMONTI, PETRUCCI, KRACHLER *et al.*, 2000). ENRIQUEZ DE SALAMANCA, 1995, concluiu que para uma avaliação inicial do metabolismo das porfirinas não é necessário coleta de urina pelo período de 24 horas. Realizou análise de porfirinas urinárias em 20 indivíduos, a intervalos de 4 horas e 6 períodos e não detectou variações significativas na excreção de porfirinas urinárias ao longo de 24 horas.

A coleta foi realizada entre 8 e 10 horas da manhã, com retenção urinária de pelo menos 2 horas, a fim de eliminar variáveis pré-analíticas. O frasco para coleta foi recoberto com papel alumínio, devido ao fato das porfirinas serem sensíveis à luz.

A urinálise foi realizada em menos de 24 horas após a coleta, e uma alíquota foi retirada para alcalinização e posterior dosagem de porfirinas, a fim de evitar perda na fluorescência das porfirinas. Conforme demonstrado no teste de estabilidade do método, a amostra conservada em pH alcalino apresentou melhor estabilidade. Em pH 5-6 apresentou uma perda próxima

a 10% para URO e 8% para COPRO após 7 dias de conservação em geladeira.

A análise de urina tipo I consiste numa série de provas seletivas e de detecção que permitem fazer uma triagem para uma variedade de enfermidades renais e do trato urinário. Os valores de referência admitidos foram os estabelecidos pelo Manual de exames DLC-HCFMUSP, 2005:

- caracteres físicos e químicos: pH 5.0-6.0; densidade 1,015-1,025; glicose: ausente; pigmentos biliares: ausentes; corpos cetônicos: ausentes; sangue: ausente; proteína: até 0.05 g/L; urobilinogênio: 0,2 a 1,0 mg/dL;
- sedimento: leucócitos até 10 p/campo; eritrócitos até 3 p/campo.

Os voluntários (n=15) que apresentaram resultados alterados em relação ao valor de referência foram excluídos do estudo.

A utilização de um indicador biológico, como o perfil de porfirinas urinárias, só tem valor quando comparado com referências apropriadas daquele mesmo indicador (OGA, 1996). O perfil de eliminação de porfirinas urinárias obtido poderia atender à recomendação da NR 7 - Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO), (Manuais de Legislação Atlas, 1996): “para trabalhadores expostos a agentes químicos que não constam da legislação outros indicadores poderão ser monitorizados, desde que se conheçam aspectos toxicológicos, metodologia analítica adequada e interpretação destes indicadores”.

Nestes casos o conhecimento do VR para o indicador biológico utilizado é um quesito indispensável na monitorização biológica. O nível de um indicador biológico nos indivíduos expostos, que auxilia no estabelecimento de estratégias de controle, deve ser confrontado com o nível deste mesmo indicador determinado em uma população cuja característica principal é a de não estar exposta, por motivo profissional ou situação ambiental (OLIVEIRA, SIQUEIRA, 2003). Por outro lado podem servir base científica para pesquisas biomédicas de doenças causadas pelos respectivos agentes tóxicos (APOSTOLI, 1999).

Na análise do perfil da população foram encontradas apenas as frações URO e COPRO dentro dos respectivos LOQ estabelecidos para o método. Para os indivíduos que apresentaram valores de URO abaixo do LOQ foi assumida a concentração de 0 $\mu\text{g/g}$ de creatinina, estes representam 50 indivíduos, ou seja, 39,4%. Alguns autores excluem do cálculo da média e desvio padrão estes indivíduos com valores abaixo do LOQ (ALIMONTI, PETRUCCI, KRACHLER *et al.*, 2000), outros assumem valores calculados com 0,05 vezes o LOD (APOSTOLI *et al.*, 1997). A fração HEPTA foi detectada em 21 indivíduos (16,5%), cujos valores ficaram entre o LOQ e o LOD, e não foi detectada em nenhum indivíduo a presença das frações HEXA ou PENTA. SUNYER *et al.*, 2002, num estudo populacional do padrão de porfirinas urinárias, detectaram a fração HEPTA em 7% dos indivíduos e também não detectaram as frações HEXA e PENTA.

A expressão do VR se faz de maneiras diferentes, de acordo com a finalidade do seu uso ou do país e entidade que o gerou. São geralmente expressos em valores médios, IC 95% e valor de referência superior (+2dp) (OLIVEIRA, SIQUEIRA, 2003). Para efeitos práticos tem o objetivo primordial de caracterizar o nível do indicador biológico numa população não-exposta a agentes porfirinogênicos.

Existe uma variação muito grande na apresentação da distribuição obtida para os dados de VR em trabalhos relacionados à área de toxicologia. NOGUEIRA *et al.*, 1979, determinaram VR para plumbemia e apresentaram os resultados de distribuição da população como: média, mediana, dp, valor mínimo, máximo e moda. PAOLIELO *et al.*, 1997, na determinação do mesmo analito, optaram por apresentar: o valor mínimo, 1º. quartil, mediana, 3º. quartil, IC 95%, intervalo experimental e de incerteza, e os VR foram apresentados como $m \pm 2dp$.

A Comissão de Toxicologia da Divisão de Clínica Química da IUPAC (POULSEN, HOLST, CHRISTENSEN, 1997) recomenda para a apresentação de intervalo de referência:

- o número de valores;
- a apresentação da distribuição dos valores encontrados expressos como: média, mediana, teste para distribuição normal e o resultado de “p” encontrado. Aceita-se a distribuição gaussiana quando $p > 0,05$;
- A IFCC (POULSEN, HOLST, CHRISTENSEN, 1997) recomenda que para $n \geq 120$ e distribuição não-paramétrica, o intervalo deve conter os percentis 2,5 e 97,5% e para distribuição paramétrica o IC 95%.

Neste trabalho optamos por apresentar os resultados conforme a literatura citada acima recomenda, acrescentando a faixa de valor mínimo e máximo encontrado e o intervalo de incerteza (acima de $+2dp$). MINOIA *et al.*, 1990, num estudo de VRs para metais apresentaram os dados de maneira semelhante, apesar da distribuição não ser exatamente gaussiana; como tinham um número de indivíduos maior que 30, consideraram a distribuição normal e apresentaram os resultados com o IC 95% paramétrico. SIQUEIRA *et al.*, 2003, encontraram resultados com distribuição paramétrica na determinação de valores da atividade da ALA-D numa população e representaram os valores como: média, dp, VR e IC 95%, valores mínimos e máximos encontrados.

WANG *et al.*, 1993, na apresentação dos VRs obtidos para tolueno no sangue, obtiveram distribuição não-paramétrica e optaram também por apresentar os dados de maneira semelhante ao apresentado neste trabalho, com o acréscimo da média geométrica.

Após a aplicação do teste não-paramétrico para comparar os grupos estudados, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes para COPRO e porfirinas totais para a atividade ocupacional e o hábito de fumar. As médias dos valores de COPRO para pessoas que realizam funções administrativas é estatisticamente menor do que quem realiza funções

técnicas ($p=0,004$). Para fumantes, os valores de COPRO são menores que não fumantes ($p=0,008$). No caso das porfirinas totais, este mesmo resultado se apresenta.

Talvez estas diferenças se devam às características da população administrativa, que, ao contrário da população de técnicos, não estaria exposta ocupacionalmente a agentes químicos. A população de técnicos teoricamente não está exposta a agentes porfirinogênicos, pelo menos no ambiente de trabalho. Conclui-se pelo questionário estudado que a mesma não tem conhecimento do tipo de indústria instalada próximo ao local de residência, o que poderia ser um fator ambiental associado.

Para o grupo de fumantes e não fumantes o teste pode não ter um valor tão representativo, visto que a população de fumantes é bem menor do que a de não-fumantes, que representa apenas 13,5%.

Os valores de VR de porfirinas urinárias encontrados na literatura variam de autor para autor. Grande parte tem o objetivo de diagnóstico e utiliza amostra de urina de 24 horas (FORD, OU, ELLEFSON, 1981; NUTTALL, PINGREE, ASHWOOD, 1996; Clínica Mayo, 2005; Manual de exames DLCHCFMUSP, 2004). Estes demonstram que há diferenças nos VR adotados, apenas a Clínica Mayo, 2005, identifica diferenças para os sexos apenas na fração COPRO. Os resultados obtidos neste trabalho não apontaram diferenças entre os sexos nas duas frações identificadas, talvez isso tenha ocorrido devido às diferenças na coleta de urina em relação aos outros pesquisadores citados.

No estudo populacional realizado por NUTTALL, PINGREE, ASHWOOD, 1996, foram coletadas amostras de urina de 24 horas e amostra isolada. Estes observaram que embora em amostra isolada o grau de variabilidade seja maior, foram encontradas poucas diferenças entre os resultados de VR obtidos para homens e mulheres.

BURATTI *et al.*, 1987, fizeram um estudo populacional para determinar VR das porfirinas. A população foi de 78 indivíduos do sexo masculino, e a coleta foi realizada em amostra isolada de urina. A correção

pela creatinina só foi realizada para porfirinas totais. Para as frações URO e COPRO, os resultados foram apresentados em $\mu\text{g/L}$.

Comparando os resultados obtidos neste experimento com os obtidos por BURATTI *et al.*, 1987, e APOSTOLI *et al.*, 2002 (Tabela XXIII), percebe-se pelo dp obtido que tivemos uma dispersão maior nos resultados de COPRO e porfirinas totais em relação a BURATTI *et al.*, 1987 mas menores em relação a APOSTOLI *et al.*, 2002.

Tabela XXIII - Comparação dos resultados obtidos no experimento com os determinados por BURATTI *et al.*, 1987 e APOSTOLI *et al.*, 2002

N/Sexo	Porfirinas Totais média \pm dp	URO média \pm dp	COPRO média \pm dp	
78/ homens	50,5 \pm 19,9 $\mu\text{g/g}$ de crea	15,7 \pm 6,2 $\mu\text{g/L}$	75,8 \pm 8,2 $\mu\text{g/L}$	BURATTI <i>et al.</i> , 1987
86/homens	89,8 \pm 44,8 $\mu\text{g/g}$ de crea	9,4 \pm 11,4 $\mu\text{g/g}$ de crea	70,5 \pm 36,7 $\mu\text{g/g}$ de crea	APOSTOLI <i>et al.</i> , 2002
59/ homens	49,4 \pm 32,1 $\mu\text{g/g}$ de crea	5,4 \pm 6,0 $\mu\text{g/g}$ de crea	44,0 \pm 30,8 $\mu\text{g/g}$ de crea	experimento
		8,4 \pm 4,1 $\mu\text{g/L}$	62,5 \pm 20,9 $\mu\text{g/L}$	
126/ 59 homens + 67 mulheres	48,1 \pm 27,7 $\mu\text{g/g}$ de crea	5,3 \pm 6,0 $\mu\text{g/g}$ de crea	42,8 \pm 26,4 $\mu\text{g/g}$ de crea	experimento
		7,5 \pm 4,1 $\mu\text{g/L}$	60,8 \pm 18,0 $\mu\text{g/L}$	

Os resultados de porfirinas totais obtidos por BURATTI *et al.*, 1987 foram comparados com os resultados obtidos para população total (n=126) e para o grupo de homens (n=59) deste experimento. Foi aplicado o teste “t” de Student para diferenças entre as médias (SWINSCOW, 1988; BERQUÓ,

SOUZA, GOTLIEB, 1981) e os resultados de porfirinas totais não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$). O mesmo teste estatístico quando aplicado para os resultados das frações URO e COPRO em $\mu\text{g/L}$ apresentam diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$).

APOSTOLI *et al.*, 2002 encontraram valores mais altos para porfirinas totais e as respectivas frações analisadas.

Considerando as diferenças nos resultados obtidos, estes podem ser explicados pela metodologia que BURATTI *et al.*, 1987 e APOSTOLI *et al.*, 2002 utilizaram. BURATTI *et al.*, 1987 utilizaram uma metodologia de CLAE com detecção por fluorescência que incluía uma etapa de extração da amostra após acidificação, o que poderia explicar a menor variabilidade dos resultados pela purificação da amostra. Como os autores não apresentaram os valores de URO e COPRO corrigidos pela creatinina e nem o tipo de distribuição encontrado para população estudada, os testes comparativos podem não estar adequados. APOSTOLI *et al.*, 2002 utilizaram CLAE com detecção por massa o que confere um limite de detecção de $0,1 \mu\text{g/l}$ ao método, apesar da maior variabilidade analítica.

As diferenças populacionais podem ocorrer devido ao fato de que os valores de VR para substâncias encontradas em níveis fisiológicos são uma somatória destes e da exposição ambiental para a população estudada (APOSTOLI, 1999). Ao estimar VRs, as limitações metodológicas também devem ser consideradas, bem como as variáveis pré-analíticas. No caso das porfirinas urinárias, a exposição à luz e o pH de armazenamento é um fator de variável importante a ser considerado (GUDER *et al.*, 1996). A intensidade da fluorescência é pH dependente e é mais intensa em soluções ácidas (NUTALL, 1994).

A utilização do perfil de porfirinas urinárias como indicador biológico de efeito na exposição ocupacional a substâncias porfirinogênicas é muito sensível, apesar da falta de especificidade. Neste caso, indicadores de dose mais específicos para os agentes porfirinogênicos descritos, se aplicados e avaliados concomitantemente, podem fornecer informações importantes

para avaliar a exposição e estabelecer estratégias na monitorização biológica da exposição.

Outro fator a considerar é a utilização concomitante de indicadores biológicos de dose, ou mesmo a atividade da URO-D na monitorização biológica do trabalhador exposto a agentes considerados porfirinogênicos. Atualmente os testes para quantificar a atividade enzimática são mais utilizados quando se necessita identificar o tipo de porfiria já diagnosticada, visto que a análise das frações urinárias de porfirinas na maioria das vezes não é sensível e específica para este fim (DANIELL, 1997).

Acima de tudo, os estudos epidemiológicos em populações humanas devem ser considerados com cautela devido às diferenças no tamanho da população, a metodologia utilizada para dosar as porfirinas urinárias e o controle dos efeitos que podem ocasionar variáveis, como o hábito do fumo e o consumo de álcool, como também a dificuldade de caracterizar os poluentes (SUNYER, 2002). É importante lembrar que também podem ocorrer variações fisiológicas individuais num dado espaço de tempo devido a fatores intrínsecos da população, tais como raça, hábitos alimentares, etc.

Apesar dos resultados obtidos serem restritos à população da cidade de São Paulo, estes podem servir de base para estudos regionais na população do nosso país a fim de detectar alterações precoces e estabelecimento de doenças muitas vezes irreversíveis na exposição a agentes químicos da classe dos organoclorados, como HCB, e metais pesados, como Hg, Pb e As.

O perfil de porfirinas urinárias para população não-exposta ficou bem caracterizado neste trabalho. A presença das frações URO e COPRO em detrimento das outras frações tem potencial a ser utilizado como indicador biológico de efeito, partindo da premissa que ficaria inviável a utilização de um indicador biológico sem o conhecimento prévio dos valores de referência para o perfil populacional.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os dados obtidos, foi possível concluir que:

- A dosagem de porfirinas urinárias utilizando metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência é sensível para avaliar o perfil de porfirinas eliminadas fisiologicamente via renal e detectar alterações discretas e precoces;
- A estimativa de valores de referência para URO, COPRO e porfirinas totais caracteriza o perfil de eliminação de porfirinas via urinária para indivíduos não-expostos a agentes porfirinogênicos da população estudada e tem potencial a ser utilizada como valor de referência para o indicador biológico de efeito na monitorização biológica da exposição a organoclorados e metais pesados como mercúrio, chumbo e arsênio;
- Os resultados obtidos referem-se a uma amostra da população da cidade de São Paulo, Brasil, e podem servir de base para estudos regionais na população do nosso país.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, A.N.L.; MIRANDA, I.F.L.; MAGER, W.R.C.; CACCIA, G.C.V.; MENDES, M.E.; SUMITA, N.M.; DELLA ROSA, H.V. Desenvolvimento de um método cromatográfico para dosagens de porfirinas urinárias. *Rev. Bras. Toxicol.*, São Paulo, v.16, n.1, supl., p.108, res.148, 2003. (XIII Congresso Brasileiro de Toxicologia; Simpósio Brasileiro de Emergências em Toxicologia Clínica; Simpósio Brasileiro de Agrotóxicos, Londrina, 2003) ¹.

ALIMONTI, A.; PETRUCCI, F.; KRACHLER, M.; CAROLI, S. Reference values for chromium, nickel and vanadium in urine of youngsters from the urban area of Rome. *J. Environ. Monit.*, Letchworth, v.2, p.351-354, 2000.

APOSTOLI, P. Application of reference values in occupational health. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Heidelberg, v.72, p.191-194, 1999.

APOSTOLI, P.; SARNICO, M.; BAVAZZANO, O. Arsenic and porphyrins. *Am. J. Ind. Med.*, Hoboken, v.42, n.3, p.180-187, 2002.

APOSTOLI, P.; MARANELLI, G.; DUCA, P.G.; BAVAZZANO, P.; BORTOLI, A.; CRUCIATTI, A.; ELIA, G.; MINOIA, C.; PICCININI, R.; SABBIONI, E.; SCIARRA, G.; SOAVE, C. Reference values of urinary chromium in Italy. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Heidelberg, v.70, p.173-179, 1997.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR-ISO 9001*: sistema de gestão da qualidade: requisitos. Rio de Janeiro, 2000. 21p.

¹ As referências bibliográficas estão de acordo com a norma NBR6023/2000, preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) e as abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI) 2002.

-
- BERQUÓ, E.S.; SOUZA, J.M.P.; GOTLIEB, S.L.D. *Bioestatística*. 2.ed. São Paulo: EPU, 1981. 350p.
- BLEIBERG, J.; WALLEN, M.; BRODKIN, R.; APPELBAUM, I.L. Industrially acquired porphyria. *Arch. Dermatol.*, Chicago, v.89, p.793-797, 1964.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medicamentos. Inspeção. Centros de Bioequivalência. Legislação. *Resolução n.899, de 29 de maio de 2003*. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/base/visadoc/res/res\[655-2-0\].html](http://www.anvisa.gov.br/base/visadoc/res/res[655-2-0].html) <<http://www.anvisa.gov.br/base/visadoc/res/res%5b655-2-0%5d.html>>_. Acesso em: 23 jun. 2003b.
- BRASIL. *Segurança e medicina do trabalho*: Lei n. 6.514, de 22/12/77, normas regulamentadoras (nr) aprovadas pela portaria n. 3.214, de 8/6/78, normas regulamentadoras rurais (nrr) aprovadas pela portaria n. 3.067, de 12/4/88, e índices remissivos 39.ed. São Paulo: Atlas, 1996. p.86-91. (Manuais de Legislação Atlas, 16). (NR 7 - Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional).
- BURATTI, M.; COLOMBI, A.; MARONI, M.; FERIOLI, A.; FOÁ, V. Measurement of urinary porphyrin excretion in a reference population and in individuals exposed to workplace contaminants. In: HO, M.H.; DILLON, H.K., eds. *Biological monitoring of exposure to chemicals: organic compounds*. New York: Wiley, 1987. cap.22, p.309-319. (Symposium on the biological monitoring of exposure to organic compounds, 187, Saint Louis, 1984).

- CALVERT, G.M.; SWEENEY, M.H.; FINGERHUT, M.A.; HORNUNG, R.W.; HALPERIN, W.E. Evaluation of porphyria cutanea tarda in U. S. Workers exposes to 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the manufacture of 2,4,5-trichlorophenoyacetic acid: comparison of findings with and without chloroacne. *Am. J. Ind. Med.*, Hoboken, v.5, p.161-182, 1994.
- CASARETT, L.J.; KLAASSEN, C.D.; AMDUR, M.O.; DOULL, J., eds. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. 5.ed. New York: McGraw-Hill, 1996. p.159, 539.
- CENTEN, A.H.J.; STRIK, J.J.T.W.A.; COLOMBI, A. Coproporphyrinuria and chronic hepatic porphyria type A found in people from Seveso (Italy) exposed to 2,3,7,8 tetrachlorobendibenzo-p-dioxin (TCDD). In: STRIK, J.J.T.W.A.; KOEMAN, J.H. eds. *Chemical porphyria in man*. Amsterdam: Elsevier; New York: North-Holland Biomedical Press, 1979. p.75-81.
- CETESB. Notícias. *Relatório de qualidade do ar no estado de São Paulo, 2003*. Disponível em: <http://www.cetesb.sp.gov.br>. Acesso em: 11 jan. 2005.
- CHASIN, A.; CHASIN, M.; SALVADORI, M.C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo*, São Paulo, v.30, n.2, p.49-53, 1994.
- CLÍNICA MAYO. *Porphyryns, quantitative, urine*. Disponível em: <http://www.mgh.org/lab/CATALOG/TESTS/4786.HTM>. Acesso em: 28 abr. 2005.
- CONOVER, W.J. *Practical nonparametric statistics*. 2.ed. New York: Wiley, 1980. 493p. (Wiley series in probability and mathematical statistics).

- DANIELL, W.E.; STOCKBRIDGE, H.L.; LABBE, R.F.; WOODS, J.S.; ANDERSON, K.E.; BISSELL, M.D.; BLOOMER, J.R.; ELLEFSON, R.D.; MOORE, R.M.; PIERACH, C.A.; SCHREIBER, W.E.; TEFFERI, A.; FRANKLIN, G.M. Chemical exposures and disturbances of heme synthesis. *Environ. Health Perspect.*, Cary, v.105, n.1, p.37-53, 1997.
- DELLA ROSA, H.; MENDES, R. *Exposição ocupacional ao hexaclorobenzeno (HCB) e seus efeitos sobre a saúde: estado atual de conhecimento*. São Paulo: Rhodia, 1993. 52p. [Documento Interno].
- DONNAY, A.; ZIEM, G. Comprehensive protocol for evaluating disorders of porphyrin metabolism in chemically sensitive patients. Disponível em: <http://www.mcsrr.org/factsheets/porphyri.html>. Acesso em: 04 out. 2004.
- DOSS, M.O. Pathobiochemical transition of secondary coproporphyrinuria to chronic hepatic porphyria in humans. *Klin. Wochenschr.*, Berlin, v.58, p.141–148, 1980.
- DOSS, M.; LANGE, C.E.; VELTMAN, G. Vinyl chloride-induced hepatic coproporphyrinuria with transition to chronic hepatic porphyria. *Klin. Wochenschr.*, Berlin, v.62, p.175-178, 1984.
- DOSS, M.O.; BENKMANN, H.G.; GOEDDE, H.W. δ -aminolevulinic acid dehydratase (porphobilinogen synthase) in two families with inherited enzyme deficiency. *Clin. Genet.*, Copenhagen, v.30, p.191–198, 1986.
- DOSS, M.O. Porphyrinurias and occupational disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, v.514, n.1, p.204-218, 1987.
- DOSS, M.O.; FRANK, M.; BRAUN-FALCO, O. Porphyria cutanea tarda: erythrocyte decarboxylase activity in 471 consecutive patients. *Curr. Probl. Dermatol.*, Basel, v.20, p.97–105, 1991.

- DOSS, M.O.; KÜHNEL, A.; GROSS, U. Alcohol and porphyrin metabolism. *Alcohol Alcohol.*, Oxford, v.35, n.2, p.109-125, 2000.
- ELDER, G.H. Porphyrins in human diseases. In: DOSS, M., ed. *Porphyrins in human diseases*. Basel, London: Karger, 1967. p.424-431. (Proceedings of the 1st International Porphyrin Meeting, Freiburg, 1975.)
- ELDER, G.H.; URQUHART, A.J. Biochemical indices of liver toxicity: porphyrin metabolism. In: FOÁ, V.; EMMET, E.A.; MARONI, M.; COLOMBI, A., eds. *Occupational and environmental chemical hazards: cellular and biochemical indices for monitoring toxicity*. Chichester: Ellis Horwood, 1987. cap.3, p.232-290.
- ELDER, G.H. Porphyria cutanea tarda. *Semin. Liver Dis.*, New York, v.18, p.67–76, 1998.
- ENRIQUEZ DE SALAMANCA, R.; HERNANDEZ, R.; SEPULVEDA, P.; MORAN, M.J. Absence of circadian variations in urinary porphyrin excretion in normal subjects. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, Amsterdam, v.27, n.9, p.933-935, 1995.
- FORD, R.E.; OU, C.; ELLEFSON, R.D. Liquid-chromatographic analysis for urinary porphyrins. *Clin. Chem.*, Washington, v.27, n.3, p.397-402, 1981.
- GARCIA-VARGAS, G.G.; HERNANDEZ-ZAVALA, A. Urinary porphyrins and heme biosynthetic enzyme activities measured by HPLC in arsenic toxicity. *Biomed. Chromatogr.*, Bognor Regis, v.10, n.6, p.278-284, 1996.

- GED, C.; OZALLA, D.; HERRERO, C.; LECHA, M.; MENDEZ, M.; DE VERNEUIL, H.; MASCARO, J.M. Description of a new mutation in hepatoerythropoietic porphyria and prenatal exclusion of a homozygous fetus. *Arch. Dermat.*, Chicago, v.138, n.7, p.957-960, 2002.
- GOLDWATER, L.J.; JOSELOW, M.M. Effects of mercury exposure on urinary excretion of coproporphyrin and delta-aminolevulinic acid. *Arch. Environ. Health*, Washington, v.15, p.327-331, 1967.
- GUDER, W.G.; NARAYANAN, S.; WISSER, H.; ZAWATA, B. Lista de substâncias variáveis pré-analíticas. In: _____. *Amostras: do paciente para o laboratório*. Darmstad: GIT Verlag, 1996. p.98.
- HABERMAN, H.F.; ROSENBERG, F.; MENON, I.A. Porphyria cutanea tarda: comparison of cases precipitated by alcohol and estrogens. *Can. Med. Assoc. J.*, Ottawa, v.113, p.653-655, 1975.
- HELD, J.L.; SASSA, S.; KAPPAS, A.; HARBER, L.C. Erythrocyte uroporphyrinogen decarboxylase activity in porphyria cutanea tarda: a study of 40 consecutive patients. *J. Invest. Dermatol.*, Malden, v.93, p.332-334, 1989.
- HERNANDEZ-ZAVALA, A.; DEL RAZO, L.M.; GARCIA-VARGAS, G.G.; AGULAR, C.; BORJA, V.H.; ALBORES, A.; CEBRIAN, M.E. Altered activity of heme biosynthesis pathway enzymes in individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Arch. Toxicol.*, Heidelberg, v.73, n.2, p.90-95, 1999.

HOFFMAN, R.E.; STEHR-GREEN, P.A.; WEBB, K.B.; EVANS, R.G.; KNUTSEN, A.P.; SCHRAMM, W.F.; STAAKE, J.L.; GIBSON, B.B.; STEINBERG, K.K. Health effects of long-term exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *JAMA, J. Am. Med. Assoc.*, Chicago, v.255, p.2031-2038, 1986.

HRYHORCZUK, D.O.; WALLACE, W.H.; PERSKY, V.; FURNER, S.; WEBSTER, J.R.; OLESKE, D.; HASELHORST, B.; ELLEFSON, R.; ZUGERMAN, C. A morbidity study of former pentachlorophenol-production workers. *Environ. Health Perspect.*, Cary, v.106, p.401-408, 1998.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man*. Some fumigants, the herbicides 2,4-D and 2,4,5-T, chlorinated dibenzodioxins and miscellaneous industrial chemicals, Lyon: 1977. v.15, p.51.

JOHNSON, P.M.; PERKINS, S.L.; KENNEDY, S.W. A high-speed liquid chromatographic method for measure urinary porphyrins. *Clin. Chem.*, Washington, v.34, n.1, p.103-105, 1988.

KING, M.W.; MARCHESINI, S. *Heme and porphyrin metabolism*. Disponível em: <http://www.med.unibs.it/~marchesi/heme.html>. Acesso em: 03 jan. 2005.

LANÇONI, G. *Porfíria cutânea tardia experimental: aspectos histológicos relacionados à fotossensibilidade*. Ribeirão Preto, 1999. 95p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo.

- LYNCH, R.E.; LEE, G.R.; KUSHNER, J.P. Porphyria cutanea tarda associated with disinfectant misuse. *Arch. Intern. Med.*, Chicago, v.135, p.549-552, 1975.
- MAYO REFERENCE SERVICES. *The challenges of testing for and diagnosing porphyrias.* v.27, n.11, 2002. Disponível em www.mayo.edu/mml/communique.html. Acesso em: 1 dez. 2004.
- MEDFAMILY: MEDICINE FOR THE FAMILY. Diagnosis. Medical Diagnosis Search: P. *Porphyria*. Disponível em: <http://www.medfamily.org/diagnosis/P/diagnosis-terms-Porphyria.phtml>. Acesso em: 03 jan. 2005.
- MERCK. The Merck Manual. The Merck manual of diagnosis and therapy. Section 2. Endocrine and metabolic disorders. *The porphyrias.* S.l.: Merck, 2004. cap.14. Disponível em: <http://www.merck.com/mrkshared/mmanual/section2/chapter14/14b.jsp>. Acesso em: 03 jan. 2005.
- MINOIA, C.; SABBIONI, P.; APOSTOLI, P.; PIETRA, R.; POZZOLI, L.; GALLORINI, M.; NICOLAOU, G.; ALESSIO, L.; CAPODAGLIO, E. Trace element reference values in tissues from inhabitants of the european community. I. A study of 46 elements in urine, blood and serum of italian subjets. *Sci. Total Environ.*, Amsterdam, v.95, p.89-105, 1990.
- MORGAN, D.P. *Recognition and management of pesticide poisonings.* 4.ed. Washington: US Environmental Protection Agency, 1989. p.73. (EPA, 540/9-88-001).

MYLCHREEST, E.; CHARBONNEAU, M. Studies on the mechanism of uroporphyrinogen decarboxylase inhibition in hexachlorobenzene-induced porphyria in the female rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, New York, v.145, n.1, p. 23-33, 1997.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. *Preparation & testing of reagent water in the clinical laboratory*. 3.ed. S.I.: NCCLS, 1997. v.17, No. 18, (NCCLS Document C3 A3).

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. *How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline*. Wayne: NCCLS, 1995. v.15, n.4, 59p. (Document C28-A).

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE; NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH (NLM/NIH/USA). *Arsenic compounds: environmental fate & exposure*. Disponível em: <http://www.toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB.htm>. Acesso em: 10 fev. 2004.

NOGUEIRA, D.P.; COLACIOPO, S.; SOUZA, J.M.P.; PEZZA, C.B.; SOUZA, M.L.A.; GOMES, J.R. Taxa de chumbo em amostra de voluntários "não-expostos" habitantes da grande São Paulo - Brasil. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, v.13, p.147-150, 1979.

NORDMANN, Y.; PUY, H.; DEYBACH, J.C. Hepatic porphyria. *Rev. Med. Interne*, Paris, v.20, n.4, p.333-340, 1999.

NUTTALL, K.L. Porphyrins and disorders of porphyrin metabolism. In: BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. eds. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 2.ed. Philadelphia: Saunders, 1994. cap.38, p.2073-2101.

- NUTTALL, K.L.; PINGREE, S.S.; ASHWOOD, E.R. Reference intervals for 24-hour and random urine porphyrins. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, Whiting, v.26, n.4, p.313-322, 1996.
- NUTTALL, K.L. Abnormal chromatographic patterns of porphyrins in urine. *Ann. Clin. Lab. Sci.*, Whiting, v.31, n.3, p.259-264, 2001.
- OGA, S. *Fundamentos de toxicologia*. 1ª. ed. São Paulo: Ateneu, 1996, p.137-151.
- OLIVEIRA, D.P.; SIQUEIRA, M.E.P.B. Valores de referência de bioindicadores: uma visão geral. *Rev. Bras. Toxicol.*, São Paulo, v.16, n.1, p.49-53, 2003.
- OZALLA, D.; HERRERO, C.; RIBAS-FITÓ, N.; TO-FIGUERAS, J.; TOLL, A.; SALA, M.; GRIMALT, J.; BASAGAÑA, X.; LECHA, M.; SUNYER, J. Evaluation of urinary porphyrin excretion in neonates born to mothers exposed to airborne hexachlorobenzene. *Environ. Health Perspect.*, Cary, v.110, p.205-209, 2002.
- PAOLIELO, M.B.M.; GUTIERREZ, P.R.; TURINI, C.A.; MATSUO, T.; MEZZARROBA, L.; BARBOSA, D.S.; ALVARENGA, A.L.P.; CARVALHO, S.R.Q.; FIGUEIROA, G.A.; LEITE, V.G.M.; GUTIERREA, A.C.; NOGUEIRA, K.B.; INAMINE, W.A.S.; ZAVATTI, A.M. Valores de referência para plumbemia em população urbana. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, v.31, n.2, p.44-148, 1997.
- PAZDEROVA-VEJLUPKOVA, J.; NEMCOVA, M.; PICKOVA, J.; JIRASEK, L.; LUKAS, E. The development and prognosis of chronic intoxication by tetrachlorodibenzo-p-dioxin in men. *Arch. Environ. Health*, Washington, v.36, p.5-11, 1981.

-
- PINGREE, S.D.; SIMMONDS, P.L.; RUMMEL, K.T.; WOODS, J.S. Quantitative evaluation of urinary porphyrins as a measure of kidney mercury content and mercury body burden during prolonged methylmercury exposure in rats. *Toxicol. Sci.*, Cary, v.61, p.234-240, 2001.
- POULSEN, O.M.; HOLST, E.; CHRISTENSEN, J.M. Calculation and application of coverage intervals for biological reference values. *Pure Appl. Chem.*, Research Triangle Park, v.69, n.7, p.1601-1611, 1997.
- SCHREIBER, W.E.; RAISYS, V.; LABBÉ, R.F. Liquid-chromatographic profiles of urinary porphyrins. *Clin. Chem.*, Washington, v.29, n.3, p.527-530, 1983.
- SEKI, Y.; KAWANISHI, S.; SANO, S. Mechanism of PCB-induced porphyria and Yusho disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, v.514, p.222-234, 1987.
- SELDEN, A.I.; FLODERUS, Y.; BODIN, L.S.; WESTBERG, H.B.; THUNEL, S. Porphyrin status in aluminum foundry workers exposed to hexachlorobenzene and octachlorostyrene. *Arch. Environ. Health*, Washington, v.54, n.4, p.248-253, 1999.
- SHAH, V.P.; MIDHA, K.K.; DIGHE, S.; MCGILVERAY, I.J.; SKELLY, J.P.; YACOBI, A.; LAYLOFF, T.; VISWANATHAN, C.T.; COOK, C.E.; MCDOWALL, R.D.; PITTMAN, K.A.; SPECTOR, S. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. *Pharm. Res.*, Dordrecht, v.9, n.4, p.588-592, 1992.

- SIQUEIRA, M.E.P.B.; MAIA, P.P.; OLIVEIRA, D.P.; LUENGO, D.M.L. Delta-aminolevulinic acid dehydratase activity in the general population of southern Minas Gerais, Brazil. *Ind. Health*, Tama-ku, v.41, p.19-23, 2003.
- STRIK, J.J.T.W.A.; SCHRAA, G.; ROBERTSON, L.W.; VON TIEPERMANN, R.; HARMSSEN, E.G.M. Coproporphyrinuria and chronic hepatic porphyria type A found in farm families from Michigan (USA) exposed to polibrominated biphenyls (PBB). In: STRIK, J.J.T.W.A.; KOEMAN, J.H., eds. *Chemical porphyria in man*. Amsterdam: Elsevier; New York: North-Holland Biomedical Press, 1979. p.29-53.
- SWINSCOW, T.D.V. *Estatística: um ao quadrado*. São Paulo: Manole, 1988. p.46-54.
- SUMITA, N. M. *Avaliação da poluição ambiental da cidade de São Paulo pela análise elementar em plantas (Tradescantia pallida), por método de ativação com nêutrons*. São Paulo, 2002. 92p. Dissertação de Doutorado - Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo.
- SUNYER, J.; HERRERO, C.; OZALLA, D.; SALA, M.; RIBAS-FITÓ, N.; GRIMALT, J.; BASAGAÑA, X. Serum organochlorines and urinary porphyrin pattern in a population highly exposed to hexachlorobenzene. *Environ. Health*, London, v.1, n.1, p.1, 2002.
- UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. Faculdade de Medicina. Hospital das Clínicas. Divisão de Laboratório Central. *Manual de exames*. São Paulo: DCL-HCFMUSP, 2005. Disponível em: <http://www.dlc.med.br/mexames/> Acesso em: 17 jan. 2005.

UNITED STATES GEOLOGICAL SURVEY. Department of Interior. Mineral Information. *Lead*. Disponível em: <http://minerals.er.usgs.gov/minerals/pubs/commodity/lead>. Acesso em: 02 fev. 2004.

VAN BIRGELEN, A.P.J. M. Hexachlorobenzene as possible major contributor of the dioxin-activity of human milk. *Environ. Health Perspect.*, Cary, v.106, p.683-688, 1998.

VERDON, C.P.; POLLOCK, T.A.; BRALLEY, J.A. Testing for toxic metals and chemical induced porphyrinuria. Disponível em: <http://www.metamatrix.com/Publications/Toxic%20Metals>. Acesso em: 03 out. 2004.

WANG, G.; MARANELLI, G.; PERBELLINI, L.; GUGLIELMI, G.; BRUGNONE, F. Reference values for blood toluene in the occupationally nonexposed general population. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Heidelberg, v.65, p.201-203, 1993.

WANG, J.P.; ZHENG, B., LIU, F.; MOORE, M.R.; NG, J.C. Porphyrins as early biomarkers for arsenic exposure in animals and humans. *Cell Mol. Biol.*, Paris, v.48, v.8, p.835-843, 2002.

WEBB, K.; EVANS, R.G.; STEHR, P.; AYRES, S.M. Pilot study on health effects of environmental 2,3,7,8-TCDD in Missouri. *Am. J. Ind. Med.*, Hoboken, v.11, p.685-691, 1987.

WOODS, J.S.; MARTIN, M.D.; NALEWAY, C.A.; ECHEVERRIA, D. Urinary porphyrin profiles as a biomarker of mercury exposure: studies on dentists with occupational exposure to mercury vapor. *J. Toxicol. Environ. Health*, London, v.40, n.2/3, p.235-246, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Methyl/Mercury*. Geneva: WHO, 1990. 144p. (Environmental Health Criteria, 101).

ZUIDJDERHOUDT, F.M.J.; KOEHORST, S.G.A.; KLUITENBERG, W.E.; DORRESTEIJN-DE BOK, J. On accuracy and precision of a HPLC method for measurement of urine porphyrin concentrations. *Clin. Chem. Lab. Med.*, Berlin, v.38, n.3, p.227-230, 2000.

ANEXOS

**ANEXO A - Comitê de Ética DLC-HCFMUSP, Comitê de Ética da FCF-
USP e Consentimento Livre e Esclarecido**


COMISSÃO DE ÉTICA

DIVISÃO DE LABORATÓRIO CENTRAL

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em reunião de 10-02-2004, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº 02/04, intitulado "Avaliação do perfil urinário de porfirinas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em população não-exposta a agentes químicos porfirinogênicos", apresentado pelo(a) pesquisador(a) **Atecla Nunciata Lopes Alves**, da Seção de Bioquímica.

São Paulo, 02 de março de 2004.


DRA. VERA LÚCIA PAGLIUSI CASTILHO
Coordenadora da Comissão de Ética da
Divisão de Laboratório Central



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 051/2004

São Paulo, 06 de dezembro de 2004.

Ilmo(a). Sr(a).
Atecia Nunclata Lopes Alves

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 31 de maio de 2004, **APROVOU** o projeto "Avaliação do perfil urinário do porfirinas por CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) em população não-exposta a agentes químicos porfirinogênicos" (Protocolo nº 247) apresentado por Vossa Senhoria.

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 – item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Valentina Porta
Coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa da FCF/USP

Orientador: Prof. Henrique Vicente Della Rosa
FBC



Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome do Paciente:.....
Documento de Identidade Nº :..... Sexo: () M () F
Data de Nascimento:...../...../.....
Endereço:.....Nº:.....Apto:.....
Bairro:.....Cidade:.....
CEP:.....Telefone:.....
2. Responsável Legal:.....
Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):.....
Documento de Identidade Nº:.....Sexo: ()M ()F
Data de Nascimento:...../...../.....
Endereço:.....Nº:Apto:.....
Bairro:.....Cidade:.....CEP:.....Tel:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa: Avaliação do perfil urinário de porfirinas por CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência) em população não-exposta a agentes químicos porfirinogênicos.
2. Pesquisador:Atecla Nunciata Lopes Alves.
Cargo/Função:..biólogista encarregada./ doutoranda..Inscrição Conselho Regional Nº:.....CRF- 8 8983.
Departamento: Laboratório Central Serviço de Bioquímica Clínica, Setor de Toxicologia.
FCF/USP Faculdade de Ciências Farmacêuticas –Departamento de Toxicologia e Análises Toxicológicas
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA
Sem Risco (x) Risco Mínimo () Risco Médio ()
Risco Baixo () Risco Maior ()
- Devido a coleta ser de urina, amostra isolada não há risco nenhum e conseqüência para o indivíduo
Duração da Pesquisa:....1 ano

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. A pesquisa será realizada em urina de pessoas que não estão expostas a substâncias químicas que alteram a produção normal de heme (componente da hemoglobina importante no transporte de oxigênio) no organismo. Normalmente, isto é, fisiologicamente o organismo elimina via urina substâncias que fazem parte da cascata de produção do heme, o objetivo deste trabalho é conhecer este perfil de normalidade de eliminação numa população ativa 2. A urina será analisada por cromatografia líquida que é um método de separação de componentes de uma amostra (são 5 componentes subprodutos da síntese do heme), o propósito é conhecer este padrão normal de eliminação a fim de que possa ser referência quando comparado com o perfil de eliminação de trabalhadores que utilizam substâncias orgânicas coloridas e metais pesados como o chumbo, mercúrio e arsênio pois é conhecida a interferência destas inibindo algumas enzimas que fazem parte desta produção. Esta alteração leva a uma doença chamada porfiria que pode ser detectada em estágios iniciais sem que a doença esteja estabelecida e prevenindo o risco ao trabalhador 3. O tipo de coleta, por se tratar de uma urina de amostra isolada não trará risco nem desconforto dado ser uma amostra que o indivíduo elimina normalmente, independente da pesquisa; Será aplicado um questionário denominado: “Plano de estudo para valores de referência” para coleta de dados e estudo das variáveis de exclusão e estratificação 4. O benefício é uma colaboração voluntária como padrão de normalidade; 5. Nos procedimentos alternativos será dosada a creatinina na urina.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DOSUJEITO DA PESQUISA

1. Estou à disposição para qualquer informação sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. O indivíduo terá liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. Os resultados serão salvaguardados de confidencialidade, sigilo e privacidade.

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Não há riscos de reações adversas e intercorrências clínicas

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

.....

.....

.....

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

São Paulo, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO DO TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

1. Este termo conterà o registro das informações que o pesquisador fornecerá ao sujeito da pesquisa, em linguagem clara e acessível, evitando-se vocábulos técnicos não compatíveis com o grau de conhecimento do interlocutor.
2. A avaliação do grau de risco deve ser minuciosa, levando em conta qualquer possibilidade de intervenção e de dano à integridade física do sujeito da pesquisa.
3. O formulário poderá ser em letra de forma legível, datilografia ou meios eletrônicos.
4. A vida do Termo de Consentimento Pós-Informação submetida à análise do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-FCF) deverá ser idêntica aquela que será fornecida ao sujeito da pesquisa.

ANEXO B - Questionário para a Coleta de dados e estudo das variáveis de exclusão e estratificação

Draft do Protocolo de Estudos do Plano de valores de referência

PERFIL DE PORFIRINAS URINÁRIAS

Amostragem: urina 2ª amostra da manhã. Selecionar grupo de referência, cerca de 50 pessoas entre homens e mulheres, sendo 50% fumantes e 50% não fumantes;

Nº.....

NOME:

SEXO M F

DATA E CIDADE DE NASCIMENTO.....

RESIDÊNCIA ATUAL Rua e Bairro.....

1- Características do local residencial

urbana

periferia

outra Descrever

▪ Atividades de trabalho próximos da zona residencial

Tipo.....

nome da empresa e/ou indústria.....

distância (km).....

▪ Avaliação da intensidade do tráfego de veículos na zona da residência

muito elevada

elevada

moderada

baixa

rara

- Presença de incineradores na zona de residência
 - SIM NÃO
- Presença de centrais elétricas, carvão, petróleo, óleo combustível
 - SIM NÃO

2- Atividade de trabalho

- Qualificação Profissional.....
- Setor de Ocupação.....
- Trabalha com algum tipo de substância química?.....
- Qual(ais)?.....
- A exposição é diária ou eventual?.....
- Eventuais “hobbies” que possam determinar exposição a solventes:
.....

3- Hábitos alimentares

- tipo de dieta Mista Vegetariana Dietética
- consumo de água potável: água da rede água mineral
- consumo de outras bebidas
 - Café Sim Não Chá Sim Não
 - Refrigerante Sim Não Outra Sim Não
 - Qual?.....
 - Indicar a freqüência de consumo/dia:.....
- hábito de fumar : Fumante Não - Fumante
 - Se fumante indicar desde quando.....
 - Número de cigarros fumados por dia
 - < 5
 - 5 - 10
 - 11 - 20
 - > 20
 - Se ex-fumante, indicar o ano.....
 - Marca do cigarro.....

- Indicar eventual outro tipo de consumo de tabaco (charuto, cachimbo) indicando aproximadamente o consumo/dia
- charuto/diag de fumo para cachimbo/dia
- consumo de bebidas alcoólicas
 - Vinho Sim Não => Indicar tipo e quantidade/dia.....
 - Aguardente Sim Não => Indicar tipo e quantidade/dia.....
 - Cerveja Sim Não => Indicar tipo e quantidade/dia.....
 - Outra Sim Não => Indicar tipo e quantidade/dia.....

4- Anamnese patológica

Patologias a serem registradas

- Hemopatias**
- Nefropatias
- Hepatopatias**
- Doenças Metabólicas
- Doenças Cardiovasculares
- Outras.

Discriminar.....

Medicação em uso:

Tipo.....Posologia.....

Tipo.....Posologia.....

Tipo.....Posologia.....

Tratamentos Recentes (últimos dois meses)

Tipo.....Posologia.....

Tipo.....Posologia.....

Tipo.....Posologia.....

Observações (se necessárias) :

.....

ANEXO C – Trabalho publicado na Revista Brasileira de Medicina do Trabalho

