UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Pós-Graduação em Farmácia –
Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

**MONITORIZAÇÃO BIOLÓGICA NA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL
AO COBALTO, ASPECTOS TOXICOLÓGICOS E ANALÍTICOS
ASSOCIADO A UM SISTEMA DE QUALIDADE**

Atecla Nunciata Lopes Alves

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

**Orientador: Prof. Dr. Henrique Vicente
Della Rosa**

São Paulo
1999

Atecla Nunciata Lopes Alves

**MONITORIZAÇÃO BIOLÓGICA NA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL
AO COBALTO, ASPECTOS TOXICOLÓGICOS E ANALÍTICOS
ASSOCIADO A UM SISTEMA DE QUALIDADE**

Comissão julgadora

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Prof. Dr. Henrique Vicente Della Rosa
Orientador/Presidente

Prof. Dr. Sergio Colacioppo

1º Examinador

Dra Maria Elizabete Mendes

2º Examinador

São Paulo, 9 de dezembro de 1999

*" Não haveria som se não fosse o silêncio
Não haveria luz se não fosse a escuridão
A vida é mesmo assim: dia e noite; não e sim"*

*Quando respeitaremos o mundo em sua
grandiosidade, mesmo nos considerando
infinitamente pequenos? Quando nós grãos
de areia entenderemos as estrelas? Talvez
quando entendermos o som e o silêncio; a
luz e a escuridão. Talvez aprenderemos a
viver quando as coisas complexas
tornarem-se simples...*

RENATA CRISTINA FRANCISCO ALVES

Talvez quando tivermos a verdadeira fé no Criador...

*Dedico este trabalho e agradeço a todas as pessoas que me incentivam na vida:
Meus pais Américo e Rosa, exemplo de amor e dedicação aos filhos.*

*Toni, Thiago e Victor: meu marido e filhos, pelo Amor e Compreensão, impulso para
vencer qualquer obstáculo que a vida apresenta.*

Minha irmã Mari, a irmã mais coruja e a tia mais dedicada do mundo.

Meu irmão Moisés, que provou que o amor vence qualquer barreira.

*Minhas avós, Atecla e Nunciata, amor puro, abraço gostoso e cheiroso desde a mais
tenra infância.*

*Todos aqueles que torceram por mim: meus cunhados, cunhadas, sobrinhos (Rose,
Mara, Meire, Vlamir, Roberto, Ronaldo, Renata Francisco Alves, Caio, Ivo,
Roberta, Raquel e Alexandre), Dona Angelina e Sr Antônio 9exemplo de amor e
união...), etc*

Mãe, você encontrou uma mina inesgotável de cobalto? (Thiago Francisco Alves)

Mãe, o que você está fazendo? Lição de novo? (Victor Francisco Alves)

Agradeço

Ao meu orientador Prof. Dr. Henrique Vicente Della Rosa por tudo que aprendi com este trabalho, pela paciência e incentivo, possibilitando que se tornasse realidade aquilo que um dia foi apenas uma simples idéia, um esboço...

Às valiosas contribuições que recebi na qualificação da Prof. Elizabeth de Souza Nascimento, Prof. Dra. Miriam Meyer Passarelli e Prof. Dra. Silvia Cozzolino.

Ao Diretor do Serviço de Bioquímica Clínica do Laboratório Central do HCFMUSP, Dr. Nairo Massakazu Sumita, Dra. Maria Elizabete Mendes, Dr. Alexandre Soriano Fortini e todos os funcionários da Bioquímica pela oportunidade de crescimento e compreensão em todos os momentos.

Aos meus colegas Willy, Pérsio, Lia, Luiz e Clóvis pela amizade e carinho.

Aos meus colegas e amigos, que um dia puderam mostrar que o exemplo de força e união não só leva a atingir metas grandiosas, mas também uma oportunidade de crescimento pessoal quando assim compreendida: Leila Borracha, Quicuco, Rosenilda, Chris, Marquinho, Bete, Nairo, Regina, Elenice, Vera, Pérsio...

Ao Dr. Ricardo M. de Oliveira pela valorosa contribuição que deu ao Laboratório Central do HCFMUSP de 1996-1998 e pela disponibilidade de confiar e acreditar nas pessoas.

Ao Vlamir Tadeu do Nascimento por todo apoio e paciência no aprendizado de informática que tornou possível a execução deste trabalho.

Ao auxílio na digitação da qualificação por Márcio Alves Vieira, Neide, Fran e Cristina.

Ao Luís Ricarte Lopes e João Paulo Heluany (coordenação de vendas da Varian) pelos esclarecimentos e material didático que forneceram.

À Omaizete pelas informações a respeito das provas funcionais pulmonares.

Ao Dr. Marco Munhoz (Diretor do Serviço de Hematologia) pelas orientações de hematologia que me deu.

A todos os colegas da pós-graduação: Sandra, Patrícia, Silvia, Saulo, Isarita, Fernanda...

À Cristiane pela correção ortográfica do texto.

À Suely pela edição do texto.

Às bibliotecárias da Biblioteca do Conjunto da Químicas, as Adrianas.

A todos os funcionários e professores do Departamento de Toxicologia pela atenção por eles recebida.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

A todos amigos que não foram aqui citados e todas as pessoas que foram atenciosas na hora que deles necessitei...

SUMÁRIO

Lista de Ilustrações

Glossário

Resumo

Summary

1 INTRODUÇÃO.....	01
2 OBJETIVOS.....	02
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	03
4 RESULTADOS.....	04
4.1 Propriedades físico-químicas do Co.....	04
4.2 Fontes de exposição.....	07
4.2.1 Ambiental.....	07
4.2.2 Ocupacional.....	09
4.3 Características toxicocinéticas.....	11
4.3.1 Principais vias de introdução, absorção e distribuição.....	11
4.3.1.1 Respiratória	11
4.3.1.2 Gastrintestinal.....	12
4.3.2 Biotransformação, armazenamento e eliminação.....	12
4.4 Toxicodinâmica.....	13
4.5 Principais efeitos tóxicos.....	16
4.5.1 Trato respiratório.....	16
4.5.2 Trato dérmico.....	21
4.5.3 Sistema cardíaco e glândula tireóide.....	22
4.5.4 Carcinogenicidade.....	23
4.6 Monitorização biológica e indicadores biológicos.....	24
4.6.1 Equivalência de alguns termos utilizados pela legislação americana e brasileira	24
4.6.2 Programa de monitorização biológica para o Cobalto.....	25
4.6.3 Relação dose-efeito e dose-resposta na exposição ao Co.....	26
4.6.4 Importância dos dados obtidos na monitorização biológica.....	33
4.6.5 Indicadores Biológicos de Exposição (IBE) para o Co.....	35

4.6.6 Fatores que afetam a monitorização biológica.....	36
4.7 Evolução dos métodos analíticos.....	39
4.7.1 Métodos de análise de Co em amostras de urina e/ou sangue	39
4.7.1.1 Métodos espectrofotométricos na região do visível.....	41
4.7.1.2 Análise por Ativação Neutrônica (<i>NAA- Neutron Activation Analysis</i>).....	41
4.7.1.3 Espectrofotometria de Absorção Atômica por Chama (<i>F-AAS –Flame Atomic Absorption Spectrometry</i>).....	41
4.7.1.4 Espectrofotometria de absorção atômica eletrotérmica ou por forno de grafite (<i>ET-AAS / GF-AAS – Eletrothermal Atomic Absorption Spectrometry / Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry</i>).....	42
4.7.1.5 Método catalítico-(<i>CAT</i>).....	46
4.7.1.6 Espectrofotometria de emissão atômica com plasma induzido (<i>ICP-AES Induced Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry</i>).....	47
4.7.1.7 Cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massa (<i>CG-MS</i>) (<i>GC-MS – Gas Chromatography - Mass Spectrometry</i>).....	47
4.7.1.8 Quimioluminescência (<i>QUIM</i>).....	48
4.8 Estudo crítico dos atuais métodos propostos.....	49
4.8.1 Parâmetros a serem levados em consideração quando se seleciona uma técnica analítica.....	49
4.8.1.1 Padronização analítica.....	49
4.8.1.2 Recursos para execução da análise.....	50
4.8.2 Estudo comparativo dos limites de detecção para determinação de Co.....	50
4.8.3 Análise comparativa dos métodos de F-AAS, ET-AAS e ICP-AES.....	52
4.9 Fatores que influem no método analítico para determinação de cobalto.....	53

4.9.1	Amostragem e armazenamento.....	53
4.9.1.1	Coleta	53
4.9.1.2	Armazenamento das amostras.....	53
4.9.2	Preparação da amostra.....	54
4.9.3	Método.....	56
4.9.3.1	Efeitos devido à “absorção de fundo” (<i>background</i>) e características da matriz.....	56
4.9.3.2	Alteração na linha de base da calibração.....	58
4.10	Garantia da qualidade total e sistema de qualidade.....	58
4.10.1	Introdução de um Sistema de Qualidade.....	59
4.10.2	Implantação de um Sistema de Qualidade ISO 9002 em laboratórios de análises toxicológicas.....	60
4.10.3	Norma ABNT ISO/IEC Guia 25:1993.....	63
4.10.4	Programas de gestão de qualidade num laboratório de análises toxicológicas, planejamento e ciclo da qualidade.....	64
4.10.5	Ciclo da Qualidade.....	64
4.10.5.1	Etapas do ciclo da qualidade.....	65
4.10.6	Controle de qualidade/Gestão de qualidade.....	69
4.10.6.1	Materiais utilizados no Controle de Qualidade.....	70
4.10.6.2	Procedimentos Estatísticos.....	70
4.10.7	Vantagens na implantação de um Sistema de Qualidade...	72
5	DISCUSSÃO.....	73
6	CONCLUSÃO.....	81
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	83

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1	Propriedades físico-químicas e aplicações do Co metálico e óxidos.....	5
Tabela 2	Propriedades físico-químicas e aplicações dos sais de Co.....	6
Tabela 3	Concentrações de Co encontradas em diferentes amostras e na dieta.....	9
Tabela 4	Distribuição de Co no organismo.....	12
Tabela 5	Comparação entre alguns testes de função pulmonar aplicados em trabalhadores de uma indústria de carbetto de tungstênio com sintomas de fibrose de parênquima pulmonar.....	19
Tabela 6	Proposta de valores de referência para o Co.....	26
Tabela 7	Correlação da concentração de exposição a poeiras do Co no ar do ambiente de trabalho <i>versus</i> concentração de Co no sangue.....	26
Tabela 8	Média e desvio padrão das concentrações de Co no ar do ambiente de trabalho, sangue e urina para grupos de trabalhadores expostos em diferentes atividades na produção de carbetto de tungstênio.....	27
Tabela 9	Concentrações de Co no ar do ambiente de trabalho (média de amostras coletadas entre 6 e 8 horas de trabalho em diferentes locais).....	34
Tabela 10	Concentrações de Co urinário antes e após as mudanças no ambiente de trabalho 9valores originais em nmol/L).....	34
Tabela 11	Recomendações da ACGIH para monitorização biológica da exposição ao Co.....	35

Tabela 12	Importância na T _{1/2} (Meia-Vida de Eliminação) no tempo de coleta.....	39
Tabela 13	Evolução cronológica de técnicas analíticas utilizadas para dosar Co em sangue, urina e materiais certificados à partir de 1977.....	40
Tabela 14	Esquema básico de um programa de temperatura utilizado em forno de grafite.....	45
Tabela 15	Estudo comparativo de limites de detecção para análise de Co por <i>ICP MS, ET-AAS, F-AAS E ICP AES</i>	50
Tabela 16	Comparação dos métodos estudados para análise de Co com relação ao material biológico utilizado e limite de detecção..	51
Tabela 17	Comparação entre <i>F-AAS</i> (Espectrofotometria de Absorção Atômica por Chama), <i>ET-AAS/GF-AAS</i> (Espectrofotometria de Absorção Atômica Eletrotérmico ou Forno de Grafite) e <i>ICP-AES</i> (Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Induzido).....	52
Tabela 18	Preparo da Amostra para Análise Por Ativação Neutrônica (<i>NAA</i>), Espectrofotometria no Visível (<i>VIS</i>), Método Catalítico (<i>CAT</i>) e Quimioluminescência (<i>QUIM</i>).....	55
Tabela 19	Preparo da Amostra para determinação de Co por <i>ET-AAS, ICP-AES e CG-MS</i>	56

LISTA DE FIGURAS E QUADRO

Figura 1	Ciclo de metais no meio ambiente.....	8
Figura 2	Representação gráfica da correlação entre níveis de exposição ao Co e concentrações no sangue de 10 grupos de trabalhadores expostos em diferentes funções.....	28
Figura 3	Representação gráfica da correlação entre níveis médios de exposição ao Co e concentrações urinárias de 10 grupos de trabalhadores expostos em diferentes funções.....	29
Figura 4	Representação gráfica da correlação entre as concentrações médias de Co encontradas na urina e sangue de 10 grupos de trabalhadores expostos em diferentes funções.....	30
Figura 5	Representação gráfica das concentrações urinárias de Co em diferentes tempos, após a exposição, em 4 trabalhadores com diferentes graus de exposição.....	31
Figura 6	Representação gráfica do comportamento teórico de níveis de Co urinário antes e após o turno de trabalho durante uma semana	32
Figura 7	Representação gráfica de um programa de temperatura ($^{\circ}\text{C}$) versus tempo (segundos) para a técnica de ET-AAS.....	45
Figura 8	Curva de calibração sem efeito de matriz: curvas paralelas..	57
Figura 9	Curva de calibração com efeito da matriz.....	57
Figura 10	Fluxograma do ciclo da qualidade.....	66

GLOSSÁRIO- ABREVIATURAS E SIGLAS

A	número de massa de elemento químico
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACGIH	<i>American Conference of Governmental and Industrial Hygienists</i>
Ar	argônio
BCR	<i>Bureau Community of Reference</i>
BEI	<i>Biological Exposure Indices</i> - Índices Biológicos de Exposição
BPLC	Boas Práticas de Laboratório Clínico
CAT	método catalítico
CCE	Comissão da Comunidade Européia
CG-MS	<i>Gas Chromatography –Mass Spectrometry</i> - Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massa
Co A	coenzima A
Co	cobalto
Cr	cromo
Cu	cobre
DHL	desidrogenase láctica
Dlco	<i>single breath CO diffusing capacity</i> - capacidade de difusão respiratória de monóxido de carbono
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido dietilenotetracético
EEC	<i>European Economic Communities</i>
ET-AAS	<i>Electrothermic Atomic Absorption Spectrometry</i> - Espectrofotometria de Absorção Atômica Eletrotérmica

EURO-TERVIHT	<i>European Trace Reference Values in Human Tissues</i> (Valores de referência em tecidos humanos para elementos traço na comunidade europeia)
F-AAS	<i>Flame -Atomic Absorption Spectrometry-</i> Espectrofotometria de Absorção Atômica por chama
Fe	ferro
FEV	<i>forced expiratory volume in one second</i> -volume expiratório forçado em 1 segundo
I	luz absorvida
IAEA	<i>International Atomic Energy Agency</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBMP	Índice Biológico Máximo Permitido
ICP-AES	<i>Induced Coupled Plasma- Atomic Emission Spectrometry-</i> Espectrofotometria de Emissão Atômica Plasma Induzido
Ig E	Imunoglobulina classe E responsável pela resposta imunológica nos processos alérgicos
Io	luz incidente
ISO	<i>International Standardization Organization-</i> Organização Internacional para Padronização
Kw	kilowatts (unidade de energia)
LOD	limite de detecção
LOQ	limite de quantificação
LTB	Limite de Tolerância Biológica
MHz	MegaHertz (unidade de frequência de onda)
NAA	<i>Neutron Activation Analysis-</i> Análise por Ativação Neutrônica
Ni	níquel
NIOSH	<i>National Institute for Occupational Safety and Health</i>
NIST	<i>National Institute of Standard and Technology</i>

NR 7	Norma Regulamentadora 7 (Portaria nº 24, de 29-12-1994 do Ministério do Trabalho)
OSHA	<i>Occupational Safety and Health Administration</i>
PCMSO	Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional
POP	Procedimento Operacional Padrão
ppb	partes por bilhão
ppm	partes por milhão
QUIM	Quimioluminescência
RDA	<i>Recommended Dietary Allowances</i>
Sd	<i>standard deviation</i> - desvio padrão
Steady-state	estado de equilíbrio nas reações cinéticas
STPF	<i>Standard Temperature Platform Furnace</i>
t ½	tempo de meia-vida de eliminação
T₃	Triiodotironina
T₄	Tetraiodotironina
TGI	Trato Gastrointestinal
TLC	<i>total lung capacity</i> -capacidade pulmonar total
TLV-TWA	<i>Thereshold Limit Value-Time Weighted Average</i>
VC	<i>vital capacity</i> - capacidade vital
VIS	Espectrofotometria na região do visível
Zn	zinco

RESUMO

ALVES, A.N.L. ***Monitorização biológica na exposição ocupacional ao cobalto, aspectos toxicológicos e analíticos associado a um sistema de qualidade.*** São Paulo, 1999. 95p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

Este trabalho tem por objetivo uma revisão analítica da determinação de cobalto no sangue e/ou urina para fins de monitorização biológica. A proposta de alternativas viáveis para tal metodologia está fundamentada num estudo crítico dos métodos encontrados, associados a um Sistema de Qualidade. Os efeitos tóxicos observados nas exposições a diferentes compostos de cobalto, a relação dose-efeito e dose-resposta, bem como os valores de referência para a população sadia e não ocupacionalmente exposta, levou a ACGIH (*American Conference of Governmental and Industrial Hygienists*) dos Estados Unidos a propor desde 1995 a utilização de um BEI (*Biological Exposure Indice*) para este tipo de exposição. Apesar de o Brasil ainda não ter incluído o cobalto no Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional da Norma Regulamentadora-7, a utilização de um indicador biológico pode constituir-se numa necessidade devido aos estudos toxicológicos e analíticos revistos e relatados na literatura.

SUMMARY

ALVES, A.N.L. ***Biological monitoring of occupational exposure to cobalt, toxicological and analytical aspects associated with a Quality System.*** São Paulo, 1999. 95p. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

This work has the purpose of an analytical review of blood and urine's cobalt quantification in order to be used in biological monitoring. A proposal of alternatives and feasible methodologies that have been found are based upon the critical study associated with a Quality System. The toxic effects observed in exposure to different cobalt compounds, the dose-effect relationship and dose-response, and the reference values in health and non-exposed population, have brought ACGIH (*American Conference of Governmental and Industrial Hygienists*) of the United States to propose since 1995 a BEI (*Biological Exposure Indices*) to this kind of exposure. Although Brazil has not included cobalt in the PCMSO (Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional), the use of a biological indicator can become a necessity due to toxicological and analytical studies here reviewed and reported in the literature.

1. INTRODUÇÃO

Todas as substâncias que interagem com os seres vivos, quando em excesso, podem se tornar tóxicas. Os nutrientes essenciais, como o cobalto, apresentam duas zonas de exposição incompatíveis com a vida: tanto a deficiência como o excesso podem levar à doença ou à morte⁽⁶⁵⁾. À medida que o homem, ao longo de sua evolução, descobre e produz novos materiais elaborados a partir de metais encontrados na natureza, novos riscos à saúde também são introduzidos. O Co é um desses elementos, cuja aplicação na indústria está em ascensão, sendo que durante a década de 60 e 70, a utilização e o consumo de Co e seus compostos aumentou a uma taxa de aproximadamente 2-5 % ao ano ⁽³¹⁾.

Com a globalização, é de se esperar que o Brasil, num futuro muito próximo, deverá enfrentar um novo desafio no que diz respeito à Saúde Ocupacional, ou seja, deverá aplicar procedimentos preventivos a efeitos adversos à saúde ocasionados pelo Co e seus compostos. Em função desses fatos, cresce a importância da avaliação dos aspectos analíticos e a recomendação de aplicação de um indicador biológico pelo Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional ^(59,60) (PCMSO) como guia para avaliação do risco potencial à saúde como recomenda a ACGIH ^(8,9,10) desde 1995.

A eleição de uma metodologia adequada para fins de monitorização biológica, se integrada a um Sistema de Qualidade^(14,15) é uma ferramenta de *Garantia de Qualidade* para o laboratório de análises toxicológicas. O gerenciamento desse programa inclui o Planejamento da Qualidade englobando todo o delineamento experimental: desde a padronização do método a ser adotado, a introdução da nova metodologia e o acompanhamento do processo em todas as etapas.

2. OBJETIVOS

Visando a contemplar uma das metas estabelecida pela **NR 7- Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO)** ^(59,60) :

“Para os trabalhadores expostos a agentes químicos não constantes dos quadros I e II, outros indicadores poderão ser monitorizados, dependendo de estudo prévio dos aspectos de validade toxicológica, analítica e de interpretação destes indicadores” Para a exposição ao Co e seus compostos a NR 7 não menciona a utilização de um indicador. Este trabalho tem por objetivo fornecer informações toxicológicas atualizadas para a utilização de um indicador biológico confiável na exposição ocupacional ao Co, incluindo a seleção de método(s) quantitativo(s) para a determinação de Co na urina e/ou sangue, dentro de um programa de gestão de qualidade^(14,15)

3. MATERIAL E MÉTODOS

Revisão bibliográfica, realizada de modo a fornecer subsídios para o (PCMSO)^(59,60) utilizar indicadores biológicos para o trabalhador exposto ao Co, não descritos no Quadro I, levando em conta:

- a) aspectos toxicológicos da exposição humana ao Co e seus compostos;
- b) seleção de um indicador biológico, Co no sangue e/ou urina, para exposição ocupacional ao Co e relação dose-resposta;
- c) principais métodos utilizados para dosar este indicador;
- d) sensibilidade dos métodos revistos como ponto de partida para a seleção de um método adequado, isto é, que tenha a capacidade de dosar o indicador biológico nas faixas de valores de referência e índice biológico máximo permitido propostos para este tipo de exposição;
- e) análise de metodologia no que diz respeito à exeqüibilidade do método para o nosso país, isto é, os recursos de equipamentos, custos e possíveis interferentes;
- f) integração de todas as informações obtidas fazendo o estudo dos fatores que influem no método analítico e na monitorização biológica;
- g) importância de um sistema de qualidade na implantação de uma nova metodologia num laboratório de análises toxicológicas.

4. RESULTADOS

4.1-Propriedades físico-químicas do Co

O Co é um metal branco-acinzentado com propriedades magnéticas. Os principais estados de oxidação do Co são **+2 e +3** mas, na maioria dos compostos de Co disponíveis, seu estado de valência é **+2⁽²³⁾**. Nas Tabelas 1 e 2 podem ser observadas algumas propriedades físico-químicas e aplicações de Co na forma metálica, óxidos e sais.

TABELA 1 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E APLICAÇÕES DO CO METÁLICO E ÓXIDOS^(23,64)

SUBSTÂNCIA	Co(II-III)*	Óxido Coso(II)*	Óxido de Co(II- III)*	Óxido cobáltico(III)*
FÓRMULA MOLECULAR	Co	CoO	Co ₃ O ₄	Co ₂ O ₃ H ₂ O
PESO MOLECULAR	58,94	74,94	240,8	183,88
PONTO DE FUSÃO (°C)	1493	1935	900	-
SOLUBILIDADE EM SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS	Solúvel em HNO ₃	Pouco solúvel em H ₂ O :0,313mg/100g	Praticamente insolúvel em H ₂ O Solúvel em: NaOH (liquef.) Na ₂ CO ₃ (sol.)	Praticamente insolúvel em H ₂ O
SOLUBILIDADE EM FLUÍDOS BIOLÓGICOS (37°C)	Solução fisiológica : 0,03 mg/100mL Plasma: 15,25mg/100mL Soro: 20 mg/100mL	Soro: 27,3mg/100g em 10 dias	-	Soro: 5,39mg/100g
APLICAÇÃO	Produção de ligas magnéticas e aços de Alta resistência Produção de sais de Co Produção de Co ⁶⁰	Catalisador de reações de oxidação na indústria química e de óleos .Os óxidos na forma comercial não são compostos químicos definidos, mas misturas destes óxidos.		

*Estado de valência

TABELA 2 - PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E APLICAÇÕES DOS SAIS DE CO^(23,64)

SUBSTÂNCIA	Sulfatos de Co	Cloreto de Co	Carbonato de Co	Acetato Coso
FÓRMULA MOLECULAR	CoSO ₄ CoSO ₄ 7H ₂ O	Co Cl ₂	Co CO ₃	Co(C ₂ H ₃ O ₂) ₄ H ₂ O
PESO MOLECULAR	155,00	129,84	118,94	249,08
PONTO DE FUSÃO (°C)	96,8	724	-	-
SOLUBILIDADE EM SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS	Levemente solúvel em metanol e etanol 39,3g/100g (25°C) em H ₂ O	52,9g/100g (20°C) H ₂ O	Praticamente insolúvel em H ₂ O	Solúvel em H ₂ O
APLICAÇÃO	Secante para tintas litográficas e vernizes. Pigmentos para decoração de vidro e cerâmica	Em higrômetros como indicador de umidade Estabilizante de espuma na cerveja. Terapêutica	Manufatura de pigmentos para vidro e cerâmica. Síntese de outros compostos de Co, é encontrado na natureza como esferocobaltita	Agentes secantes (tintas e vernizes) pigmentos(vidro e cerâmica)

4.2-Fontes de exposição

4.2.1- Ambiental

O Co foi reconhecido na décima edição do (RDA) *Recommended Dietary Allowances*⁽⁷⁰⁾, em 1989, como um micronutriente essencialmente importante. Os metais são distribuídos naturalmente no ambiente por ciclos geológicos e biológicos, como pode ser verificado na Figura 1⁽¹⁹⁾.

A água da chuva dissolve rochas e minérios, transportando-os por meios físicos para rios e nascentes, depositando e retirando materiais do solo adjacente e, eventualmente, transportando estas substâncias para o oceano, onde serão precipitadas como sedimento, ou incorporadas à água da chuva para serem redistribuídas em qualquer outro lugar da Terra ⁽²¹⁾. Os ciclos biológicos incluem bioconcentração por plantas e animais e incorporação na cadeia alimentar ⁽²¹⁾.

Através da extração do metal do minério e da atividade industrial humana com a produção de novos compostos, o tempo de permanência do metal nas suas fontes naturais fica diminuído, resultando num aumento na distribuição mundial. A contaminação ambiental por um determinado metal reflete tanto fontes naturais como também contribuição da atividade industrial⁽²¹⁾.

FIGURA 1-CICLO DE METAIS NO MEIO AMBIENTE [Beijer e Jernelov (1986)] in Friberg,L.;Nordberg,G.F.; and Voulk,V.B.(eds) Handbook on the Toxicology of metals,Vol 1,2^a ed.,General Aspects Elsevier Scientific Publication, Amsterdam,1986 pp68-74⁽¹⁹⁾

O Co é um elemento relativamente raro. Ocorre na crosta terrestre na faixa de 0,001-0,002%, onde é encontrado na forma de minérios como cobaltita (CoS_2), linneita (Co_3S_4), esmaltita (CoAs_2) e eritrita ($3\text{CoO} \cdot \text{As}_2\text{O}_5 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$)⁽⁶⁴⁾. No solo, a concentração de

Co é da ordem de 1-40mg/Kg⁽²³⁾. Para a população em geral, a dieta representa a principal fonte de exposição ao Co. Não existe nenhuma recomendação oficial para ingestão diária de Co⁽⁷⁰⁾, exceto em termos de vitamina B12⁽³³⁾. De acordo com o IARC⁴⁵ de 1991, a ingestão diária relatada na literatura varia entre 1,7 a 100µg/dia. Num estudo realizado com dietas obtidas em diferentes regiões brasileiras, a faixa obtida para o Co foi de 13-36µg/dia⁽³³⁾. Na água potável, têm sido encontradas, concentrações de 0,1-5µg/L⁽³¹⁾. No macro ambiente, a concentração de Co no ar é normalmente baixa, isto é, < 10ng/m³ ⁽²⁸⁾. Níveis que excedem estes valores já foram relatados em cidades industriais⁽³¹⁾. Todos esses dados podem ser observados na Tabela 3

TABELA 3 - CONCENTRAÇÕES DE CO ENCONTRADAS EM DIFERENTES AMOSTRAS E NA DIETA

AMOSTRAS/ DIETA	CONCENTRAÇÕES	REFERÊNCIAS
Solo	1-40 mg/Kg	(23)
Ar ambiente	<10 ng/m ³	(28)
Água potável	0,1-5 µg/L	(31)
Dieta	1,7-100 µg/dia	(45)
Dieta brasileira	13-36 µg/dia	(33)

4.2.2- Ocupacional

A principal utilização industrial do Co é na produção de ligas metálicas onde a exposição ocorre durante o processo de moagem do minério, mistura do pó com os outros componentes, sinterização, e posterior usinagem do aço na produção de ferramentas e peças para maquinários ,como brocas, e discos para polimento⁽⁹⁵⁾. Um terço do Co é utilizado na produção de outras formas químicas, como catalisadores e pigmentos⁽³⁷⁾.

Aproximadamente 60% da produção mundial de Co vem das minas do Zaire e, em menor extensão, da Zâmbia, do Canadá e dos

Estados Unidos. O Co é produzido principalmente como subproduto da mineração de Cu e Ni, que usualmente contêm Co em proporção menor que 1%. As ligas de Co que apresentam alto ponto de fusão, dureza e resistência a oxidação, são ⁽²⁸⁾:

- ♦ superligas resistentes a corrosão, contendo também cromo, níquel, tungstênio, tântalo ,alumínio ,titânio, zircônio e pequenas quantidades de outros metais, utilizadas principalmente na produção de lâminas de corte;
- ♦ ligas magnéticas contendo Co, níquel, alumínio, cobre e titânio, utilizadas principalmente na indústria eletroeletrônica;
- ♦ aços de alta resistência, que, com o cromo o Co (25-65%), forma uma liga de aço altamente resistente ao calor;
- ♦ aços eletro-depositados;
- ♦ aços com propriedades especiais, como os usados em implantes cirúrgicos em ligas com cromo, níquel, molibdênio e 65% de Co; ⁽²³⁾
- ♦ aço “*metal duro*”* produzido por processo de “*sinterização*”** em que o pó de Co (5-10%), atuando como ligante, é misturado ,em proporção maior que 80%, com carbetos de tungstênio e/ou titânio, tântalo, nióbio e molibdênio. O Co nessas misturas atua como ligante dos diversos tipos de pós, permitindo a produção de aço com tais características.

• “metal duro” é uma denominação genérica para metais que possuem propriedades de alta resistência ao calor e impacto⁽⁷²⁾

• ** A sinterização, de maneira genérica, consiste num processo de produção de ligas em que o pó, com os constituintes definidos, é prensado e submetido a uma temperatura acima de 1000°C ,(para o Co 1550 °C) embora abaixo do ponto de fusão da liga, assim, o material forma uma liga sem ocorrer o processo de fusão⁽⁸²⁾.

O pó de Co é também utilizado na produção de discos para polimento de diamantes. Vários compostos de Co como por exemplo o acetato de Co II ou III, o naftenato e o octanato, são utilizados como pigmentos na indústria de vidro e de cerâmica e como agente secante de tintas e vernizes. Os óxidos de Co são também utilizados como catalisadores na indústria química e de óleos.

O Co também é utilizado como ^{60}Co na cobaltoterapia para substituir o rádio no tratamento de alguns tipos de câncer. Na terapêutica, também tem sua utilidade para tratamento da intoxicação por cianeto como $\text{CoEDTA}^{(23)}$.

4.3- Características toxicocinéticas

4.3.1- Principais vias de introdução, absorção e distribuição

Do ponto de vista ocupacional, as principais vias de introdução e absorção são a oral e a respiratória. Estudos experimentais com animais e observações no homem têm demonstrado que o Co é bem absorvido pelos tratos gastrointestinal (TGI) e pelas vias respiratórias. A velocidade de absorção, provavelmente, é dependente da solubilidade dos compostos de Co em meio biológico (Tabela 1 e 2).

A absorção por via dérmica é considerada desprezível $^{(28)}$.

4.3.1.1- Respiratória

a) Óxidos: estudos em ratos $^{(75)}$ mostraram que o óxido de Co, quando inalado por instilação intratraqueal (1,5 μg), fica retido no pulmão por um período relativamente longo, com uma meia-vida de aproximadamente 15 dias, demonstrando que a absorção pulmonar é lenta para este composto;

b) Co metálico: na necropsia de um indivíduo de 36 anos, exposto a poeiras de metal na atividade de polimento, com provável diagnóstico de fibrose pulmonar, foi quantificado Co no tecido pulmonar por Espectrofotometria de Absorção Atômica, sendo encontrada 1010 µg de Co/Kg de peso úmido. Por outro lado, no pulmão de 21 indivíduos não expostos, foi encontrada uma média de 5,2 µg de Co/Kg de peso úmido, utilizando-se o mesmo método para quantificação ⁽⁴⁰⁾.

4.3.1.2- Gastrintestinal

Não se conhecem mecanismos para controle de absorção de íons metálicos na forma livre⁽⁹⁰⁾. A taxa de absorção oral de compostos de Co solúveis pode variar de 5 a 45%⁽³¹⁾. As variações interindividuais são ocasionadas pelas diferentes formas químicas do Co⁽²⁸⁾, como também pela presença de ferro, aminoácidos e proteínas na alimentação, ou mesmo pelo estado de jejum ⁽⁹⁰⁾.

4.3.2 Biotransformação, armazenamento e eliminação

Os metais possuem em comum a característica de não serem biotransformados no organismo humano⁽²¹⁾. Estima-se que o organismo todo contém de 0,7 a 1,1 mg de Co, distribuídos conforme mostra a Tabela 4.

TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DE Co NO ORGANISMO

Co	%	FORMA QUÍMICA
Esqueleto	14	Hidroxiapatita
Músculo	43	Inorgânico e
Outros tecidos	43	vitamina B12
Total	100	-

A vitamina B12, uma das formas químicas na qual o Co está presente no organismo na faixa de 2 a 5 mg, é uma molécula que contém cerca de 4,4 % Co, correspondente a 0,09 a 0,22 mg⁽⁹⁰⁾.

No sangue, a concentração de Co é de 1,5 a 2 vezes maior nos glóbulos vermelhos do que no plasma. No plasma, o Co é transportado ligado à transcobalamina⁽⁹⁰⁾.

O Co é captado por todos os tecidos. As concentrações mais altas, aproximadamente 20% da carga total, são encontradas no fígado. Em necropsia de fígado, os valores variaram entre 0,01 a 0,07 mg de Co/Kg de peso úmido, a maior parte como vitamina B12. Também foi encontrado Co em outros órgãos, como os rins, tireóide, glândulas adrenais e, em menor extensão, no músculo esquelético, coração, baço, pâncreas, cérebro e pulmão⁽⁹⁰⁾.

Não há indicações de que o Co se acumule no organismo com o passar dos anos. A quantidade de Co normalmente armazenada no corpo é cerca de 1,5 mg, principalmente na forma de vitamina B12, e não parece ser dependente da idade do indivíduo⁽³¹⁾.

Uma vez absorvido pela via gastro-intestinal ou pulmonar, o Co é excretado principalmente pela urina, em proporção de aproximadamente 80%, e em torno de 15% através das fezes⁽³¹⁾. A eliminação urinária é caracterizada por uma fase rápida de poucos dias de duração e uma fase lenta (10%), com uma meia-vida biológica de 2 a 15 anos⁽⁹⁰⁾. Num estudo com trabalhadores expostos a poeiras de metal duro, PELLET et al.⁽⁷⁴⁾ observaram que, durante as primeiras 35 horas, a eliminação de Co pela urina é rápida, depois atinge um platô que é variável de acordo com o tempo de exposição.

4.4- Toxicodinâmica

Os metais têm no organismo um papel principalmente catalítico, agindo como um grupo prostético em sítios ativos e/ou como cofator

para metaloenzimas ⁽⁶⁵⁾. Assim, os alvos da ação tóxica são os processos bioquímicos que ocorrem nas células, especificamente as enzimas e/ ou membranas de células e organelas. O efeito tóxico do metal envolve geralmente uma interação entre o metal livre na forma de íon com o sítio alvo. A toxicidade é determinada pela dose em nível molecular/celular e, assim, fatores como a forma química e capacidade de ligação, tornam-se críticos⁽²¹⁾.

O mecanismo de toxicidade do Co, evidenciado experimentalmente, pode incluir os seguintes efeitos ⁽⁹⁰⁾:

a) em nível metabólico:

- substituição do Zn pelo Co: níveis elevados de Co no organismo podem conduzir à substituição do Zn pelo Co em enzimas Zn dependentes. Os efeitos adversos desta substituição estariam relacionados, provavelmente, com aqueles ocasionados pela deficiência de zinco, tais como anorexia, dermatites e cicatrização de ferimentos prejudicada ⁽⁶²⁾;
- alterações no metabolismo de carboidratos: diminuição na utilização de glicose, na captação de oxigênio e na produção de energia , processos indispensáveis para a respiração tecidual e fosforilação oxidativa;
- alteração na oxidação beta de ácidos graxos: doses tóxicas de Co deprimem a oxidação beta de ácidos graxos de cadeia longa na mitocôndria do miocárdio. A hiperlipidemia pode ser provocada por este efeito, assim como pela inibição da lipoproteína lipase. Outra causa de alterações no metabolismo de lípidos é o aumento na atividade de hormônios no plasma. Estas alterações conduzem a um rápido aumento de triglicérides, acompanhado por um aumento mais lento de colesterol, ácidos graxos livres, beta-lipoproteínas, fosfolípidos e glicerol;
- alteração na síntese do heme: O Co inorgânico ,quando administrado com Fe a pacientes anêmicos, aumenta a captação deste pela medula óssea e a taxa de produção de glóbulos vermelhos. Este

efeito ocorre devido ao estímulo de produção de eritropoietina pelo rim. Este mecanismo também pode ser atribuído ao efeito do Co no lisossoma, liberando eritropoietina das enzimas lisossômicas. O efeito não é permanente, pois há o desenvolvimento de tolerância⁽⁹⁰⁾. Apesar da ação eritropoiética, doses tóxicas de Co inibem a biossíntese do heme e, como consequência, ocorre um aumento da atividade enzimática da ácido delta-aminolevulínico sintetase e indução da heme oxigenase; paralelamente, há diminuição das hemoproteínas hepáticas como por exemplo o citocromo P₄₅₀;

- disproteinemia sérica;
- hipocoagulabilidade;
- aumento da fração α -globulina e do ácido neuramínico: Uma característica da toxicidade do Co é o aumento da fração α -globulina devido ao aumento do ácido neuramínico no soro, um constituinte da fração desta proteína.

b) em nível de órgãos e glândulas:

- tireóide: interação do Co com o metabolismo do Iodo pela inibição da tirosina iodinase e diminuição reversível na captação desse;
- coração: degeneração de sarcomas do miocárdio provocados por inativação de enzimas oxidoreduativas; depressão no catabolismo de glicose e 2-oxiglutarato e danos a elementos mitocôndriais, com consequente aumento da atividade de enzimas do miocárdio no soro;
- pâncreas: danos às células α das ilhotas de Langerhans com hiperglicemia;
- rins: danos às células do epitélio dos túbulos proximais com proteinúria e glicosúria;
- fígado: prejuízo da função hepática com infiltração de gorduras; alterações enzimáticas nos hepatócitos, resultando em aumento de enzimas hepáticas no soro;
- vias respiratórias: inflamação de naso-faringe, asma brônquica, fibrose pulmonar

4.5-Principais efeitos tóxicos

Embora historicamente a toxicologia dos metais se refira a efeitos agudos, atualmente este tipo de efeito é relativamente raro, devido aos conhecimentos de toxicidade que vão se renovando e aos critérios de prevenção adotados em saúde ocupacional⁽⁷¹⁾.

De acordo com a atividade desenvolvida pelo trabalhador a exposição ocupacional pode ser ao pó do metal puro e/ ou a poeiras contendo óxidos ou sais de Co e, dependendo da via de penetração ocorrerão diferentes efeitos em diferentes órgãos alvo. Considerando as principais vias de penetração na exposição ocupacional, será abordado neste trabalho o efeito tóxico no trato respiratório e na pele, assim como a potencial carcinogenicidade.

4.5.1- Trato respiratório

De acordo especialmente com os relatos de TOLOT et al.⁽⁸⁹⁾, diferentes tipos de reações podem afetar tanto o trato respiratório superior como também a árvore brônquica e o parênquima pulmonar:

a) Trato respiratório superior

O efeito ocorre ou como resultado de uma ação irritativa de partículas contendo Co, ou por intermédio de uma reação mediada imunologicamente. Em trabalhadores expostos, pode-se observar uma inflamação de naso-faringe ou uma rinite alérgica.

b) Árvore brônquica

Em alguns trabalhadores⁽⁸¹⁾ foi observado *asma ocupacional* devida à exposição a poeiras de metal duro, efeito decorrente da sensibilidade ao Co. A exposição à poeira contendo Co ocorria em todas as fases de manipulação, desde a produção do pó para ser

incorporado à produção da liga até a sinterização e a produção de ferramentas a partir deste aço. Estes sintomas já foram observados também em trabalhadores que manipulavam óxido de Co⁽⁷²⁾. SHIRAKAWA et al.⁽⁸¹⁾ identificaram uma IgE específica contra um complexo de Co com albumina sérica humana em trabalhadores com diagnóstico de asma brônquica, levando a crer que esse tipo de efeito esteja associado a uma resposta alérgica ao Co. Nestes casos, a moléstia, em geral, progride para uma obstrução das vias aéreas.

Estas crises asmáticas podem ser induzidas por testes de *bronceprovação* com cloreto de Co⁽²³⁾. Esses testes realizados por DAVISON et al.⁽²⁶⁾ mostraram resultados positivos tanto ao pó de Co puro como também na forma de metal duro. Quando havia uma diminuição de 15% no volume expiratório forçado em 1 segundo (FEV - *Forced expiration volume/min*), o efeito de bronceprovação foi considerado positivo. De acordo com o NIOSH⁽⁶⁹⁾, a irritação respiratória e os testes de função pulmonar revelam sinais de doença obstrutiva crônica e podem ser observados em concentrações de 0,06 mg/m³ de Co no ambiente de trabalho⁽²³⁾.

c) Lesões parenquimatosas

Exposições industriais ao Co metálico podem resultar num tipo grave de fibrose pulmonar denominada doença de metal duro ou "*hard metal disease*"^(40,84) que foi primeiramente descrita em trabalhadores alemães em 1940, sendo que, desde essa época muitas observações têm sido feitas em países industrializados. A moléstia se inicia com um tosse seca, não produtiva, que pode estar associada a uma insuficiência respiratória. A moléstia progride para uma fibrose intersticial cujo sintoma mais significativo é uma severa dispnéia progressiva⁽²³⁾.

É bem conhecido o papel dos macrófagos nas lesões do parênquima pulmonar induzidas por vários tipos de poeiras, que uma vez estimulados podem produzir uma variedade de mediadores

químicos, estimulando a proliferação de fibroblastos ⁽⁵⁷⁾. De acordo com os achados patológicos de CULLEN⁽²⁵⁾, na doença do metal duro, observa-se desde intensa alveolite com pneumonia intersticial descamativa até uma fibrose pulmonar não específica. No estágio final, a falência da função pulmonar e cardiorespiratória conduzem à morte. A transição entre a alveolite e a fibrose permanente provavelmente é um processo gradual, sendo estas duas condições consideradas extremas dentro de um processo contínuo de evolução.

Estudos experimentais realizados em suínos expostos ao pó do metal puro nas concentrações de 0,1 mg/m³ e 1,0 mg/m³, comparados ao um grupo controle, mostraram alterações nos testes de função pulmonar, especialmente na complacência pulmonar*, para as duas concentrações de exposição⁽⁴⁹⁾.

Baseada nestes dados experimentais e em observações no homem, a ACGIH⁽⁸⁾, em 1984, alterou o TLV-TWA (Limite de exposição-Média ponderada) proposto em 1976 de 0,1 mg/m³ para 0,05 mg/m³. Em 1996, a ACGIH⁽⁸⁾ alterou estes limites de exposição para 0,02mg/m³.

Em alguns relatos de alterações nos testes de função pulmonar de trabalhadores expostos a poeira de Co na forma de liga com carbeto de tungstênio, após exaustão na área de manipulação da liga, foi constatada uma melhora moderada nos testes de função pulmonar. Esta ocorria mesmo após o estabelecimento da fase fibrótica, sem que os valores esperados para os testes retornassem a normalidade ⁽³⁰⁾. Os testes de função pulmonar realizados foram: VC (*vital capacity* - capacidade vital); FEV (*forced expiratory volume in one second* - volume expiratório forçado em 1 segundo-); DL_{co} (*single breath* CO *diffusing capacity* - capacidade de difusão respiratória de monóxido

*A complacência pulmonar é um teste de função pulmonar, cujo objetivo é mensurar alterações no volume pulmonar causadas por pressão intra-alveolar avaliando a elasticidade e capacidade de distensão dos pulmões e tórax. Geralmente

qualquer moléstia que diminua a capacidade funcional dos tecidos pulmonares, reduz a complacência e conseqüentemente aumenta o esforço respiratório⁽⁴⁹⁾.

de carbono) e TLC (*total lung capacity* -capacidade pulmonar total) (Tabela 5). Por outro lado, existem relatos de instalação de fibrose irreversível progressiva, levando à morte mesmo após a retirada do trabalhador do ambiente de exposição⁽³⁴⁾.

TABELA 5- COMPARAÇÃO ENTRE ALGUNS TESTES DE FUNÇÃO PULMONAR APLICADOS EM TRABALHADORES DE UMA INDÚSTRIA DE CARBETO DE TUNGSTÊNIO COM SINTOMAS DE FIBROSE DO PARÊNQUIMA PULMONAR

trabalhador	*		**		*		**		*		**	
	VC	VC	VC	FEV	FEV	FEV	TLC	TLC	TLC	DL _{co}	DL _{co}	DL _{co}
1	0,85	1,051	4,23	0,69	0,95	3,47	2,70	-	5,25	4,1	8,7	30,2
1(após exaustão)	1,71			1,54						16,9		
2	1,70	2,1	5,49	1,39	1,90	4,38	2,90	3,2	6,97	16,0	18,0	41,2
3	1,89	2,56	3,39	1,65	2,29	2,61	3,07	3,40	4,42	20,2	21,1	24,3

VC (litros),FEV (litros) TLC (litros) e DLco(ml/min/mm Hg) após a exposição e instalação dos sintomas.

* VC,FEV ,TLC e DLCO pós-tratamento

**VC,FEV ,TLC e DLCO esperado

A hipersusceptibilidade individual tem provavelmente um papel importante, uma vez que apenas uma pequena porcentagem de trabalhadores expostos ao Co desenvolve fibrose intersticial. Em alguns estudos, verificou-se não existir uma boa correlação entre o estabelecimento da fibrose e o tempo de exposição⁽³⁰⁾. O fato dos

pulmões fibróticos conterem pequenas quantidades de Co pode ser explicado pela alta solubilidade desse metal nos fluídos biológicos, até mais que em solução fisiológica, causando, assim, uma rápida remoção deste do tecido pulmonar⁽⁴⁰⁾.

Num estudo epidemiológico realizado em trabalhadores que produziam Co na forma de óxidos, sais e metal puro, não foram observados alterações em nível de parênquima pulmonar comparativamente a um grupo controle^(67,88).

Ainda com relação às lesões parenquimatosas e a interação com o carbeto de tungstênio, merece atenção o fato de que, o indivíduo ocupacionalmente exposto ao Co pode também estar exposto a outras partículas. Deve ser considerado o papel desempenhado por estes outros constituintes e sua possível interação com o Co na patogênese de lesões intersticiais do pulmão^(52,85). Este ponto de vista é sustentado por LISON & LAUWERYNS⁽⁵⁷⁾, que, através de estudos de toxicidade “*in vitro*” em macrófagos peritoneais e alveolares de ratos, demonstraram claramente que a reatividade da mistura carbeto de tungstênio e Co é diferente daquela observada com o pó de Co puro e o carbeto de tungstênio isoladamente; esta mistura é considerada quase tão tóxica como a sílica cristalina para os macrófagos alveolares de ratos. Testados separadamente, tanto o carbeto de tungstênio como o pó de Co puro provocam alterações leves na viabilidade celular. Neste experimento, a viabilidade celular foi monitorizada pela liberação da enzima desidrogenase láctica (DHL), que reflete a integridade da membrana plasmática e, também, através das alterações morfológicas dos macrófagos. Neste mesmo estudo verificou-se que a captação de partículas de Co pelos macrófagos aumenta na presença do carbeto de tungstênio. Estes dados concordam com estudos realizados em ratos, nos quais verificou-se que a instilação da mistura de Co com carbeto de tungstênio (1,0 mg de Co /16,67 mg carbeto de tungstênio /100g de peso corpóreo), provocava uma alveolite severa e um edema

pulmonar fatal⁽⁵³⁾. Em contrapartida, a aplicação de uma dose equivalente de pó de Co puro causava um efeito inflamatório moderado. Estes dados experimentais explicam porque a doença causada por este metal raramente é observada em trabalhadores expostos a poeiras do metal puro. A indução de uma severa alveolite que pode conduzir a uma fibrose pulmonar é aparentemente devida à inalação simultânea de outros compostos, tais como o carbetto de tungstênio.

Estes trabalhos levam a crer que os níveis aceitáveis de exposição deveriam variar, dependendo de a exposição ser decorrente do metal puro ou em combinação com outras substâncias como o carbetto de tungstênio^(53,57). Tem sido discutido também que a toxicidade do Co, dose-dependente da concentração presente no ambiente de trabalho, pode estar relacionada com o fato do Co estar na forma iônica ou molecular^(30,82).

4.5.2-Trato dérmico

Numa indústria de manufatura de carbeto, cujos materiais utilizados incluíam Co metálico, foi observado um progressivo aumento dos casos de dermatite, acreditando-se que o Co pode provocar eczema e urticária⁽⁷⁹⁾. Reações dérmicas também já foram observadas em trabalhadores que produziam sais e óxidos de Co⁽⁸⁸⁾. Estas reações se assemelham a uma dermatite alérgica de contacto caracterizada por pápulas eritematosas, que se assemelham muito àquela provocada pelo níquel. Nestes casos, testes de sensibilização dérmica com cloreto de Co a 1% mostraram reações positivas.

Reações cruzadas com o níquel parecem freqüentes⁽⁷⁹⁾. Observações clínicas sugerem que trabalhadores expostos a metais duros com sensibilidade simultânea ao Ni e Co têm um eczema muito mais severo do que aqueles com sensibilidade ao Ni ou Co isoladamente⁽²³⁾.

4.5.3- Sistema cardíaco e glândula tireóide

Exposições ao Co por via oral e pulmonar podem produzir lesões no miocárdio. Estudos a respeito destes efeitos foram realizados após surtos endêmicos de cardiomiopatia degenerativa fatal observada em consumidores freqüentes de cerveja ,após a introdução de cloreto e/ou sulfato de Co como estabilizadores de espuma na cerveja de alguns países⁽³¹⁾.

Em estudos realizados em animais com exposição pulmonar a concentrações de 0,1mg/m³ e 1,0 mg/m³ de poeiras de Co metal puro (6 horas/dia e 5 dias por semana), após um prazo de 6 meses, foram observadas algumas alterações no eletrocardiograma (ECG), indicando algum tipo de anormalidade funcional⁽⁴⁹⁾.

Diferentes casos de miocardiopatia foram associados à exposição industrial:

a) um indivíduo que foi a óbito por choque cardíaco durante uma cirurgia trabalhava em atividade que envolvia manipulação do pó do Co na forma metálica; durante a necropsia, realizou-se um estudo microscópico do tecido do miocárdio, revelando uma fibrose extensiva e difusa. Uma amostra deste tecido foi analisada para o Co e revelou concentrações de 7 µg/g comparativamente a um grupo controle no qual foram encontrados níveis de Co de 0,1-0,4 µg/g de miocárdio⁽⁴⁸⁾;

b) o estudo microscópico do tecido do miocárdio na necropsia de um indivíduo que tinha sido submetido a uma exposição a pó de Co metálico por 4 anos, revelou semelhança àquele encontrado entre os consumidores de cerveja que apresentaram cardiomiopatia fatal após consumo de cerveja com sulfato de Co⁽¹⁶⁾.

Numa indústria que produzia sais, óxidos e pó de Co metálico foram observados, em alguns trabalhadores, interferência no metabolismo tireoideano com um aumento de TSH (hormônio tireoideano) e diminuição de T₃(triiodotironina) e T₄(tetraiodotironina)⁽⁷⁷⁾.

4.5.4-Carcinogenicidade

Diversos experimentos realizados em animais de laboratório mostraram que injeções intramusculares, subcutâneas ou intraperitoneais, únicas ou repetidas, de pó de Co ou compostos de Co, podem produzir tumores no local da injeção⁽⁵⁴⁾. Por outro lado nos estudos de STEINHOFF e MOHR⁽⁸⁶⁾, em ratos, foi verificado que a administração de óxido de Co (II) induzia tumores de pulmão em apenas alguns animais.

Pela observação de trabalhadores expostos freqüente e excessivamente a pós de Co, alguns autores constataram poucos casos de câncer⁽⁶⁹⁾.

Num estudo sobre mortalidade ocorrida entre 1950 e 1980 com 1140 trabalhadores franceses de uma indústria eletroquímica que produzia Co e Na, verificou-se que entre os trabalhadores da produção de Co havia um aumento relativo de mortes (4 casos), especialmente por câncer de pulmão. No entanto, o nexó causal não pôde ser estabelecido, devido ao número muito baixo de casos, além da associação ao tabagismo e à exposição simultânea a arsênio e níquel⁽⁶⁸⁾.

Em 3163 trabalhadores suecos do sexo masculino expostos ao Co, foi observado um aumento significativo de mortes por câncer de pulmão (7 observados/2,5 esperados), especialmente naqueles trabalhadores com pelo menos 10 anos de emprego; todavia, não foi encontrada uma relação dose/resposta⁽⁴²⁾. Os dados epidemiológicos disponíveis ainda não são suficientes para indicar o risco de câncer em indivíduos ocupacionalmente expostos ao Co⁽²³⁾, mas, segundo o IARC⁽⁴⁵⁾, as evidências de carcinogenicidade em animais experimentais é um fato consumado, conforme já relatado por alguns autores que acreditam haver evidências suficientes da carcinogenicidade do pó do metal e óxido de Co II em animais experimentais⁽³⁷⁾. O papel dos

metais no mecanismo de carcinogênese consiste na reação com vários compostos endógenos, tais como peróxido de hidrogênio, radicais sulfito e glutatona, produzindo espécies ativas e reativas, causando alterações ao nível de DNA, consideradas mutagênicas⁽³⁷⁾

Segundo o IARC ⁴⁵ (1992), o Co e os compostos de Co são considerados potencialmente carcinógenos ao homem (grupo 2B), pois demonstraram fortes evidências de carcinogenicidade em animais experimentais.

4.6- Monitorização biológica e indicadores biológicos

4.6.1-Equivalência de alguns termos utilizados pela legislação americana e brasileira

A implantação de programas de monitorização biológica tem como objetivo auxiliar na tomada de decisões relativa à prevenção de efeitos nocivos ⁽⁷¹⁾.

Em 1980, um comitê misto CCE/NIOSH/OSHA propôs um conceito para monitorização biológica com ampla aceitação internacional: “A Monitorização Biológica é a medida e avaliação de agentes químicos e/ou de seus produtos de biotransformação em tecidos, secreções, excreções, ar exalado e/ou combinação destes, para estimar exposição ou risco à saúde quando comparados com uma referência apropriada.”. Estas referências apropriadas dizem respeito aos limites biológicos de exposição ocupacional ⁽⁷¹⁾.

Segundo a ACGIH⁽⁸⁾, dos Estados Unidos, os índices biológicos de exposição (BEIs) são valores de referência tidos como guias para avaliação de risco potencial à saúde na prática de higiene industrial. Os BEIs representam os níveis de indicadores que são mais prováveis de serem observados em amostras coletadas de trabalhadores sadios que tenham sido expostos aos agentes químicos no mesmo nível que um

trabalhador com uma exposição no TLV-TWA. Na legislação brasileira⁽⁶⁰⁾, os TLV-TWA correspondem aos LTs (Limites de Tolerância NR 15 Anexo no 11 da portaria 3214 do Ministério do Trabalho) e os BEIs equivalem ao índice biológico máximo permitido (IBMP), definido como o valor máximo do indicador biológico para o qual se supõe que a maioria das pessoas ocupacionalmente expostas não corre risco de dano à saúde.

Os termos indicadores biológicos, marcadores biológicos e biomarcadores são utilizados de maneira indistinta, não existindo, assim, uma uniformidade no que diz respeito à utilização destes pela literatura. Biomarcadores, segundo AITIO⁽²⁾, refletem a resposta biológica à exposição e a interação entre o sistema biológico e o xenobiótico.

4.6.2-Programa de monitorização biológica na exposição ao Co

Para que se estabeleça um programa de monitorização biológica são necessários:

- existência de um indicador biológico;
- conhecimento da toxicocinética e das alterações provocadas especialmente no órgão-alvo;
- existência de um método analítico adequado;
- conhecimento e existência da relação dose-efeito e dose-resposta;
- existência de estudos conclusivos sobre valores de referência.

Com relação aos valores de referência, merece destaque um estudo, realizado em mais de 350 indivíduos italianos sadios, não expostos ocupacionalmente e moradores da mesma região (Lombarda), por meio do qual obtiveram-se resultados que permitiram

uma proposta de valores de referência para vários elementos em nível de traços⁽⁶⁶⁾. Nesse trabalho, foi incluído o Co, sendo utilizados os métodos de Análise por Ativação de Neutrons, Espectrofotometria de Absorção Atômica Eletrotérmica e Espectrofotometria de Emissão Atômica com Plasma Induzido para 46 elementos na urina, 35 no sangue e 26 no soro. Os valores indicativos para o Co são mostrados na Tabela 6.

TABELA 6 - PROPOSTA DE VALORES DE REFÊRÊNCIA PARA O CO⁽⁶⁶⁾

MATERIAL BIOLÓGICO	NÚMERO DE INDIVÍDUOS	MÉDIA ± DESVIO PADRÃO (µg/L)	VALORES DE REFERÊNCIA (µg/L)
Soro (ou plasma)	405	0,21±0,008	0,08-0,40
Sangue	441	0,39±0,13	0,01-0,91
Urina	468	0,57±0,10	0,18-0,96

4.6.3-Relação dose-efeito e dose-resposta na exposição ao Co

Uma das primeiras evidências de correlação Co no ar ambiente de trabalho *versus* Co no sangue foi relatada por ALEXANDERSSON E LIDUMS⁽⁶⁾ e é mostrada na Tabela 7:

TABELA 7-CORRELAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE POEIRA DE Co NO AR AMBIENTE DE TRABALHO *VERSUS* CONCENTRAÇÃO DE Co NO SANGUE

CONCENTRAÇÃO DE CO NO AR (mg/m ³)	CONCENTRAÇÕES DE CO NO SANGUE(µg/L)
0,09	10,5 ±10,9
0,01	0,7±0,2

Estudando 10 grupos de trabalhadores de uma indústria de ferramentas produzidas com metal duro, ICHIKAWA et al.⁽⁴³⁾ determinaram as concentrações de Co na urina e no sangue, correlacionando com os níveis de exposição. A Tabela 8 mostra que as

concentrações de Co tanto no sangue como na urina de todos os grupos de trabalhadores expostos, mesmo daqueles expostos a menores concentrações de Co na atividade de sinterização, apresentaram níveis significativamente mais altos do que o grupo controle, considerados os trabalhadores em funções administrativas ($p<0,05$ no sangue e $p<0,01$ na urina).

TABELA 8-MÉDIA E DESVIO PADRÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE CO NO AR DO AMBIENTE DE TRABALHO, SANGUE E URINA PARA GRUPOS DE TRABALHADORES EXPOSTOS EM DIFERENTES ATIVIDADES NA PRODUÇÃO DE CARBETO DE TUNGSTÊNIO

ATIVIDADES	Nº	Co no ar($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	Co no Sangue ($\mu\text{g}/\text{dL}$)	Co na urina($\mu\text{g}/\text{L}$)
Manipulação do pó	2	186 $\pm$ 108	1,08 $\pm$ 0,28	148 $\pm$ 14
Operadores de prensa	6	367 $\pm$ 324	1,87 $\pm$ 1,96	235 $\pm$ 182
Operadores de prensa automática	11	56 $\pm$ 60	0,57 $\pm$ 0,53	34 $\pm$ 43
Operadores(torno)	7	33 $\pm$ 15	0,67 $\pm$ 0,44	33 $\pm$ 30
Operadores(serra)	21	50 $\pm$ 35	0,52 $\pm$ 0,31	41 $\pm$ 60
Operadores da sinterização	21	28 $\pm$ 30	0,26 $\pm$ 0,10	10 $\pm$ 10
Lapidação em Meio úmido				
A	27	44 $\pm$ 48	0,42 $\pm$ 0,31	35 $\pm$ 34
B	18	45 $\pm$ 50	0,33 $\pm$ 0,10	19 $\pm$ 15
C	12	92 $\pm$ 92	0,43 $\pm$ 0,39	68 $\pm$ 87
D	25	44 $\pm$ 54	0,35 $\pm$ 0,20	17 $\pm$ 16
Trabalhadores com respirador	25	317 $\pm$ 307	0,65 $\pm$ 0,86	26 $\pm$ 30
Trabalhadores da parte administrativa	20	nd	0,19 $\pm$ 0,11	2 $\pm$ 1

Com relação aos dados obtidos, a correlação foi linear e significativa para:

- Concentração no ar x Concentração no sangue: $r=0,96$ e $P<0,001$ (Figura 2)

FIGURA 2-REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CORRELAÇÃO ENTRE NÍVEIS DE EXPOSIÇÃO AO CO E CONCENTRAÇÕES OBTIDAS NO SANGUE EM 10 GRUPOS DE TRABALHADORES EXPOSTOS EM DIFERENTES FUNÇÕES (ICHIKAWA et al.)⁽⁴³⁾

- Concentração no ar x Concentração na urina: $r=0,99$ e $P<0,001$ (Figura 3)

FIGURA 3-REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CORRELAÇÃO ENTRE NÍVEIS MÉDIOS DE EXPOSIÇÃO AO Co E CONCENTRAÇÕES ENCONTRADAS NA URINA EM 10 GRUPOS DE TRABALHADORES EXPOSTOS EM DIFERENTES FUNÇÕES (ICHIKAWA et al.)⁽⁴³⁾

- Concentração no sangue e na urina: $r=0,96$ e $P<0,001$ (Figura 4)

FIGURA 4-REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CORRELAÇÃO ENTRE AS CONCENTRAÇÕES MÉDIAS DE CO NA URINA E NO SANGUE DE 10 GRUPOS DE TRABALHADORES EXPOSTOS EM DIFERENTES FUNÇÕES.(ICHIKAWA et al.)⁽⁴³⁾

Estes resultados mostram claramente que as concentrações de Co tanto no sangue como na urina podem ser utilizadas como indicadores biológicos de exposição ao Co.

Uma vez cessada a exposição, a curva de excreção do Co urinário mostra 2 fases de eliminação, podendo fornecer, dessa forma, informações úteis da exposição corrente e da acumulada⁽⁶⁾ (Figura 5). Este aspecto pode ser uma vantagem em relação à utilização de Co na urina ao invés de no sangue como indicador biológico; além do mais, a concentração de Co urinário aumenta consideravelmente com a exposição, enquanto que o aumento dos níveis de Co no sangue e soro são menores⁽²³⁾.

FIGURA 5- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS CONCENTRAÇÕES URINÁRIAS DE Co, EM DIFERENTES TEMPOS, APÓS A EXPOSIÇÃO EM 4 TRABALHADORES COM DIFERENTES GRAUS DE EXPOSIÇÃO (ALEXANDERSSON e LIDUMS)⁽⁶⁾

Segundo SCANSETTI et al. ⁽⁷⁸⁾, em trabalhadores expostos à poeira do metal, a fase inicial de eliminação é rápida, fato que é responsável pelo aumento da excreção urinária no final do turno de trabalho. Além do mais existe um aumento progressivo de níveis de Co urinários ao longo da semana de trabalho, com os níveis mais altos detectados no final da semana de trabalho; estas informações vêm ao encontro dos dados obtidos por PELLET⁽⁷⁴⁾ que, ao estudar um grupo de 5 trabalhadores expostos, durante o processo de sinterização de carbetto de tungstênio, concluiu que as cobaltúrias eram crescentes ao longo da semana (Figura 6).

FIGURA 6- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO COMPORTAMENTO TEÓRICO DOS NÍVEIS DE CO URINÁRIO ANTES E APÓS O TURNO DE TRABALHO, DURANTE UMA SEMANA(PELLET et al.)⁽⁷⁴⁾

4.6.4-Importância dos dados obtidos na monitorização biológica

Quando os limites de exposição ocupacional são ultrapassados para um agente químico como o Co, a equipe de Saúde Ocupacional deve promover a diminuição da exposição. A ACGIH⁽¹⁰⁾, 1999, recomenda um TLV-TWA de 0,02mg/m³ para exposição a Co elementar e sais inorgânicos solúveis. Os indicadores biológicos recomendados são dosagem de Co no sangue e na urina e os BEIs respectivos são de 1 ug/L e 15ug/g creatinina⁽¹⁰⁾.

Num estudo realizado na Finlândia em trabalhadores expostos na manufatura, manutenção e atividades de polimento com lâminas de metais duros, o efetivo isolamento e exaustão do ambiente durante as atividades reduziu substancialmente a exposição ao Co⁽⁵⁵⁾. Nos locais A, B e C, voltados para atividades de manutenção e reparo de lâminas de corte, houve isolamento do maquinário e exaustão do ambiente, enquanto que nos locais E e D, onde se realizavam serviços de manufatura de ferramentaria, o líquido utilizado para diminuir o atrito em tal atividade, foi substituído por outro, no qual o Co era menos solúvel. As alterações nas concentrações de Co no ar antes e após as modificações podem ser observadas na Tabela 9.

TABELA 9- CONCENTRAÇÕES DE Co NO AR DO AMBIENTE DE TRABALHO (MÉDIA DE AMOSTRAS COLETADAS ENTRE 6 E 8 HORAS DE TRABALHO EM DIFERENTES LOCAIS).

Local de trabalho	Antes das mudanças		Após as mudanças	
	N	Co $\mu\text{g}/\text{m}^3$	N	Co $\mu\text{g}/\text{m}^3$
A	15	9-3,9	12	<2
B	8	16-160	6	<3
C	21	6-33	3	3 ¹
			3	11-15 ²
D	25	3-91	7	12-27
E	18	1-7	9	2-28

N= número de trabalhadores; ¹ Durante operação com máquinas semi-automáticas; ² Durante operação em máquinas manuais

As concentrações obtidas no ar ambiente e na urina do trabalhador antes e após as mudanças mostram que o isolamento e a ventilação do local de trabalho são mais importantes do que a solubilidade do líquido utilizado durante as atividades com metal duro (Tabela 10).

TABELA 10-CONCENTRAÇÕES DE Co URINÁRIO ANTES E APÓS AS MUDANÇAS NO AMBIENTE DE TRABALHO

Local de trabalho	Antes das mudanças		Após as mudanças	
	N	Co na urina $\mu\text{g}/\text{L}$	N	Co na urina $\mu\text{g}/\text{L}$
A	5	9,2-17,2	4	2,4-3,1 ¹
			5	0,4-1,5 ²
B	3	8,4-19,0	2	0,5-0,6
C	6	26,3-44,4	1	12,8
D	10	6,1-0,06	5	10,6-0,06
E	2	13,3-15,1	2	18,4-27,4

N= número de trabalhadores; ¹ Imediatamente após a mudança; ² Dois meses após a mudança

4.6.5-Indicadores Biológicos de Exposição (IBE) para o Co⁽³⁷⁾

A ACGIH ⁽¹⁰⁾, propôs em 1993 a utilização de BEI (*Biological Exposure Indice*) para exposição ao Co. Em 1995, esta proposta se tornou uma recomendação da ACGIH (Tabela 11). No Brasil ainda não está normatizado um IBMP (Índice Biológico Máximo Permitido) para a exposição ao Co pelo PCMSO da NR-7^(59,60).

TABELA 11-RECOMENDAÇÕES DA ACGIH PARA MONITORIZAÇÃO BIOLÓGICA DA EXPOSIÇÃO AO CO

AGENTE QUÍMICO	INDICADOR BIOLÓGICO	HORÁRIO COLETA	BEI
Co	Co na urina	Final da jornada e da semana	15 µg/g de creatinina
	Co no sangue	Final da jornada	1µg/L

No caso da exposição ao Co, assim como a outros xenobióticos, só podem ser usadas como indicadores biológicos aquelas substâncias que mostrem alterações proporcionais à intensidade de exposição ou do efeito biológico, assunto já abordado neste trabalho.

É importante ressaltar que os IBMPs devem ser periodicamente revistos à luz de novos conhecimentos sobre toxicidade de substâncias químicas. O PCMSO da NR-7^(59,60) teve a última modificação pela Portaria nº 8 de 8-5-96, assim apesar de relativamente atualizado, não contém dados relativos a monitorização biológica especificamente para o Co conforme recomenda a ACGIH^(8,9,10). A NR-7^(59,60) propõe que a relação dos indicadores biológicos deve estar sempre acompanhada de orientações relativas à colheita e ao armazenamento das amostras, aos métodos analíticos a serem usados e outros dados que sejam importantes para a avaliação dos resultados.

4.6.6-Fatores que afetam a monitorização biológica ⁽²⁹⁾:

A) Fisiológicos

Entre os fatores fisiológicos que podem afetar a Monitorização Biológica destacam-se:

- Postura: a postura vertical tende a provocar a hemoconcentração pela saída de água e constituintes ultrafiltráveis do sangue para o espaço extra vascular, especialmente nas extremidades inferiores. Assim, os constituintes não difusíveis podem mostrar concentrações superiores até 10% no sangue retirado do braço, de indivíduos que permaneçam de pé por 30 a 60 minutos antes da colheita⁽³⁸⁾;
- Alimentação: a alimentação rica em lipídeos pode alterar a distribuição de agentes químicos lipofílicos assim como o conteúdo protéico interfere também na absorção de alguns metais . O Co e o Fe competem na absorção quando presentes concomitantemente na mucosa duodenal e no intestino delgado⁽⁹⁰⁾.

Apesar de não terem sido ainda encontrados dados específicos que alterem a monitorização biológica para exposição ao Co em relação a idade, sexo, obesidade e ritmo circadiano, deve-se ficar atento a essas variações.

B) Ambientais (extra-ocupacionais) ⁽⁵⁾:

A progressiva melhora nas condições de higiene no local de trabalho aumentou a importância de se obter informações detalhadas sobre fatores extra-ocupacionais que possam influenciar os níveis dos indicadores biológicos. Estas informações são indispensáveis quando indivíduos que pertençam à população em geral são selecionados para estabelecer valores de referência e, também, quando os indivíduos são expostos ocupacionalmente a substâncias químicas específicas pouco estudadas.

Os fatores extra-ocupacionais interferentes para a maioria dos metais no que diz respeito à monitorização biológica são:

- Tabaco: ao contrário do que tem sido documentado em indivíduos da população em geral, os metais em nível de traços e solventes naturalmente presentes nas folhas de tabaco têm um efeito desprezível nos níveis dos indicadores biológicos de indivíduos expostos ocupacionalmente⁽⁵⁾;
- Bebidas alcoólicas: podem afetar a absorção, a distribuição, a biotransformação e a eliminação de toxicantes. Como a principal via de eliminação para o Co é a renal e como o álcool tem ação diurética, pode haver interferência na eliminação do Co por esta via;
- Hábitos Alimentares: a dieta pode ser uma fonte de exposição humana a vários xenobióticos, e para o Co podemos citar a utilização de seus sais como estabilizante de espuma na produção de cerveja em alguns países⁽³¹⁾. Não deve ser negligenciada a possibilidade da presença do mineral no solo de uma determinada região, o que pode levar a um aumento dos níveis esperados para a água e alimentos;
- Implantes Ortopédicos: no caso de metais, no contexto geral não podemos esquecer da utilização de implantes ortopédicos que se utilizam de ligas com Co. Foi verificado num trabalhador exposto ocupacionalmente a baixas concentrações de Cr no ar, altas concentrações de Cr e Co na urina (54 µg/L e 223 µg/L respectivamente). Esses valores foram atribuídos à exposição extra-ocupacional, uma vez que 3 anos antes o trabalhador tinha se submetido a uma cirurgia para colocar uma prótese em que a liga utilizada era constituída prevalentemente de Co e Cr⁽⁵⁾.

Com relação à utilização de medicamentos, estes devem ser observados com relação a possíveis interferências que possam vir a ocorrer na monitorização biológica de maneira geral.

C) Patológicos

Várias são as disfunções orgânicas que podem afetar a monitorização biológica:

- nefropatias e hepatopatias: afetam indistintamente a eliminação e biotransformação. No caso do Co, como a principal via de eliminação é a urinária, qualquer alteração da depuração renal é um fator importante a ser considerado. Já foi relatado que lesões renais podem causar retenção de metais como o alumínio, cuja via principal de excreção também é o rim⁽³⁾;
- ventilação pulmonar: quando esta estiver alterada, provoca variações na absorção de Co;
- deficiência de ferro, hemocromatose idiopática e anemia sideroblástica facilitam a absorção de Co no homem⁽⁹⁰⁾.

D) Fatores toxicocinéticos

- Meia-vida de eliminação ($t_{1/2}$): Como a concentração de Co no sangue e na urina não permanece estável, isto é, varia com o tempo, é fundamental *padronizar o melhor período para a coleta*.

Esta escolha depende do conhecimento da toxicocinética e da meia vida de eliminação ($t_{1/2}$)*, que habitualmente é o fator mais importante quando se determina o tempo de amostragem (Tabela 12).

Para uma exposição constante a baixos níveis com cinética de 1ª ordem**, a concentração de “*steady-state*”*** pode ser atingida dentro de 4 meias-vidas⁽⁴¹⁾, corroborando com o que recomenda a ACGIH^(8,9,10) de que o melhor período para a coleta seria em fim de exposição de jornada para a monitorização da exposição ao Co.

*tempo de meia-vida de eliminação é o espaço de tempo necessário para que a concentração total de um fármaco/agente químico no organismo ou no plasma diminua pela metade⁽⁹⁶⁾.

**cinética de 1ª ordem refere-se a um processo no qual a concentração de um fármaco/agente químico no organismo diminui logaritmicamente ao longo de tempo⁽⁹⁶⁾.

****steady-state* é o estado de equilíbrio no qual a taxa de administração é igual à taxa de eliminação da droga/agente químico⁽⁹⁶⁾.

TABELA- 12-IMPORTÂNCIA DA $t_{1/2}$ (MEIA-VIDA DE ELIMINAÇÃO) NO TEMPO DE COLETA⁽⁴¹⁾

$t_{1/2}$ de eliminação	Tempo de Coleta
< 2h	Muito crítico
2-5h	Crítico
5-48h	Fim da exposição
48h	Não crítica

- Misturas complexas: no caso de misturas complexas, é importante verificar se há exposição a algum tipo de mistura e que tipo de alteração ela provoca na toxicocinética do agente tóxico. Em estudos animais, a quantidade de Co excretada através da urina foi significativamente maior quando esses eram expostos a mistura de Co com carbeto de tungstênio⁽⁵⁷⁾, do que quando submetidos a uma quantidade equivalente de partículas de Co puro, confirmando o aumento da biodisponibilidade de Co quando combinado com o carbeto de tungstênio. Esse fato sugere que os níveis aceitáveis de exposição ao Co puro ou por uma combinação do Co com outras substâncias, deveriam ter valores diferentes.

4.7-Evolução dos métodos analíticos

4.7.1-Métodos de Análise de Co em Amostras de Urina e/ou Sangue

A baixa concentração de Co encontrada em materiais biológicos nos leva a crer que métodos utilizados no passado, tais como os colorimétricos, demonstraram não possuir sensibilidade e especificidade para quantificação de Co nestes materiais. A partir de 1977, existem relatos de metodologias mais sensíveis e específicas para dosagem de Co em urina e/ou sangue para fins de monitorização biológica da exposição ocupacional ao Co (Tabela 13):

TABELA 13-EVOLUÇÃO CRONOLÓGICA DE TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS PARA DOSAR Co EM SANGUE, URINA E MATERIAIS CERTIFICADOS A PARTIR DE 1977.

TÉCNICA ANALÍTICA	AUTOR	REFERÊNCIA	DATA
VIS	PEARSON et al	(73)	1977
NAA	VERSIECK et al	(94)	1978
QUIM	MARINO et al	(61)	1979
VIS	BASELT	(18)	1980
ET-AAS	BARFOOT et al	(17)	1980
ET-AAS	ANGERER et al	(11)	1982
VIS	EVANS	(32)	1983
CAT	ALEXIEV	(7)	1987
ET-AAS	KIMBERLY et al	(50)	1987
ICP-AES	XIAO-QUAN et al	(97)	1988
ET-AAS	SAMPSON	(77)	1988
ET-AAS	AJAYI et al	(4)	1992
CG-MS	AGGARWAL et al	(1)	1992
ICP-AES	LÓPEZ-ARTÍUEZ et al	(58)	1993
ET-AAS	YAN-ZHONG et al	(98)	1994
ICP-AES	GOMEZ et al	(36)	1995
ET-AAS	IVERSEN et al	(46)	1996

VIS-Espectrofotometria na região do visível; **QUIM**-Quimioluminescência; **CAT**-Catalítico; **NAA**- Análise por Ativação Neutrônica, – (*Neutron Activation Analysis*); **F-AAS**- Espectrofotometria de Absorção Atômica por chama (*Flame -Atomic Absorption Spectrometry*); **ET-AAS**- Espectrofotometria de Absorção Atômica por Método Eletrotérmico ou forno de grafite (*Electrothermal/ Graphite furnace -Atomic Absorption Spectrometry*) **ICP-AES**- Espectrofotometria de Emissão Atômica com Plasma Induzido - (*Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry*); **CG-MS**- Cromatografia a gás acoplado a Espectrômetro de Massa (GC-MS)

Obs: Estas siglas serão utilizadas em todo o texto a seguir.

O fundamento dos métodos encontrados com aplicabilidade no laboratório de análises toxicológicas para fins de monitorização biológica da exposição ocupacional estão descritos abaixo:

4.7.1.1-Métodos espectrofotométricos na região do visível ^(18,32,73)

A técnica consiste numa secagem e calcinação da amostra (urina) em mufla. O resíduo é tratado com um agente quelante e extraído com um solvente orgânico. O Co presente no extrato é complexado, resultando num produto colorido que pode ser medido num espectrofotômetro visível, pois obedece a Lei de Lambert-Beer.

4.7.1.2-Análise por Ativação Neutrônica- (NAA-Neutron Activation Analysis) ^(27,93,94)

Quando uma amostra é irradiada com nêutrons num reator nuclear, ocorrem reações entre esses nêutrons e os núcleos dos elementos da amostra. A reação consiste na absorção de um nêutron pelo átomo, levando o núcleo deste a um estado excitado*, seguido pela emissão de um fóton que o leva a um radionuclídeo ou nuclídeo estável no seu estado fundamental.

No método proposto por VERSIECK et al.⁽⁹⁴⁾, a irradiação da amostra (soro humano) é feita com um fluxo de $\sim 10^{14}$ nêutrons.cm⁻².s⁻¹ num reator por um tempo determinado de 12 dias e posterior medida direta, por um detector do pico γ do Co ⁶⁰. Os resultados obtidos são comparados com as áreas de pico de padrões conhecidos.

4.7.1.3-Espectrofotometria de absorção atômica por chama (F-AAS Flame Atomic Absorption Spectrometry) ^(47,76,80)

Lembrando o Modelo de Bohr para o átomo, este é constituído por um núcleo com prótons e nêutrons (núcleo central carregado positivamente), circundado por orbitais carregados

*a absorção de um neutron pelo núcleo produz um isótopo do elemento original, com um número de massa A+1 ao invés de A

negativamente (elétrons). No estado neutro ou fundamental, o átomo apresenta quantidades iguais de cargas negativas e positivas. Quando a amostra é submetida à chama, ocorre a atomização e a maioria dos átomos livres são levados ao estado fundamental mas, a chama não possui energia suficiente para excitar estes átomos (exceto os elementos alcalinos).

Os átomos originados na chama são submetidos a uma fonte de luz do mesmo elemento a ser analisado, com a função de excitar os átomos livres, neste caso, os elétrons que estão mais afastados do núcleo transferem-se para níveis energéticos superiores e o decréscimo (absorção) de energia é então medido. A AAS baseia-se na absorção desta radiação por átomos livres ⁽⁴⁷⁾.

Esta luz é dispersa num monocromador e é separada por uma fenda estreita. Um fotomultiplicador mede a intensidade de radiação e converte-a em sinal de absorvância. Esta é linear à concentração do elemento em questão e, através de uma curva de calibração, podem-se determinar concentrações conhecidas.

4.7.1.4-Espectrofotometria de absorção atômica eletrotérmica ou por forno de grafite (ET-AAS/GFAAS-*Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry / Graphite furnace Atomic Absorption Spectrometry*) ^(10,17, 44,46,47,50,77,80,91,98)

Segundo os dados disponíveis na literatura, a espectrofotometria de absorção atômica por forno de grafite (ET-AAS-*Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry*) é o método mais utilizado para determinação de Co em materiais biológicos.

O método de ET-AAS proposto por IVERSEN et al.⁽⁴⁶⁾ é parte do projeto de determinação de valores de referência para elementos no nível de traços em tecidos humanos da EURO-TERVIHT (*Trace Element Reference Values in Human Tissues*), cujo objetivo é estabelecer esses valores de elementos-traço para a população,

incluindo Co, para fins de estratégias de monitorização biológica. O método de ET-AAS, proposto por KIMBERLY et al.⁽⁵⁰⁾, foi o método de escolha para determinar a correlação concentração do ar no ambiente de trabalho *versus* concentração na urina para o Co em colaboração com o NIOSH⁽⁶⁹⁾ para trabalhadores expostos a Co na manufatura de ferramentas de carbeto de tungstênio.

Na metodologia por absorção atômica com forno de grafite, a atomização é obtida quando a amostra é introduzida num atomizador eletrotérmico. O tubo de grafite é um dos mais utilizados, mas alguns equipamentos também utilizam tubos com filamentos de tântalo ou carbono. O aquecimento do tubo é obtido através de uma resistência elétrica, programado a intervalos distintos de tempo e temperatura, permitindo evaporar o solvente da amostra, carbonizar a matéria orgânica, atomizar e limpar o tubo.

O gás de arraste, usualmente argônio, que passa dentro do tubo, é utilizado para deslocar os contaminantes que foram volatilizados do ambiente de leitura, além de prevenir a oxidação do tubo. Seu fluxo é interrompido durante a etapa de atomização para que os átomos de interesse liberados nesta fase possam ser quantificados. A interrupção da passagem de gás pelo tubo no momento da atomização, proporciona a estabilização da atmosfera dentro desse, evitando um resfriamento da nuvem atômica produzida e prevenindo a perda de átomos para fora do tubo.

As principais etapas de programação da amostra devem ser estabelecidas para o elemento em questão (Tabela 14, Figura 7). São elas:

SECAGEM: é escolhida de acordo com o solvente utilizado, podendo ser desmembrada em duas etapas para evitar perda de amostra. O fluxo de gás constante elimina os elementos volatilizados.

CALCINAÇÃO: os compostos orgânicos e inorgânicos presentes na amostra devem ser eliminados para torná-la menos complexa, sem que haja perda do analito. O fluxo de gás constante nesta etapa também

elimina os elementos volatilizados.

ATOMIZAÇÃO: é a etapa que produz o elemento no estado fundamental e na qual se processa a quantificação. A temperatura deve ser alta o suficiente para dissociar as espécies moleculares presentes, sendo também uma propriedade do elemento a ser analisado. Geralmente, o fabricante do equipamento fornece informações para o elemento em questão. Neste momento, o fluxo de gás de arraste é interrompido para que os átomos formados permaneçam no tubo e possam ser quantificados. A velocidade para atingir esta temperatura é um fator muito importante. Um feixe de luz de comprimento de onda específico para o elemento a ser analisado*, proveniente da lâmpada, passa no forno de grafite e é absorvido pelo elemento presente na amostra na forma atômica. A medida da quantidade de luz absorvida neste comprimento de onda, quando a mesma passa por uma nuvem de átomos do mesmo elemento da fonte de emissão, é proporcional à quantidade de átomos presente na amostra.

A relação entre a quantidade de luz absorvida e a concentração do analito presente na amostra pode ser obtida comparando a resposta do instrumento com soluções de concentrações conhecidas. Esta relação deve obedecer à Lei de Lambert-Beer, isto é, a quantidade de luz absorvida proporcional à concentração de átomos presente no atomizador.

*em geral 240,7 nm para o Co)

TABELA 14-ESQUEMA BÁSICO DE UM PROGRAMA DE TEMPERATURA UTILIZADO EM FORNO DE GRAFITE

ETAPAS	TEMPERATURA ($^{\circ}\text{C}$)	TEMPO (segundos)	ARGÔNIO
Secagem	90	10	sim
Secagem	120	13	sim
Calcinação	1200	31	sim
Atomização	2200	3	não
Atomização	2300	3	não
Limpeza	2400	3	sim

FIGURA 7-REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE UM PROGRAMA DE TEMPERATURA ($^{\circ}\text{C}$) VERSUS TEMPO (SEGUNDOS) PARA A TÉCNICA DE ET-AAS

A presença de interferentes nesta metodologia pode ser minimizada se forem utilizadas as condições de STPF (*Standard Temperature Plataform Furnace*), que incluem uma série de procedimentos instrumentais e analíticos com o objetivo de proporcionar maior eficácia nos resultados obtidos. Os componentes incluídos nas condições STPF são apresentados a seguir:

- tubos de grafite recobertos piroliticamente;
- aquecimento em condições máximas;
- interrupção da passagem de gás pelo tubo no momento da atomização;
- equipamento com eletrônica rápida com medida da área integrada do pico para quantificação;
- utilização de modificador químico para diminuir a temperatura de atomização do *analito* em estudo, permitir que eventuais interferentes que possuam temperaturas de atomização próximas possam ser melhor separados e aumentar a temperatura de calcinação, sem perder o analito. Isto é possível quando o modificador diminui a sua volatilidade, permitindo a remoção de interferentes antes da etapa da atomização e melhorando a sensibilidade analítica pelo aumento do sinal obtido.
- correção da absorção de fundo (*background*)

4.7.1.5-Método catalítico ⁽⁷⁾

Baseia-se na propriedade catalítica do Co (II) em algumas reações de óxido-redução. A oxidação do catecol pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma delas, sendo uma reação altamente sensível e seletiva que, em condições otimizadas, é proporcional à concentração de Co presente na amostra .

4.7.1.6-Espectrofotometria de emissão atômica com plasma induzido (ICP-AES *Induced Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry*) ^(20,36,58,97)

Nessa metodologia, a atomização da amostra é realizada pelo plasma *, que é produzido acoplando um fluxo de argônio em alto nível de energia (em geral: 1,5 Kw/ 27,12 MHz). Esta energia faz com que o argônio seja ionizado e várias espécies energéticas produzidas, tais como átomos e íons de argônio excitados, bem como elétrons. A fonte de plasma tem energia suficiente para produzir átomos excitados por vários mecanismos de fragmentação e excitação na amostra a ser analisada. Quando estes átomos são submetidos a uma fonte de luz que contém o elemento a ser determinado, emitem uma radiação característica, isto é, o espectro do elemento a ser analisado. Um monocromador faz a seleção espectral para posterior quantificação através da emissão atômica, baseada na radiação que é emitida quando o átomo é desativado a seu estado fundamental.

4.7.1.7-Cromatografia a gás acoplado a espectrometria de massa - (CG-MS) (GC-MS *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) ⁽¹⁾

A cromatografia gasosa é um processo físico-químico em que a amostra de interesse é vaporizada, passando através de uma coluna (fase estacionária) com um fluxo constante de um gás inerte, denominado de arraste (fase móvel), onde os componentes desta amostra são separados, detectados e registrados. Um espectrômetro de massa acoplado ao CG pode qualificar e/ou quantificar os componentes provenientes desta separação através da propriedade de detectar íons de espécies atômicas ou moleculares pelas relações

*plasma é uma nuvem de íons e elétrons altamente energizada ⁽⁹²⁾

massa/carga. A amostra nebulizada, quando introduzida no sistema gerador de íons produzidos pela colisão dos elétrons na amostra a ser analisada, é submetida a um campo eletrostático, onde esses íons apresentam uma curvatura de trajetória característica da relação massa/carga e, proporcional à concentração do elemento a ser analisado. Resumindo, o espectrômetro de massa é um dispositivo capaz de gerar, separar e detectar íons através do ângulo de trajetória quando submetidos a um campo magnético proporcional à relação massa/carga ⁽⁵⁶⁾.

4.7.1.8-Quimioluminescência⁽⁶¹⁾

A aplicação de uma solução quimioluminescente para análise de metais em nível de traços* é possível devido à simplicidade da instrumentação utilizada para quimioluminescência e à baixos limites de detecção encontrados para esses métodos. Os sistemas baseados em reagentes quimioluminescentes, tais como o luminol e a lucigenina, parecem ser os mais empregados. O ácido gálico e o pirogalol, por possuírem também tais propriedades, têm sido utilizados para a análise de metais em nível de traço. A quimioluminescência da lofina (2,4,5-trifenilimidazol) tem sido utilizada para a quantificação de Co(II), pois observou-se que concentrações de Co (II) em nível de traços aumentam a quimioluminescência de lofina em soluções básicas de peróxido de hidrogênio(H₂O₂). Na reação, a quantidade de luz produzida é diretamente proporcional à concentração de Co (II) presente na amostra. Assim, o cálculo da concentração é executado através de uma curva de calibração estabelecida, usando-se padrões com concentrações conhecidas.

*traços representam uma concentração na ordem de ppb (µg/L-massa/volume ou µg/Kg-massa/massa)

4.8-Estudo crítico dos atuais métodos propostos

A escolha da técnica analítica mais adequada para um elemento específico presente em nível de traço na amostra requer uma compreensão clara das características e limitações das diferentes técnicas disponíveis. A seguir algumas dessas condições serão discutidas.

4.8.1 Parâmetros a serem levados em consideração quando se seleciona uma técnica analítica

4.8.1.1 Padronização analítica

Os princípios gerais da padronização analítica de uma técnica baseiam-se nos ensaios para o estabelecimento dos seguintes parâmetros*: exatidão, precisão intra e inter-testes, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação, faixa de concentração analítica, linearidade, interferentes e estabilidade da substância na matriz.

Estes ensaios devem ser realizados, sempre que possível, na mesma matriz biológica a que se destinam, e os critérios de aceitação baseados na finalidade da análise e estudos estatísticos⁽²²⁾.

Comparando-se técnicas de análise de metais presentes em nível de traços, pode ser obtida rotineiramente, uma precisão avaliada através do CV (coeficiente de variação) de: ~0,5% para F-AAS, ~1,5% para ICP-AES e ~3-5% para ET-AAS⁽⁹³⁾.

A exatidão depende da qualidade dos padrões, da presença de interferentes e da extensão da contaminação. A ocorrência de interferência química, que foi a principal desvantagem no passado do ET-AAS, pode ser controlada atualmente pela técnica da plataforma, pelos modificadores de matriz e pelos corretores de absorção de fundo (*background*)⁽⁹³⁾.

*a definição desses parâmetros será descrita posteriormente nesse texto

4.8.1.2-Recursos para execução da análise

Quando da implantação de uma metodologia para uso de rotina num laboratório, é de fundamental importância a avaliação :

- dos recursos humanos , como a habilidade técnica requerida para o operador, o tempo total da análise e o grau de automação;
- dos recursos materiais, como os insumos e equipamentos, custo, disponibilidade no mercado, manutenção preventiva, corretiva e acessórios do equipamento e da própria metodologia;
- da área física e dos recursos de funcionamento, tais como a utilização de filtros na sala onde é realizada a manipulação da amostra e a análise em si. A contaminação ambiental é um aspecto relevante quando se trata de uma análise de elemento em nível de traços, como o caso do Co.

4.8.2- Estudo comparativo de limites de detecção para a determinação de Co⁽⁹³⁾

SLAVIN,W.⁽⁸³⁾ num estudo realizado em diferentes métodos para análise de metais, inclusive Co, encontrou limites de detecção descritos na Tabela 14.

TABELA 15-ESTUDO COMPARATIVO DE LIMITES DE DETECÇÃO PARA ANÁLISE DE Co POR ICP-MS,ET-AAS,F-AAS e ICP-AES

$\mu\text{g/L(ppb)}$	TECNICA
0,001	ICP MS
0,01	ET-AAS
1-10	F-AAS
1-10	ICP-AES

Fazendo uma comparação dos limites de detecção para

métodos de análise de Co em alguns materiais biológicos (Tabela 16) com relação aos dados encontrados por SLAVIN, W.⁽⁸³⁾ (Tabela 15), podemos observar que estão em plena concordância, com exceção do ET-AAS⁽⁵⁰⁾ e ET-AAS⁽¹⁷⁾, cujos limites de detecção podem ser observados na Tabela 15 e estariam acima do esperado para estes métodos de maneira geral.

TABELA 16- COMPARAÇÃO DOS MÉTODOS ESTUDADOS PARA ANÁLISE DE CO COM RELAÇÃO AO MATERIAL UTILIZADO E LIMITE DE DETECÇÃO

MÉTODO	REFERÊNCIA	MATERIAL	LIMITE DE DETECÇÃO (µg/L)
CG-MS	(1)	Urina/ material certificado (NIST)	1,09 ¹
ICP-AES	(58)	Urina	<10,0
ICP-AES	(97)	Material certificado (NBS)	2,4
ICP-AES	(36)	Material certificado	0,9
ET-AAS	(50)	Urina	2,4
ET-AAS	(77)	Plasma/urina	0,15
ET-AAS	(4)	Seronorm/Lanonorm ²	ND
ET-AAS	(46)	Urina Seronorm Material certificado	0,18
ET-AAS	(11)	Urina	0,1
ET-AAS	(17)	Sangue total/Soro	1,0
ET-AAS	(98)	Padrão aquoso	ND
QUIM	(61)	Padrão aquoso	0,1
CAT	(7)	Urina	0,03
VIS	(18)	Urina	5,0 ¹
VIS	(73)	Padrão Aquoso	ND
VIS	(32)	Padrão Aquoso	ND
NAA	(94)	Soro	ND

¹Limite de quantificação determinado; ²Seronorm e Lanonorm são soros e urinas padrões respectivamente; ND- Valores não determinados para estes métodos

Observando a Tabela 15, podemos concluir que o F-AAS e o ICP-AES têm limites de detecção similares. Tais limites encontrados em técnicas de ET-AAS são menores e esta técnica requer menor volume de amostra. Dessa forma, demonstra ser a mais apropriada

quando se deseja determinar baixas concentrações em pequenos volumes de amostra.

4.8.3-Análise comparativa dos métodos de F-AAS, ET-AAS e ICP-AES^(91,92)

Na Tabela 17 faz-se um estudo comparativo para F-AAS, ET-AAS e ICP-AES no que diz respeito à habilidade, ao custo para operar o equipamento, aos interferentes e às limitações.

TABELA 17- COMPARAÇÃO ENTRE F-AAS, ET-AAS E ICP-AES PAR ANÁLISE DE Co

CARACTERÍSTICAS	MÉTODOS		
	FAAS	ET-AAS	ICP-AES
Limite de detecção (metal nível de traços)	1-10 µg/L	0,1µg/L	1-10 µg/L (geralmente tem LOD mais baixo que o F-AAS)
Precisão analítica	0.1-1 %	0,5-5%	0,3-2%
Tempo total de análise	Rápido (melhor para análise unieleментарar)	Lento (em média 4 minutos)	Rápido (melhor para análise multieleментарar)
Custo de operação	Baixo	Relativamente alto	Alto
Habilidade e treinamento do operador	Pouca	Muita	Muita
Interferências			
Espectrais	Nenhuma	Poucas	Muitas (podem ser resolvidas com monocromador de alta resolução)
Químicas	Algumas	Muitas (Interferências da matriz podem ser corrigidas com <i>corretor de background</i> e modificador de matriz)	Nenhuma
Limitações	Elementos refratários à temperatura da chama não podem ser determinados	Possibilidade de contaminação ambiental	-

4.9-Fatores que influem no método analítico para determinação de Co

4.9.1- Amostragem e armazenamento

Este item inclui a coleta, o transporte e o armazenamento da amostra.

A contaminação das amostras é uma das maiores causas de erros nas análises, principalmente para elementos encontrados em nível de traços como o Co. A contaminação pode ocorrer devido a:

4.9.1.1- Coleta

- agulha de aço: pode ser a causa de contaminação de amostras de sangue pelo Co; se necessário deve ser substituída por agulha de platina ou cânula de polietileno⁽³⁾;
- anticoagulante: pode conter traços de Co e alterar os resultados, portanto o anticoagulante utilizado para a coleta de sangue total deve ser isento de Co;
- frascos de coleta: os frascos de coleta devem estar limpos e livres de traços de metais; o laboratório deve fornecer frascos com estas características;
- descontaminação: a contaminação da pele com metais pode ser uma causa de resultados alterados, portanto a descontaminação da pele no momento da colheita e/ou coleta da amostra deve ser realizada.

4.9.1.2- Armazenamento das amostras

- precipitação ⁽²⁹⁾: as amostras de urina tendem a apresentar precipitado como consequência do abaixamento de pH e solubilidade alterada dos compostos nesta dissolvidos. Como o Co nestas situações, pode precipitar com os outros constituintes, a urina

armazenada deve ser homogeneizada adequadamente antes da análise. Em contrapartida, foi relatado por CORNELIS et al.⁽²⁴⁾ presença de arsênio, cobre, antimônio, cromo, mercúrio, selênio e zinco no precipitado de urinas acidificadas após dois dias de armazenamento, enquanto que Co, manganês, cério e rubídio permaneceram em solução;

- adsorção ⁽²⁹⁾ :a adsorção, que é um efeito dependente do tipo de frasco em que é realizada a coleta, é problemática na análise de Co em nível de traços. Geralmente, a acidificação da amostra impede este efeito.

4.9.2- Preparação da amostra⁽⁹³⁾

A preparação da amostra é uma etapa que precede a análise propriamente dita, pode ser uma desproteinização, extração, mudança de pH, etc. De acordo com o método que se pretende utilizar, a preparação da amostra, pode ser um recurso necessário quando:

- a sensibilidade dos procedimentos diretos é inadequada;
- é desejável evitar efeitos da matriz;
- o analito em estudo está ligado a uma proteína.

Na eventual necessidade da utilização de métodos de preparação de amostra, deve ser considerado que:

- são às vezes operações laboriosas;
- os reagentes devem ser de alta pureza;
- os técnicos devem ser altamente qualificados;
- existe um alto risco de contaminação.

Por sua vez, a preparação da amostra depende também :

- do analito;
- da matriz biológica no qual o analito está incorporado;
- da concentração esperada do analito na amostra;

- da técnica a ser utilizada;
- da qualidade e versatilidade dos instrumentos analíticos;
- da finalidade da análise;
- de outros fatores como: volume da amostra, tempo de análise que se necessita, custo e disponibilidade da técnica escolhida.

As Tabelas 18 e 19 apresentam uma comparação do preparo da amostra em diferentes métodos utilizados para análise de Co em material biológico.

TABELA.18- PREPARO DA AMOSTRA PARA DETERMINAÇÃO DE Co POR NAA, VIS, CAT E QUIM

MÉTODO	REFERÊNCIA	PREPARO DA AMOSTRA
NAA	(94)	Irradiação da amostra Leitura em contador (^{60}Co)
VIS	(18)	Calcinação Quelação(DDC)* Extração com solvente orgânico Complexação(sal R-nitroso)
VIS	(73)	Complexação com p-nitrofenilhidrazona da diacetilmonoxima e etilenodiamina Extração com éter
VIS	(32)	Complexação com o-fenantrolina
CAT	(7)	Oxidação do catecol pelo peróxido de hidrogênio
QUIM	(61)	Lofina

*DDC-Dietilditiocarbamato

TABELA 19-PREPARO DA AMOSTRA PARA ET-AAS,ICP-AES E CG-MS

MÉTODO	REFERÊNCIA	PREPARO DA AMOSTRA
ET-AAS	(46)	Modificador de Matriz:HNO ₃ Correção de “absorção de fundo”:Zeeman
ET-AAS	(17)	Digestão e extração (sangue)
ET-AAS	(98)	Modificador matriz: Pd ¹ Correção de “absorção de fundo”: lâmpada de deutério
ET-AAS	(50)	Modificador de matriz: HNO ₃ + Mg (NO ₃) ₂
ET-AAS	(4)	Modificador de matriz: HNO ₃ Correção de “absorção de fundo”: lâmpada de deutério
ET-AAS	(77)	Modificador matriz: Pd ¹ Correção de “absorção de fundo”: lâmpada de deutério
ICP-AES	(58)	Complexação:APDC ² Extração:MIBK
ICP-AES	(36)	Extração:MIBK/DPTH ³
ICP-AES	(56)	Complexação:APDC ²
CG-MS	(1)	Complexação:Li(FDEDTC) ⁴

¹Pd=Paládio; ²APDC= pirrolidinoditiocarbamato de amônio;

³MIBK/DPTH=metilisobutilcetona/1,5-bis(2-dipiridilmetileno) tiocarbonohidrazida;

⁴Li(FDEDTC)=bis(trifluoroetil) ditiocarbamato de Lítio

4.9.3- Método

4.9.3.1- Efeitos devido à absorção de fundo (*background*) e características da matriz

- absorção de fundo, ocasionada pela viscosidade, pelo alto conteúdo de sais e pela presença de material orgânico;
- inclinação da curva de calibração na ausência e na presença da matriz

As Figuras 8 e 9 representam situações hipotéticas de curvas padrões em meio aquoso e nas matrizes de trabalho. As curvas padrões realizadas em meio aquoso estão em tracejado azul intenso e as linhas mais finas (azul e vermelha) em diferentes matrizes. Teoricamente, podemos concluir que as retas paralelas da figura 8 revelam que não ocorreu interferência da absorção de fundo da matriz, fato que não ocorre na Figura 9, que demonstra uma situação hipotética de efeito da matriz. Este fato revela a importância da padronização analítica na mesma matriz em que será dosado o analito.

FIGURA 8 – CURVA DE CALIBRAÇÃO SEM EFEITO DA MATRIZ: CURVAS PARALELAS

FIGURA 9 - CURVA DE CALIBRAÇÃO COM EFEITO DA MATRIZ

A extensão do efeito da matriz depende de muitos fatores como: analito, matriz, tipo de atomização (no caso de AAS, se for por chama ou eletrotérmico), versatilidade do equipamento utilizado e pré-tratamento da amostra.

4.9.3.2-Alteração na linha de base da calibração⁽⁹¹⁾

A alteração da curva de calibração no curso da análise é típica na técnica de AAS. Estes efeitos adversos são devidos a vários fatores, muitas vezes incontroláveis, tais como:

- aquecimento dos circuitos eletrônicos e das fontes de luz;
- modificação do comprimento de onda estabelecido durante o aquecimento;
- modificações graduais no tubo de grafite devido à deterioração da camada de grafite que o reveste, proveniente de ataque ácido ou abrasão mecânica.

Todas estas alterações na linha de base podem ser acompanhadas ao longo das análises, alternando leitura de amostra e pontos da curva de calibração. Pode-se utilizar também um controle de qualidade adequado, inserido numa gestão de qualidade total. Parâmetros instrumentais com otimização imprópria, calibração inadequada e linearidade limitada também são fatores que devem ser considerados quando são analisados os fatores que influem no método analítico.

4.10- Garantia da qualidade e sistema de qualidade

Define-se Garantia da Qualidade (*Quality Assurance-QA*) como toda ação sistemática necessária para prover de adequada confiança um serviço ou um produto, de maneira a satisfazer a sua finalidade. Visa a reduzir os erros a limites toleráveis e engloba o controle de qualidade no que se refere aos procedimentos executados no laboratório para garantir o controle do sistema de medidas⁽¹³⁾.

4.10.1- Introdução de um Sistema de Qualidade

Quando da implantação de um Sistema da Qualidade, os seus objetivos devem estar bem delineados sendo que, de maneira geral, estão relacionados com:

- prioridade ao cliente;
- integração das atividades da organização;
- controle dos fornecedores;
- manutenção preventiva de equipamentos;
- eficácia das ações corretivas e preventivas para toda organização;
- controle contínuo dos processos;
- realização de auditorias periódicas;
- estímulo a melhorias contínuas.

Segundo MENDES, M.E.⁽⁶³⁾, o processo de implantação de um Sistema de Qualidade baseado na Norma NBR-ISO 9002/Dez.94⁽¹⁵⁾ é viável mesmo em laboratórios clínicos públicos. Esta possibilidade de uniformizar condutas baseado num sistema de qualidade pode ser estendida aos laboratórios de análises toxicológicas.

A Organização Internacional para Normatização (ISO: *International Standard Organization*) estabelece normas de gestão de qualidade internacionalmente. No Brasil, foram adotadas pela ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas) e publicadas a partir de 1990 com a designação de normas brasileiras da série ISO 9000. Estas normas representam padrões inespecíficos para quaisquer produtos/serviços. Daí o caráter prescritivo, isto é, não determinam como o processo de gestão de qualidade deva ocorrer, mas preconizam que haja a definição de padrões de qualidade, documentação dos processos, além da consciência da padronização e registros de modo sistemático⁽¹³⁾.

A Norma NBR-ISO 9002/Dez.94⁽¹⁵⁾ é de caráter contratual e a ISO 8402⁽¹³⁾ é empregada como Norma de referência para

interpretação de requisitos em normas contratuais da série ISO.

A certificação é um programa voluntário e adaptável tanto para a indústria como para a área de serviços, enquadrando-se os serviços de análises clínicas e toxicológicas. Para o laboratório tornar-se um organismo certificado, deve ser submetido à auditoria de um organismo externo independente, que verificará o cumprimento dos requisitos contidos na Norma escolhida. Em nível nacional, o INMETRO é o organismo articulador e credenciador das instituições que são órgãos certificadores. A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) vem atuando desde os anos 50 na área de certificação e desenvolvimento de diferentes sistemas de certificação para a qualidade. Tanto para a indústria como para o mercado laboratorial privado, este tipo de reconhecimento tornou-se uma estratégia para obter vantagem competitiva.

4.10.2- Implantação de um Sistema de Qualidade ISO 9002 em laboratórios de análises toxicológicas

Tomando como modelo a implantação e certificação de um laboratório de análises clínicas de caráter público, a implementação da qualidade deve ser efetivada de modo a atender os seguintes itens^{*(63)}:

- Responsabilidade da Administração (4.1): diz respeito a toda estrutura organizacional, atribuições e responsabilidades, seja nas tarefas técnico-administrativas, seja na gestão da qualidade. Análises críticas periódicas devem ser realizadas e divulgadas a todos os funcionários pelo principal executivo, bem como as metas da organização;

*A NBR ISO 9002/Dez94 faz referência a itens que vão de 4.1 a 4.20 e o texto segue esta denominação original para os itens. O item 4.4, que é relativo a controle de projeto, não consta no texto por não se aplicar a um laboratório de prestação de serviços.

- Sistema da Qualidade (4.2): é relativo à estrutura documental do sistema, seus manuais e registros para a qualidade. O Planejamento para a Qualidade está descrito neste item;
- Análise Crítica do Contrato (4.3): o contrato é o pedido da análise, que deve ter um prazo definido para a entrega do resultado ao cliente, assim como alterações nestes prazos por impossibilidade de realizar a análise;
- Controle de Documentos e Dados (4.5) e Registros da Qualidade (4.16): todos os documentos da qualidade devem estar listados, além da data em que foram elaborados e indicação da revisão em se encontram. Por ocasião de uma alteração, esta também deve estar documentada, assim como o seu elaborador e aprovador. Todos os registros da qualidade devem ter definidos o modo de organização, o local e o prazo de retenção;
- Aquisição (4.6): diz respeito aos dados para aquisição de um material de consumo que devem estar uniformizados, bem como à existência de uma lista dos fornecedores qualificados para garantir a qualidade nos processos;
- Controle do Produto Fornecido pelo Cliente (4.7) e Controle do Processo (4.9): todos os processos devem estar descritos de maneira uniforme, desde a entrada do material biológico até a saída do laudo final, dizem respeito aos Procedimentos Operacionais Padrão (POP). Deve haver referência e registros de manutenções corretivas, preventivas e interação com meio ambiente de modo a preservar a saúde do técnico e garantir medidas de preservação ao ambiente. Neste item fica englobado e definido todo o controle de qualidade das análises que o laboratório realiza;
- Rastreabilidade (4.8): é a capacidade de recuperação do histórico, da aplicação ou da localização de um elemento (produto ou processo) por meio de identificações registradas. Quando se refere à linguagem de laboratório, a rastreabilidade de um produto (material biológico, adquirido e laudo) diz respeito à sua origem, o

histórico da análise, a distribuição e localização pelas diversas etapas do processo da análise até a entrega ao cliente;

- Inspeção e Ensaio (4.10) e Situação de Inspeção e Ensaio (4.12): todos os materiais biológicos e insumos devem ser submetidos a uma inspeção, seja na entrada, durante a realização da análise, ou mesmo na entrega do resultado final;
- Controle de Produto não conforme (4.13): todos os materiais biológicos, insumos e resultados que possam levar o cliente a receber um resultado inadequado devem ser prevenidos e controlados. Estas ocorrências devem ser submetidas a uma análise crítica de modo a gerar ações corretivas;
- Ações corretivas e preventivas (4.14): são ações implementadas para eliminar as causas de não-conformidades numa situação indesejável, a fim de prevenir sua repetição. Podem envolver alterações em procedimentos em qualquer fase do ciclo da qualidade, ou até um treinamento;
- Manuseio, armazenamento, embalagem, preservação e entrega (4.15): diz respeito ao armazenamento em temperatura e locais adequados, tanto dos materiais biológicos como dos insumos, bem como à preservação do resultado final de modo a prevenir análises alteradas durante o processo;
- Auditorias Internas (4.17): devem ser realizadas de modo abrangente afim de avaliar a eficácia do sistema;
- Treinamento (4.18): deve abranger todos os funcionários do laboratório, seja em funções técnicas seja administrativas. Envolve tanto os treinamentos previstos em planejamento como alguns não previstos, isto é, aqueles acionados por ocasião de uma não conformidade, relacionada com falha no treinamento;
- Serviços Associados (4.19): são informações técnicas com relação ao tipo e à coleta de material, além do auxílio na interpretação dos resultados prestados ao cliente;

- Técnicas Estatísticas (4.20): são muito abrangentes, pois englobam um grande número de processos. Pode ser utilizada para o controle de qualidade, para a validação de um método e para o levantamento de indicadores no acompanhamento da evolução do sistema da qualidade.

4.10.3- Norma ABNT ISO/IEC Guia 25:1993

ABNT ISO/IEC GUIA 25:1993 ⁽¹⁴⁾ embora possa também ser adotado por laboratórios de análises toxicológicas na implantação de um sistema de qualidade, foi elaborada com objetivo de fornecer um modelo de sistema de qualidade para credenciar laboratórios de calibração e ensaios e a NBR-ISO 9002⁽¹⁵⁾ como modelo para garantia da qualidade em produção e instalação em serviços.

A ABNT ISO/IEC GUIA 25:1993⁽¹⁴⁾ em suas recomendações faz referência a*:

- Organização e gerenciamento;
- Sistema de Qualidade, auditoria e análise crítica;
- Pessoal (treinamento) ;
- Acomodações e ambiente;
- Equipamentos e material de referência;
- Rastreabilidade de medição e calibração;
- Calibração e métodos de ensaio;
- Manuseio de itens de calibração e de ensaios;
- Registros, certificados e relatórios;
- Subcontratados de calibração ou ensaio;
- Serviços de apoio e fornecimentos externos;
- Reclamação de cliente.

* estes são as denominações utilizadas na íntegra pela ABNT ISO/IEC GUIA 25:1993 ⁽¹⁴⁾

Esta proposta uma vez adotada, deve ser revista e adaptada de acordo com a realidade de cada laboratório. Como a utilização e aplicação de sistemas de qualidade em organizações de saúde, é um fato recente, se comparado com outros tipos de serviços, deve sofrer adaptações que melhor se enquadrem, mesmo porque estas Normas propõem-se apenas a ser um modelo a ser seguido.

4.10.4- Programas de gestão de qualidade num laboratório de análises toxicológicas, planejamento e ciclo da qualidade

O programa de gestão de qualidade de maneira geral, se utiliza de um sistema de qualidade. A Norma ISO 9002/Dez 94 prevê um planejamento para a qualidade. Dentro deste planejamento está incluída a aprovação de novos processos portanto, plenamente aplicável aos objetivos deste trabalho de encontrar uma metodologia adequada para dosar Co em sangue e/ou urina, um indicador biológico na monitorização biológica da exposição ocupacional ao Co

4.10.5- Ciclo da qualidade

O ciclo da qualidade (Figura 10) são os passos para a seleção de um método, dele fazem parte 3 etapas principais:

- a) Delineamento experimental;
- b) Validação analítica;
- c) Controle de qualidade

4.10.5.1- Etapas do ciclo da qualidade

A) Delineamento experimental

Envolve a pesquisa bibliográfica, os recursos necessários tais como insumos (aquisição de material adequado, ou seja, fornecimento externo) e os equipamentos. Nesta etapa estão incluídos os dados físico-químicos e toxicocinéticos da substância em questão, definidos o tipo de amostra, o tempo de coleta, o intervalo de concentração e o estabelecimento do número de calibradores.

B) Padronização analítica

É a validação propriamente dita, esta é avaliada através de testes de precisão, exatidão, recuperação, linearidade, especificidade, limites de quantificação e detecção, estabilidade da amostra e o estudo dos interferentes. Concluída e aprovada é feita a elaboração do procedimento operacional padrão (POP).

Para a validação de métodos, é de fundamental importância o conhecimento das definições apropriadas descritas a seguir:

PRECISÃO: concordância entre replicatas, isto é, variação dos resultados quando análises repetidas são feitas na mesma amostra. Inclui testes de repetibilidade (medida da variabilidade, analisando-se várias vezes uma mesma amostra dentro da mesma corrida analítica) e reprodutibilidade (medida de uma mesma amostra em corridas analíticas diferentes: em dias diferentes e/ou por dois ou mais laboratórios diferentes). Os parâmetros matemáticos utilizados são a média, o desvio padrão e o coeficiente de variação(CV). Valores elevados de CV refletem baixa precisão;

FIGURA 10-FLUXOGRAMA DO CICLO DA QUALIDADE

EXATIDÃO (*accuracy*): concordância entre o valor estimado e o valor real da substância na amostra pelo processo analítico. A baixa exatidão é proveniente de erros sistemáticos que contribuem para desvios ou tendências (*bias*) nos resultados. O ideal é que sejam usados controles de referência certificados, ou seja, aqueles que reflitam os valores reais. É importante que esses controles contenham a substância a ser analisada em matriz natural, isto é, presente no mesmo meio reproduzindo a situação “*in vivo*”. Assim, produtos de biotransformação, formas conjugadas do toxicante, interferentes, etc, todos estariam presentes no controle. A tendência será dada pela tendência sistemática entre o valor real e o valor obtido. Dessa forma uma exatidão de 102% indica tendência positiva de 2%, enquanto que a exatidão de 98% mostra uma tendência negativa de 2%. O erro sistemático ocorre em geral por uma das seguintes causas:

- perda de substância devido à baixa recuperação de extração;
- soluções-padrão inadequadas;
- medidas volumétricas imprecisas;
- aferição inadequada de balanças, acarretando erro nas pesagens;
- equipamentos impropriamente calibrados;
- reagentes contaminados ou presença de substâncias interferentes na amostra.

- Um sistema de qualidade prevê controle de todos os itens citados anteriormente, portanto um erro sistemático é totalmente rastreável e detectável.

Para a verificação da precisão e exatidão intra-teste deve-se considerar resultados de 5 amostras ($n=5$). Os valores de exatidão e precisão são preconizados para o método em estudo.

RECUPERAÇÃO: habilidade do método analítico de analisar corretamente uma quantidade adicionada à matriz biológica do analito em questão. Está relacionada à exatidão. As concentrações deverão ser correspondentes, respectivamente, aos controles baixos e altos, com cinco amostras para cada controle. A recuperação será calculada

pela comparação da concentração média obtida por interpolação com a concentração teórica;

ESPECIFICIDADE: capacidade do método de quantificar somente aquele analito que se quer determinar, isto é, distinguir o analito dos demais componentes, endógenos ou exógenos, encontrados na mesma matriz;

LIMITE DE DETECÇÃO (LOD): é definido como a menor concentração de um analito que o processo pode discriminar, de forma segura, contra a interferência da radiação de fundo da matriz, isto é, diferenciar do valor zero com determinada confiabilidade;

LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ): é definido como a menor concentração do analito que pode ser medida com exatidão aceitável. Em geral, é três ou quatro vezes maior que o limite de detecção e deve estar incluído na curva de calibração;

FAIXA DE LINEARIDADE: é uma faixa de concentração dentro da qual a quantificação é uma função linear da concentração. Preconiza-se que a faixa de concentração dos calibradores vá desde o LOQ estimado até três ordens de magnitude desse valor. Por exemplo, com um LOQ de 1 ng/mL seria de 1 a 1000 ng/mL). O parâmetro matemático mais utilizado é a análise de regressão e a mais usual é a dos mínimos quadrados, em que a variável independente se refere à concentração teórica da substância em questão, presente na matriz. A curva de calibração deve apresentar o seguinte tratamento estatístico:

- intersecção;
- equação da regressão ao linear;
- coeficiente de correlação;
- concentração estimada dos calibradores;
- desvio padrão de cada calibrador;
- desvio padrão relativo (coeficiente de variação para cada ponto).

Para definir a curva, são necessários no mínimo quatro pontos de calibração.

ESTABILIDADE: deverá ser verificada para a substância em cada matriz, numa concentração média do controle, tanto à temperatura ambiente como após ciclos de congelamento e descongelamento. Os tempos são fixados de acordo com a finalidade da análise e da sistemática do laboratório. Compara-se cada concentração com a média do tempo zero. Se a concentração média estimada estiver ao redor de 10% da precedente, a substância será considerada estável para aquele período⁽²²⁾.

C) Controle de qualidade

O controle de qualidade é acompanhado através de regras, isto é, os limites de aceitação dos resultados obtidos.

Se necessário, poderão ocorrer ações corretivas derivadas de uma análise crítica dos resultados obtidos em qualquer etapa, levando ao replanejamento de alguma dessas, assim incorporando-se novamente ao ciclo da qualidade (Figura 10).

Todas as etapas devem ter registros descrevendo todas as fases do ciclo da qualidade.

Com todas as etapas planejadas e documentadas, tem-se uniformidade de condutas relativas ao processo organizacional que auxiliam na escolha de uma nova técnica com segurança e qualidade analítica dentro de um ciclo de qualidade (Figura 10).

4.10.6- Controle de qualidade/ Gestão de qualidade^(22,39)

Após caracterização do método analítico a validação é de responsabilidade do laboratório, assim como monitorizar e estimar continuamente a variabilidade do método analítico por meio do controle de qualidade. O controle de qualidade é um dos quesitos dentro da gestão de qualidade total. A seguir serão mencionados os recursos utilizados para a monitorização do controle de qualidade.

4.10.6.1- Materiais utilizados no controle de qualidade

- Padrão : solução que contém uma quantidade conhecida do analito e é usada para calibração;.
- Controles: são padrões usados para controlar a precisão e exatidão do método já validado analiticamente;
- Padrões de referência e materiais certificados: são materiais cujas características são determinadas de modo a serem utilizados para calibrar um instrumento, verificar o método e controlar a análise de outras amostras. Os materiais certificados são aqueles que foram determinados por métodos aceitos oficialmente como mais exatos e precisos. Atualmente as duas mais importantes fontes de materiais de referência são:

a) Agências Internacionais:

National Institute of Standard and Technology (NIST);

Community Bureau of Reference (BCR);

European Economic Communities (EEC);

International Atomic Energy Agency (IAEA)

b) Industrias Privadas:

BIORAD;

KAULSON;

Nycomed;

Reference Material;

Utak.

4.10.6.2- Procedimentos estatísticos

A contínua verificação estatística de um método demonstra sua eficácia. O controle estatístico isoladamente não indica que o método utilizado esteja necessariamente otimizado, mas sim estabilizado. Incluem-se as determinações da:

- a) média;
- b) variância, desvio padrão(SD) e coeficiente de variação(CV);
- c) gráfico de Levey-Jennings⁽³⁹⁾ : um dos métodos mais antigos para monitorizar valores de controle é o gráfico de Levey-Jennings que abrange geralmente os valores da média mais dois desvios padrões e pode ser usado como critério de aceitabilidade quando os valores de controle estiverem dentro desta faixa. Permite que se determine a precisão e o grau de dispersão dos resultados, detectando qualquer alteração abrupta.

A alternativa mais comum para avaliar os resultados obtidos através do controle de qualidade é um sistema de regras, que se utiliza de um gráfico denominado de Levey-Jennings. Se um valor de controle transgride esta regra excedendo os seus limites, um erro pode ser detectado e o resultado da análise rejeitado. Estas regras são baseadas nos mesmos intervalos de confiança do gráfico de Levey-Jennings. A mais comumente aplicada em laboratórios. São elas:

- 1) regra 1-2S:** o resultado do controle excedeu a média por mais que 2 SD, mas menos que 3SD, para cima ou para baixo;
- 2) regra 1-3S:** um controle excedeu a média por mais que 3SD em qualquer sentido, inferior ou superior;
- 3) regra 2-2S:** dois resultados do controle excederam a média por mais que 2SD e menos que 3SD consecutivamente e no mesmo sentido;
- 4) regra R-4S:** a diferença entre 2 controles consecutivos é maior que 4SD. Estas duas medidas consecutivas têm valores, se em sentidos opostos;
- 5) regra 4-1S:** quatro valores de controle consecutivos excedem a média por mais que 1SD. Estes quatro resultados devem ser consecutivos e estarem ou acima ou abaixo da média;
- 6) 10X-** dez valores de controle consecutivos excedem a média na mesmo sentido.

Como pode ser observado, são propostos procedimentos básicos para a validação da metodologia selecionada, por meio de protocolo bem definido que admite variações relativas à prioridade a ser dada aos diversos parâmetros estudados, em função do propósito para o qual o dado analítico será utilizado.

Dentro de um sistema de qualidade, os registros das análises, calibrações e estudos específicos devem conter informações suficientes para permitir repetição se necessário.

4.10.7- Vantagens na implantação de um sistema de qualidade

A implantação de um sistema de qualidade para qualquer laboratório de análises apresenta inúmeras vantagens, entre elas podemos citar:

- organização do laboratório;
- qualificação do funcionário para exercer funções determinadas;
- controle sobre todas as etapas dos processos;
- diminuição do desperdício através do controle sobre os insumos adquiridos, da manutenção preventiva sobre os equipamentos e de treinamento específico;
- capacidade de identificar problemas e atuar com ações corretivas ou preventivas;
- planejamento estratégico que permite um gerenciamento adequado;
- competitividade dentro do mercado laboratorial.

5- DISCUSSÃO

As corporações multinacionais têm uma grande responsabilidade de assegurar a saúde de seus trabalhadores em países em desenvolvimento. Seus investimentos anuais nos últimos 7 anos têm triplicado em países da Ásia e América Latina, ao contrário do que ocorreu na década passada, quando o crescimento dos negócios dessas indústrias estava mais voltado para os EUA e Japão⁽⁵¹⁾. As causas mais evidentes para esta mudança são o baixo custo da mão-de-obra e o investimento despedido para a instalação de novas unidades em países de terceiro mundo.

Esta multinacionais instalam suas novas unidades na Ásia e América Latina, utilizando a política de saúde ocupacional e meio ambiente desses países que, na maioria das vezes, não têm uma estrutura adequada para tratar de tal assunto, visto a ausência de leis rígidas para tratar dessa problemática ser praticamente uma constante nesses países. O Fórum da Organização Mundial de Saúde⁽³⁵⁾ ocorrido em 1998, que tinha por missão discutir a efetividade de programas de saúde ocupacional no mundo, concluiu que :

- apenas uma pequena porcentagem de trabalhadores nos países em desenvolvimento estão cobertos por programas sociais, que nem sempre realizam uma prática efetiva de programas de saúde ocupacional;
- em países desenvolvidos, 50% dos trabalhadores têm acesso a programas de saúde ocupacional e, em países em desenvolvimento, este número está em torno de 10%;
- a utilização de substâncias tóxicas está aumentando nos países em desenvolvimento e diminuindo nos países desenvolvidos;
- não há dúvidas de que o número de acidentes relatados representa apenas uma pequena porcentagem do número real;
- há necessidade de padronizar as notificações e critérios de diagnóstico de doenças ocupacionais, para melhorar os resultados estatísticos

obtidos em estudos epidemiológicos ;

- na maioria das vezes o papel do higienista ocupacional é ocupado por profissionais sem qualificação adequada;
- os programas de saúde ocupacional devem contar com a colaboração de equipes compostas por diferentes profissionais habilitados;
- muitas vezes estes programas falham mais por impossibilidade de aplicar os conhecimentos do que pela ausência deles.

A utilização do Co não foge a esta regra de acordo com o tipo de indústria que tem sido instalado neste país. Segundo a ACGIH^(8,9,10), quando substâncias não-listadas são introduzidas nos locais de trabalho, deve-se revisar a literatura médica e científica para identificar os efeitos potencialmente tóxicos ou perigosos. Os Comitês da ACGIH^(8,9,10), responsáveis pelas recomendações e propostas de TLV-TWA (*Threshold Limit Value*) e BEI (*Biological Exposure Indice*) para exposição a agentes químicos, encoraja fortemente os higienistas industriais e outros profissionais de saúde ocupacional a enviar para o mesmo, qualquer informação que possa sugerir o estabelecimento de limites de exposição. Esta informação deve incluir concentrações do agente químico no ar do ambiente de trabalho e sua correlação com alterações biológicas precoces (relação dose-efeito e dose-resposta) que possam vir a dar suporte a uma recomendação de TLV ou BEI.

O estabelecimento de valores de referência para a população não-exposta também tem sua importância pelo fato do Co ser um elemento essencial como componente da vitamina B12, cujas funções são entre outras⁽⁹⁰⁾:

- utilização apropriada do Fe para a formação de hemoglobina;
- síntese de DNA e metabolismo do propionato;
- mediação de reações que envolvem o metabolismo de carbono simples, tais como reações de transmetilação.

Assim, a existência de duas zonas de exposição para o Co, a ausência ou excesso, levando a uma quebra da homeostase no homem, deve ser bem estudada e identificada. Com relação aos efeitos

tóxicos descritos neste trabalho, vale ressaltar que os pulmonares são os mais estudados. Os efeitos no nível do parênquima pulmonar são dependentes da presença de carbeto de tungstênio associado ao Co metálico como ligante.

Os efeitos asmáticos e dérmicos parecem ser causados pelo Co propriamente dito, quer seja na forma de sais, óxidos ou metais, devido a uma resposta alérgica. Apesar da existência de boa correlação $[Co]_{ar\ ambiente} \text{ versus } [Co]_{urina\ e/ou\ sangue}$, é importante lembrar que o efeito alérgico não é dose-dependente. Portanto, para este tipo de situação, o trabalhador exposto não poderia se beneficiar da medida de um indicador biológico para monitorizar a exposição ao Co. Nestes casos, um teste de sensibilidade e algumas provas de função pulmonar deveriam constar dos exames pré-admissionais no PCMSO.

As evidências de carcinogenicidade do Co na forma metálica e óxidos parecem estar comprovados em animais, mas os estudos epidemiológicos ainda não são suficientes para confirmar este efeito no homem.

Os procedimentos de monitorização biológica e vigilância de saúde ganham destaque por refletir todas as vias de exposição, quer ocupacional quer extra-ocupacional, assim como detectar efeitos adversos precoces no órgão-alvo. Os fatores que interferem na monitorização biológica deveriam sempre ser analisados em conjunto, pois são geralmente aqueles que alteram a toxicocinética do agente químico, tais como as diferenças fisiológicas entre os indivíduos, os hábitos (como o fumo) e os patológicos (como doenças hepáticas, renais e pulmonares). Com relação a esses fatores, pouco se conhece especificamente para o Co. A interpretação dos resultados também depende da existência de intervalos de referência para população não-exposta em termos de raça, sexo, idade e exposição a fatores ambientais.

A utilização de um indicador biológico só é possível com uma metodologia, sensível, precisa e exata de acordo com os atuais

conhecimentos e desenvolvimento metodológicos.

Com relação aos métodos estudados para quantificar o Co, houve uma evolução através dos anos no intuito de se selecionar métodos confiáveis e de custos acessíveis. Sendo assim, de acordo com os achados nesta revisão, o Co tem sido quantificado em materiais biológicos por diferentes métodos analíticos, como pode ser observado na Tabela 13.

O estudo crítico dos métodos existentes na literatura considera todos os fatores que possam influir no processo como um todo. A sensibilidade, a especificidade do método e o grau de dificuldade na preparação da amostra, que pode levar a um aumento na probabilidade de contaminação, são parâmetros importantes a serem considerados. O custo do equipamento e dos reativos não poderia ser negligenciado no delineamento experimental para a padronização de um método.

Os métodos que se utilizam de espectrofotometria na região do visível geralmente envolvem uma série de etapas de pré-concentração para que a amostra seja levada à faixa de concentração de interesse para o Co. Assim, para fins de monitorização biológica, estes, ficariam restritos e, além do mais, alguns interferentes do método espectrofotométrico são metais, como o zinco e ferro, presentes normalmente em amostras biológicas.

Os métodos que se utilizam de quimioluminescência, embora forneçam um limite de detecção na ordem de 0,1 ppb ($\mu\text{g/L}$) para a quantificação do Co, têm aplicação limitada devido a inúmeros interferentes presentes na matriz biológica como por exemplo o Mg II, que tem um efeito depressor sobre o desenvolvimento da quimioluminescência.

A Espectrofotometria de Absorção Atômica por Chama (F-AAS) apresenta inúmeras vantagens para a determinação de metais de maneira geral. A F-AAS é uma técnica rápida, simples e de baixo custo, além de apresentar boa precisão para os métodos padronizados para dosar metais. Como desvantagem, necessita grandes volumes de

amostras ⁽⁸⁷⁾, o que a inviabilizaria para alguns materiais biológicos. A sensibilidade do F-AAS atinge a concentração de 1-10 µg/L e, assim seria insuficiente para a faixa de interesse se o indicador biológico utilizado fosse a dosagem de Co no sangue. A ACGIH recomenda para a exposição ao Co um BEI para o sangue de 1 µg/L de Co⁽¹⁰⁾ e para a urina o BEI recomendado pela ACGIH é de 15 µg de Co/g de creatinina⁽¹⁰⁾. De acordo com os métodos encontrados para dosar Co em sangue e/ou urina, a F-AAS não seria uma técnica comumente utilizada para tal finalidade. Além do mais a F-AAS apresenta baixa sensibilidade para os valores de referência propostos para o Co no sangue (0,01-0,91 µg/L) e urina (0,18-0,96 µg/L) na população sadia e não ocupacionalmente exposta⁽⁶⁶⁾, fato que limita a sua utilização na monitorização biológica.

A análise de Co por ativação neutrônica (NAA) tem sido utilizada desde a década de 50. Atualmente, é utilizada como técnica de referência para checar, validar novas técnicas e produzir material de referência devido a sua alta sensibilidade e especificidade. Contudo, para fins de monitorização biológica, fica limitada, devido ao seu custo elevado, à alta qualificação técnica requerida para o operador, e ao tempo dispensado para realizar a análise.

Os métodos de espectrofotometria de emissão atômica com plasma induzido (ICP-AES) competem favoravelmente com o de absorção atômica por forno de grafite. Os limites de detecção (1-10 µg/L) não permitem que se atinja a faixa de valores de referência proposta para o Co no sangue e na urina em indivíduos não ocupacionalmente expostos e sadios ⁽⁶⁶⁾, o que não impediria a utilização para fins de monitorização biológica ou como um método de triagem para o trabalhador exposto. A utilização de técnicas de pré-concentração da amostra poderiam levar a um aumento na sensibilidade deste método, o que ampliaria sua utilização em população sadia não- exposta ocupacionalmente, com o propósito de estabelecer valores de referência, como já relatado neste trabalho ⁽⁶⁶⁾.

Segundo a análise dos dados encontrados na literatura, há uma forte evidência de que a espectrofotometria de absorção atômica com forno de grafite seria o método mais apropriado para quantificar o Co com finalidade de monitorização biológica. Apesar da presença de interferentes em amostras biológicas, estas podem ser minimizadas se forem utilizadas as condições de STPF (*Standard Temperature Platform Furnace*), a correção de “background”, ou ainda um modificador químico .

A sensibilidade é um fator determinante na escolha do método; na Tabela 16, podemos observar que os limites de detecção para os métodos de ET-AAS encontrados ficam na faixa de 0,1 a 2,4 µg/L .Merece especial destaque o método de ET-AAS proposto por IVERSEN et al.⁽⁴⁶⁾ para análise de metais- traço, que é parte do projeto da EURO-TERVIHT (*Trace Element Reference Values in Human Tissues*), cujo objetivo é estabelecer valores de referência de elementos-traço em tecidos humanos, para fins de estratégias de monitorização biológica, e o método de ET-AAS proposto por KIMBERLY et al.⁽⁵⁰⁾, que foi o de escolha para determinar a correlação $Co]_{ar\ ambiente} \text{ versus } [Co]_{urina}$ em colaboração com o NIOSH⁽⁶⁹⁾ para trabalhadores expostos a esse metal na manufatura de ferramentas de carbetto de tungstênio. Os métodos de ET-AAS, além de apresentarem boa sensibilidade para o propósito de monitorização biológica, apresentam diversas vantagens, como a necessidade de pequenos volumes de amostra, poucas etapas de preparo e correção de “absorção de fundo” para efeitos da matriz biológica. Além do mais, é compatível com os equipamentos de espectrofotometria de absorção atômica por forno de grafite encontrado no Brasil em laboratórios que pretendem realizar análises com finalidade de monitorização biológica para metais.

Em quaisquer dos métodos sugeridos, a urina tem sido o material biológico de preferência, por dois principais motivos: é um método não-invasivo, facilitando a coleta e a aceitação pelo trabalhador exposto em

se submeter a um controle deste tipo; os valores de referência encontrados na urina da população não-exposta estão mais adequados para os limites de detecção dos métodos estudados do que os valores propostos para o sangue.

Para atender satisfatoriamente às exigências da aplicação de um efetivo indicador biológico de exposição, isto é, o conhecimento dos efeitos adversos e da metodologia mais adequada e eficiente, é necessário que se complemente essa aplicação com um efetivo sistema de qualidade. A adoção de um Sistema de Qualidade vem uniformizar e tornar confiáveis os dados e informações toxicológicas obtidas, levando também à diminuição de barreiras técnicas para um intercâmbio internacional. Os critérios para a implantação de um sistema de qualidade estão embasados no processo organizacional sobre os quais os estudos ou rotinas de um laboratório são planejados, realizados, monitorizados, registrados e relatados. Estes critérios têm levado a recomendações de um sistema de qualidade ,aplicáveis a laboratórios de análises quando adaptados convenientemente. Assim, laboratórios de toxicologia que fazem análises para fins de monitorização biológica, cuja estrutura organizacional é muito semelhante, estariam incluídos. Uma vez implantado este sistema, a opção de adquirir uma certificação em sistema de qualidade por um órgão credenciado ao INMETRO pode ser um importante atributo. O objetivo, na maioria das vezes, é posicionar o laboratório dentro do mercado com vantagens competitivas.

Uma vez implantado, o sistema de qualidade deve ter uma estrutura que garanta validação e planejamento de novos processos analíticos, de acordo com os requisitos pré-estabelecidos para adquirir qualidade. O controle de qualidade interno e externo é de extrema importância, mas, no enfoque da gestão de qualidade, constitui apenas um item garantindo qualidade e confiabilidade nos resultados das análises. O processo como um todo inclui gerenciamento e organização laboratorial, que tem a capacidade de identificar, corrigir e reestruturar falhas identificadas em qualquer fase do processo, levando a uma visão

global em termos de estrutura , enfocando o cliente como o ponto mais importante da cadeia .

Finalizando, considera-se relevante integrar todos esses conhecimentos e requisitos para a efetiva aplicação de um indicador biológico no procedimento de monitorização biológica e o Co não foge desta regra.

6-CONCLUSÃO

1. Pela revisão realizada, verificou-se a existência de informações toxicológicas e analíticas necessárias e suficientes que justificam a introdução do Co como indicador biológico de exposição, como recomenda o PCMSO da NR-7⁽⁶⁰⁾.
2. Pela revisão realizada as metodologias analíticas mais adequadas e confiáveis para serem aplicadas para a determinação de Co em amostras biológicas são:
 - espectrofotometria de absorção atômica com forno de grafite (LOD $\Rightarrow$ 0,1 - 2,4 $\mu\text{g/L}$)
 - espectrofotometria de emissão atômica por plasma induzido (LOD $\Rightarrow$ 0,9 - 2,4 $\mu\text{g/L}$) e
 - análise por ativação neutrônica (LOD não determinado nos métodos encontrados)
3. Estas metodologias têm sensibilidade para os valores de referência sugeridos ⁽⁶⁶⁾ e os BEIs recomendados pela ACGIH⁽¹⁰⁾ na dosagem de Co na urina que são respectivamente:
 - 0,18-0,96 $\mu\text{g/L}$ ⁽⁶⁶⁾
 - 15 $\mu\text{g/g}$ creatinina ⁽¹⁰⁾
4. Estas metodologias têm sensibilidade para o BEI recomendado pela ACGIH⁽¹⁰⁾ para dosagem de Co no sangue de 1 $\mu\text{g/L}$
5. A maioria dos métodos revistos não tem sensibilidade para o limite inferior dos valores de referência sugerido ⁽⁶⁶⁾ para Co no sangue de 0,01-0,91 $\mu\text{g/L}$ ⁽⁶⁶⁾.
6. As concentrações dos compostos solúveis do Co aumentam no sangue e na urina proporcionalmente ao aumento do nível de exposição.
7. A determinação do Co na urina oferece vantagens na avaliação da exposição ocupacional ao Co, em relação à determinação do Co no sangue, por exigir uma amostra não invasiva.

- 8.** As metodologias citadas atendem à faixa de concentração de interesse toxicológico para a monitorização biológica da exposição ocupacional ao Co, sendo que escolha da metodologia , seja ET-AAS, ICP-AES ou NAA depende dos recursos disponíveis.
- 9.** A monitorização biológica de trabalhadores expostos ao Co não está, à luz dos atuais conhecimentos, adequada para monitorizar as pessoas com histórico de resposta alérgica a esse metal.
- 10.** De acordo com as novas recomendações internacionais, é indispensável que o laboratório disposto a realizar análises toxicológicas visando à monitorização biológica da exposição ocupacional através de marcadores biológicos, e aqui se inclui o Co, desenvolva um Programa de Garantia de Qualidade.
- 11.** Os Laboratórios de Análises Toxicológicas que se disponham a realizar validações analíticas de metodologias aplicáveis aos marcadores biológicos de exposição ocupacional devem implantar um Sistema de Qualidade para que seus resultados tenham reconhecimento da comunidade científica nacional e internacional, assim como competitividade no mercado.
- 12.** Tendo em vista as conclusões anteriores, a dosagem de Co no sangue e/ou urina pode ser utilizada pelo PCMSO como indicador biológico nos trabalhadores expostos ocupacionalmente a compostos solúveis de Co e, oportunamente ser incluído no Quadro I da NR-7 PCMSO⁽⁶⁰⁾.

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AGGARWAL, S.K., KINTER, M., HEROLD, D.A. Determination of cobalt in urine by gas chromatography-mass spectrometry employing nickel as an internal standard. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.576, p.297-304, 1992.
2. AITIO, A. Biological monitoring today and tomorrow. **Scand. J. Work Environ. Health**, Helsinki, v.20, p.46-58, 1994. [special issue].
3. AITIO, A., JARVISALO, J. Collection, processing and storage of specimens for biological monitoring of occupational exposure to toxic chemicals. **Pure Appl. Chem**, v.56, n.4, p.549-566, 1984.
4. AJAYI, O.O., ANSARI, T.M., LITTLEJOHN, D. Evaluation of automatic probe atomization for determination of elements in urine and whole blood by electrothermal atomic absorption spectrometry. **J. Anal. At. Spectrom.**, London, v.7, p.689-693, Jun., 1992.
5. ALESSIO, L., APOSTOLI, P., CRIPPA, M. Influence of individual factors and personal habits on the levels of biological indicators of exposure. **Toxicol. Lett.**, Amsterdam, v.77, p.93-103, 1995.
6. ALEXANDERSSON, R, LIDUMS, V. Undersoknigar over effekter av exposition for kobolt. IV. Koboltconcentrationen i blod och urin som expositiondiktator. **Arbete och Alsa**.8:1-23, 1979. Apud: COMMISSION OF EUROPEAN COMMUNITIES INDUSTRIAL HEALTH AND SAFETY. Biological indicators for the assesssment of human exposure to industrial chemicals: cobalt s. n. t., 1987. p.51-61. [Fotocópia]

7. ALEXIEV, A.A., ANGELOVAM, M.G. Routine catalytic determination of trace amounts of cobalt in small urine samples. **Mikrochim. Acta**, Wien, v.11, p.243-247, 1987.
8. AMERICAN Conference of Governmental and Industrial Hygienists **Limites de Exposição (TLVs) para substâncias químicas e agentes físicos e Índices Biológicos de Exposição (BEIs)** Cincinnati: - ACGIH, 1996. p.4, 20, 61.
9. AMERICAN Conference of Governmental and Industrial Hygienists **Limites de Exposição (TLVs) para substâncias químicas e agentes físicos e Índices Biológicos de Exposição (BEIs)** Cincinnati: ACGIH, 1998. p.5, 29, 72, 86, 94.
10. AMERICAN Conference of Governmental and Industrial Hygienists **TLVs e BEIs: Thereshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents** Cincinnati: ACGIH, 1999. p.27, 97.
11. ANGERER, J., SCHALLER, K.H., eds. **Analyses of hazardous substances in biological materials**. Weinheim: German Science Foundation - DFG, 1985. v.1, p.141-151.
12. ARNOLD, K.L. **O guia preferencial para a ISO 9000**. Rio de Janeiro: Campus, 1995. 400 p.
13. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **Gestão de qualidade e garantia da qualidade-terminologia NBR ISO 8402**. Rio de Janeiro, 1994. 15p.
14. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **Requisitos gerais para a capacitação de laboratórios de calibração e de ensaios: ISO/IEC GUIA 25**. Rio de Janeiro, 1993. 7p.

15. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT.
Sistemas de qualidade - modelo para garantia da qualidade em produção, instalação e serviços associados: NBR-ISO 9002. Rio de Janeiro, 1994. 11p.
16. BARBORIK, M., DUSEK, J. Cardiomyopathy accompanying industrial cobalt exposure. **Br. Heart J.**, London, v.34, p.113-116, 1972.
17. BARFOOT, R.A., PRITCHARD, J.G. Determination of cobalt in blood. **Analyst**, Amsterdam, v.105, p.551-557, 1980.
18. BASELT, R.C. **Biological monitoring methods for industrial chemicals.** Davis: Biomedical Publications, 1980. p.84-87.
19. BEIJER, K., JERNELOV, A. Sources, transport and transformation of metals in environment. In: FRIBERG, L., BORDUG, G.F., Vouk, V.B., eds. **Handbook on the toxicology of metals.** 2 ed. Amsterdam: Elsevier, 1986. v.1, p.68-74. Apud: CASARETT AND DOULL'S toxicology:the basic science of poisons. 5 ed. New York: McGraw-Hill,1996. p. 691.
20. CAROLIS, S., VIOLANTE, N., DELLE FEMINE, P., ALIMONTI, A., PETRUCCI, F., SENOFONTE, O. **Principe teorici ed applicazioni analitiche della spettrometria di emissione atomica on sorgente a plasma induttivo.** Roma: Istituto Superiore di Sanita, Laboratorio di Tossicologia Applicata, 1985. 58p. [Corso teorico - pratico tenuto presso 1' ISS].
21. CASARETT AND DOULL'S toxicology:the basic science of poisons. 5.ed. New York: McGraw-Hill,1996. p.443-60, 691-693, 714-715.

22. CHASIN, A.A.M., CHASIN, M., SALVADORI, M.C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Rev. Farm. Bioquim. Univ. Sao Paulo**, São Paulo, v.30, n.2, p.49-53, 1994.
23. COMMISSION OF EUROPEAN COMMUNITIES INDUSTRIAL HEALTH AND SAFETY. Biological indicators for the assessment of human exposure to industrial chemicals: cobalt s. n. t., 1987. p.51-61. [Fotocópia]
24. CORNELIS, R., SPEECKE, A., HOSTE, J. **Anal. Chim. Acta** 78, 317-327 (1975) Apud: AITIO, A., JARVISALO, J. Collection, processing and storage of specimens for biological monitoring of occupational exposure to toxic chemicals. **Pure Appl. Chem**, v.56, n.4, p.556, 1984.
25. CULLEN, M.R. Respiratory diseases from hard metal exposure, a continuing enigma. **Chest**, El Paso, v.86, p.513-514, 1984.
26. DAVISON, A.G., HASLAM, P.L., CORRIN, B., COUTTS, I.I., DEWAR, A., RIDING, W.D., STUDY, P.R., NEWMAN-TAYLOR, A.J. Interstitial lung disease and asthma in hard-metal workers: bronchoalveolar lavage, ultrastructural, and analytical findings and results of bronchial provocation tests. **Thorax**, London, v.38, p.119-128, 1983.
27. DE GOEIJ, J.J.M., WOITTIEZ, J.R.W. Position of RNAA in trace-element analysis. **J. Radioanal. Nucl. Chem.**, Lausanne, v.168, n.2, p.429-437, 1993.
28. DELLA ROSA, H.V. **Exposição ao Co, riscos à saúde**. São Paulo: Sindicato das Indústrias de Produtos Químicos para fins Industriais e Petroquímicos no Estado de São Paulo, 1996. n.p. [Apostila].

29. DELLA ROSA, H.V., SIQUEIRA, M.E.P.B. DE, FERNICOLA, N.A.G.G. DE. **Monitorização biológica da exposição humana a agentes químicos**. São Paulo: Fundacentro, 1991. 67p.
30. DEMETS, M., CHEYSENS, B., NAGELS, J., VERBEKEN, E., LAUWERYS, J., VAN DEN ECKOUT, A., LAHAYE, D., GYSELEN, A. Cobalt lung in diamond polishers. **Am. Rev. Respir. Dis.**, New York, v.130, p.130-135, 1984.
31. ELINDER, C.G., FRIBERG, I. Cobalt In: **Handbook on the toxicology of metals** 2.ed. Amsterdam: Elsevier, 1986. cap.9, p.68-78. [VII: specific metals]
32. EVANS, C.H. The spectrophotometric determination of micromolar concentrations of Co^{2+} using o-phenantroline. **Anal. Biochem.**, Orlando, v.135, p.335-339, 1983.
33. FÁVARO, D.I.T. HUI, M.L.T., COZZOLINO, S.M.F., MAIHARA, V.A., ARMELIN, M.J.A., VASCONCELLOS, M.B., YUYAMA, L.K., BOAVENTURA, G.T., TRAMONTE, V.L. Determination of various nutrients and toxic elements in different brazilian regional diets by neutron activation analysis. **J. Trace Elem. Med. Biol.**, Jena, v.11, p.129-136, 1997.
34. FORRESTER, M.E., SKERKER, L.B., NEMIROFF, M.J. Hard metal pneumoconiosis: another cause of diffuse interstitial fibrosis. **Radiology**, Syracuse, v.128, p.609-612, 1978.
35. GOELZER, B.I.F. Occupational health: a requirement for development. **World Health Forum**, Geneve, v 50 no.5, p. 60-67, 1998.

36. GOMEZ, G.C., TORRES, A.G., PAVON, J.M.C., OJEDA, B.
Determination of cobalt in biological samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry after preconcentration by extraction with 5-bis(di-2-pyridylmethylene) thiocarbohydrazide. **Anal. Lett.**, Monticello, v.28, n.7, p.1181-1196, 1995.

37. GOYER, A.R., CHERIAN, G.M. **Toxicology of metals**. Alemanha: Springer, 1995. p.358-360.

38. GUDER, N.G., NARAYANAN, S., WISSER, H., ZAWTA, B.
Amostras do paciente para o laboratório. Darmstad: GIT Verlag, 1996. p.18.

39. HARRIS, E.K. Proposed goals for analytical precision and accuracy in single-point diagnostic testing. . **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Northfield, v.112, p.416-420, 1988.

40. HARTUNG, M., SCHALLER, K.H., BRAND, E., On the question of the pathogenic importance of cobalt for hard metal fibrosis of the lung. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlin, v.50, p.53-57, 1982.

41. HEINZOW, B.G.J., MCLEAN, A. Clinical evaluation of current concepts in exposure assessment. **Clin. Chem.**, New York, v.40, n.7, p.1368-1375, 1994.

42. HOGSTED, C. and R. ALEXANDERSSON- Dodsorsaker hos hardmetallarbetare **Arbete Hälsa**, 21 (26 p.), 1990. Apud: DELLA ROSA, H.V. **Exposição ao Co, riscos à saúde**. São Paulo: Sindicato das Indústrias de Produtos Químicos para fins Industriais e Petroquímicos no Estado de São Paulo, 1996. n.p. [Apostila].

43. ICHIKAWA, Y., KUSAKA, Y., GOTO, S., Biological monitoring of cobalt exposure, based on cobalt concentrations in blood and urine. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlin, v.55, p.269-276, 1985.
44. INSTRUMENTOS CIENTÍFICOS C.G. **Forno de grafite**: manual de métodos e aplicações. São Paulo, 1989. 74p.
45. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Chlorinated drinking water, chlorinated by products, some other halogenated compounds, cobalt and cobalt compounds. Lyon, v.52, 1991. Apud: DELLA ROSA, H.V. **Exposição ao Co, riscos à saúde**. São Paulo: Sindicato das Indústrias de Produtos Químicos para fins Industriais e Petroquímicos no Estado de São Paulo, 1996. n.p. [Apostila].
46. IVERSEN, B.S., PANAYI, A., CAMBLOR, J.P., SABBIONI, E. Simultaneous determination of cobalt and manganese in urina by electrothermal atomic absorption spectrometry. method development using a simplex optimization approach. **J. Anal. At. Spectrom.**, London, v.11, p.591-594, 1996.
47. JERONYMO, S.E.I. **Determinação de alumínio no líquido de diálise, no soro de indivíduos normais e no soro de pacientes com insuficiência renal, com e sem hemodiálise**. São Paulo, 1996. 65p. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo).
48. KENNEDY, A., KING, R., DORNAN, J.D. Fatal myocardial disease associated with industrial exposure to cobalt. **Lancet**, London, v.21, p.412-414, 1981.

49. KERFOOT, F.J., FREDRICK, W.G., DOMEJER, E. Cobalt metal inhalation studies on miniature swine. **Am. Ind. Hyg. Assoc. J.**, Chicago, v.36, p.17-25, 1975.
50. KIMBERLY, M.M., BAILEY, G.G., PASCHAL, D.C. Determination of urinary cobalt using matrix modifications and graphite furnace atomic absorption spectrometry with Zeeman effect background correction. **Analyst**, London, v.112, p.287-90, 1987.
51. LADOU, J. The role of multinational corporations in providing occupational health and safety in developing countries **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlin, v.68, p.363-366, 1996.
52. LAHAYE, D., DEMEDTS, M., VANDEN OEVER, R., ROOSELS, D. Lung diseases among diamond polishers due to cobalt? **Lancet**, London, n.8369, p.156-157, 1984. [Letter].
53. LASFARGUES, G., LISON, D., MALDAGUE, P., LAUWERYS, R. Comparative study of acute lung toxicology of pure cobalt powder and cobalt-tungsten carbide mixture in rat. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, Orlando, v.112, p.41-50, 1992.
54. LEONARD, A., LAUWERYS, R. Mutagenicity, carcinogenicity and teratogenicity of cobalt metal and cobalt compounds. **Mutat. Res.**, Amsterdam, v.239, p.17-27, 1990.
55. LINNAINMAA, M. **Control of cobalt exposures in grinding of hard metal and cobalt exposures stellite blades**. [online] Finnish Institute of Occupational Health, 1997. available from url: <http://www.occuphealth.fi/ttl/osasto/kattl/tutkimus/5530/kobolt.htm> [13 ago 1999].
56. LIPTÁK, B.G., ed. **Analytical instrumentation**. Radnor: Chilton, 1994. p.197.

57. LISON, D., LAUWERYS, R. In vitro cytotoxic effects of cobalt-containing dusts of mouse peritoneal and rat alveolar macrophages. **Environ. Res.**, New York, v.52, p.187-198, 1990.
58. LÓPEZ-ARTÍUEZ, .M., CAMEÁN, A., REPETTO, M. Preconcentration of heavy metal in urine and quantification by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.17, p.18-22, 1993.
59. MANUAIS de Legislação Atlas **Segurança e Medicina do trabalho** São Paulo: Atlas, 1996, p.86-91, 182-189.[NR 7-Programa de Controle Médico de saúde Ocupacional e NR-15-Anexo n º 11]
60. MANUAIS de Legislação Atlas **Segurança e Medicina do trabalho** São Paulo: Atlas, 1999, p.86-92, 182-189. .[NR 7-Programa de Controle Médico de saúde Ocupacional e NR-15-Anexo n º 11]
61. MARINO, D.F., WOLFF, F., INGLE JR., D. Determination of cobalt by lophine chemiluminescence. **Anal. Chem.**, Washington, v.51, n.12, p.2051-2053, 1979.
62. MARSHALL, J.W., BANGERT, S.K. **Clinical biochemistry metabolic and clinical aspects**. New York: Churchill Livingstone, 1995. p.182-183.
63. MENDES, M.E. **Avaliação da implantação de um sistema de qualidade em um laboratório clínico público**. São Paulo, 1998. 202p. (Tese de Doutorado - Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo).
64. MERCK INDEX: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 12.ed. Whitehouse Station: Merck, 1996. p.2488-2504.

65. MERTZ, W., ABERNATHY, C.O, OLINS, S.S., eds. **Risk assessment of essential elements**. Washington: ILSI Press, 1994. p.13-15, 48-49.
66. MINOIA, C., SABBIONI, E., 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. A study of 46 elements in urine blood and serum of Italian subjects. **Sci. Total Environ.**, Amsterdam, v.95, p.89-105, 1990.
67. MORGAN, L.G. A study into the health and mortality of men exposed to cobalt and oxides. **J. Soc. Occup. Med.**, London, v.33, p.181-186, 1983.
68. MUR, J.M., MOULIN, J.J., CHARRUYER-SEINERRA, M.P., LAFITTE, J. A cohort mortality study among cobalt and sodium workers in an electrochemical plant. **Am. J. Ind. Med.**, v.11, p.75-81, 1987.
69. NATIONAL INSTITUTE OF OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH (NIOSH), 1981, Criteria for controlling occupational exposure to cobalt.—**National Hazard Assessment, DHHS - Publication**. Washington D.C. Superintendent of Documents. US Government Print Office, 1981. no.82-107. p. 95.
70. NATIONAL RESEARCH COUNCIL (U.S.) Subcommittee on the Tenth Edition of the RDAs. Recommended dietary allowances. 10.ed. Washington: National Academy Press, 1989. p.267-268.
71. OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Ateneu, 1996. p.137-151.

72. PAYNE, L.R. The hazards of cobalt. **J. Soc. Occup. Med.**, London, v.27, p.20-25, 1977.

73. PEARSON, R.M., SEIM, H.J. Spectrophotometric determination of cobalt complexed with p-nitrophenylhydrazone of diacetylmonoxime and ethylenediamine. **Anal. Chem.**, Washington, v.49, p.4, 1977.

74. PELLET, F., PEDRIX, A., VINCENT, M., MALLION, J.M. Dosage biologique du cobalt urinaire. **Arch. Mal. Prof.**, Paris, v.45, n.2, p.81-85, 1984.

75. RHOADS, K., SANDERS, C.L. Lung clearance, translocation and acute toxicity of arsenic, berillium, cadmium, cobalt, lead, selenium and ytterbium oxides following deposition in rat lung. **Environ. Res.**, New York, v.36, p.359-378, 1985.

76. RISBY, T.H. Atomic spectrometry analysis. In: ULTRATRACE analysis of pharmaceuticals and other compounds of interest. New York: Wiley, 1986. cap.6, p.179-194.

77. SAMPSON, B. Determination of Cobalt in plasma and urine by electrothermal atomisation atomic absorption spectrometry using Palladium matrix modification. **J. Anal. At. Spectrom.**, London, v.3, p.465-469, 1988.

78. SCANSETTI, G., LAMON, S., TALARICO, S., BOTTA, G.C., SPINELLI, P, SULOTO, F, FANTONI, F. Urinary cobalt as a measure of exposure in the hard metal disease. **Int. Arch. Environ. Health**, 57:19-26, 1985. Apud: COMMISSION OF EUROPEAN COMMUNITIES INDUSTRIAL HEALTH AND SAFETY. Biological indicators for the assesssment of human exposure to industrial chemicals: cobalt s. n. t., 1987. p.51-61. [Fotocópia]

79. SCHWARTZ, L., PECK, S.M., BLAIR, K.E., MARKUSON, E. Allergic dermatitis due to metallic cobalt. **J. Allergy**, St. Louis, v.16, p.51-53, 1945.
80. SHAPIRO, R., MARTIN, M.T. Determination of cobalt by atomic absorption spectrometry. **Methods Enzymol.**, New York, v.158, p.344-351, 1988.
81. SHIRAKAWA, T., KUSAKA, Y., FUJIMURA, N., GOTO, S., MORIMOTO, K. The existence of specific antibodies to cobalt in hard metal asthma. **Clin. Allergy**, Oxford, v.18, p.451-460, 1988.
82. SJÖGREN, I., HILLERDAL, G., ANDERSSON, A., ZETTERSTROM, O. Hard metal lung disease: importance of metals in coolants. **Thorax**, London, v.35, p.653-659, 1980.
83. SLAVIN, W. Spectroscopy Int., 1991, 4 (1),22 Apud: VANDECASTEELE, C. **Modern methods for trace element determination**. Chichester: Wiley, 1993. p.170.
84. SPENCER, H. **Pathology of the Lung**. 4.ed. Oxford: Pergamon Press, 1985. v.1, p.481-482.
85. SPRINCE, N.L., OLIVER, L.C., EISEN, E.A., GREENE, R.E., CHAMBERLIN, R.I. Cobalt exposure and lung disease in tungsten carbide production. **Am. Rev. Respir. Dis.**, New York, v.138, p.1220-1226, 1988.
86. STEINHOFF, D., MOHR, U. On the question of a carcinogenic action of cobalt containing compounds. **Exp. Pathol.**, Jena, v.41, p.169-174, 1991.

87. SUBRAMANIAN, K.S. Determination of metals in biofluids and tissues: sample preparation methods for atomic spectroscopic techniques. **Spectrochim. Acta, Part B**, Oxford, v.51, p.291-319, 1996.
88. SWENNEN, B., BUCHET, J-P., STĂNESCU, D., LISON, D., LAUWERYS, R., Epidemiologic survey on workers exposed to cobalt oxides, cobalt salts and cobalt metal. **Br. J. Ind. Med.**, London, v.50, p.835-842, 1993.
89. TOLOT, F., GIRARD, R., DORTIT, G., TABOURIN, G., GALY, P., BOURRET, J. Manifestations pulmonaires des métaux durs. Troubles irritatifs (enquête et observations cliniques). **Arch. Mal. Prof.**, Paris, v.31, p.453-470, 1970.
90. TSALEV, D.L., ZAPRIANOV, Z.K. **Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice**. Boca Raton: CRC Press, 1983. [Analytical Aspects and Health Significance], v.1 p.117-121.
91. TSALEV, D.L., ZAPRIANOV, Z.K. **Atomic absorption spectrometry in occupational and environmental health practice**. Boca Raton: CRC Press, 1983. v.2, p.1-55. [Determination of Individual Elements]
92. TYLER, G. **AA or ICP- Which do you choose?**; Australia: Varian Australia Pty Ltd, 1991, 6p.
93. VANDECASTEELE, C. **Modern methods for trace element determination**. Chichester: Wiley, 1993. p.55-73, 133-137, 139-157, 169-173, 193-195, 303-318.

94. VERSIECK, J., HOSTE, J., BARBIER, F., STEYAERT, H.D.E., RUDDER, J., MICHELS, H. Determination of chromium and cobalt in human serum by neutron activation analysis. **Clin. Chem.**, New York, v.24, n.2, p.303-308, 1978.
95. WEHNER, A.P., BUSCH, R.H., OLSEN, R.J., CRAIG, D.K. Chronic inhalation of cobalt oxide and cigarette smoke by hamsters. **Am. Ind. Hyg. Assoc. J.**, Chicago, v.38, p.338-346, 1977.
96. WINTER, M.E., KIMBLE, M.A.K., YOUNG, L.Y. **Basic cLinical pharmacokinetics**. 2.ed. Vancouver: Applied Therapeutics, 1988. p.9-44
97. XIAO-QUAN, S., JUN, T., GUANG-GUO, X. Determination of trace elements in water, sea water and biological samples by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry after pre-concentration with ammonium pyrrolidinedithiocarbamate precipitation. **J. Anal. At. Spectrom.**, London, v.3, p.259-263, 1988.
98. YAN-ZHONG, L., ZHE-MING, N. Atom release of Mn, Co, Ag, and Tl in a graphite furnace atomizer with and without palladium modifier. **Spectrochim. Acta, Part B**, Oxford, v.49, n.3, p.229-241, 1994.