



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ISMAEL RODRIGUES AMADOR

**ESTUDO SOBRE ENDOTOXINAS ASSOCIADAS AO  
MATERIAL PARTICULADO GROSSO E FINO EM AR  
AMBIENTE**

---

Londrina  
2016

ISMAEL RODRIGUES AMADOR

**ESTUDO SOBRE ENDOTOXINAS ASSOCIADAS AO  
MATERIAL PARTICULADO GROSSO E FINO EM AR  
AMBIENTE**

Tese de Doutorado apresentado ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Solci.

Londrina  
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Amador, Ismael Rodrigues.

Estudo sobre endotoxinas associadas ao material particulado grosso e fino em ar ambiente / Ismael Rodrigues Amador. - Londrina, 2016.  
136 f.

Orientador: Maria Cristina Solci.

Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2016.  
Inclui bibliografia.

1. Endotoxinas - Tese. 2. Material particulado fino - Tese. 3. Biomarcados - Tese. 4. MP10; MP2,5; MP1,0 - Tese. I. Solci, Maria Cristina. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

ISMAEL RODRIGUES AMADOR

**ESTUDO SOBRE ENDOTOXINAS ASSOCIADAS AO MATERIAL  
PARTICULADO GROSSO E FINO EM AR AMBIENTE**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Química da Universidade Estadual de Londrina, um dos requisitos à obtenção do título de Doutor em Química.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Solci  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Cesar Ricardo Teixeira Tarley  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Profa. Dra. Elisabete Yurie Sataque Ono  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Sandro Xavier de Campos  
Universidade Estadual de Ponta Grossa -  
UEPG

---

Profa. Dra. Vania Palmeira Campos  
Universidade Federal da Bahia - UFBA

Londrina, 28 de junho de 2016.

A todas as pessoas, que direta ou indiretamente, contribuíram para esse trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Maria Cristina Solci, por todo conhecimento e ensinamento passado, pela orientação, pelo incentivo, pela motivação, pela grande amizade, pelo ser humano fantástico que é.

Aos colegas que sempre contribuíram nos momentos de dificuldades.

Gostaria de agradecer especialmente a minha família que não mediu esforço para que eu tornasse esse momento possível.

A coordenação da pós-graduação, pela dedicação e esforço despendido.

A Capes pela bolsa concedida, que contribuiu para desenvolvimento desse trabalho.

**A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido. Não na vitória propriamente dita.**

*Mohandas Karamchand Gandhi*

AMADOR, Ismael Rodrigues. **Estudo sobre endotoxinas associadas ao material particulado grosso e fino em ar ambiente**. 2016. 128 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## RESUMO

O material particulado atmosférico é um importante constituinte do ar ambiente. A determinação de sua concentração e a distribuição por tamanho em diferentes ambientes é essencial devido à sua habilidade em penetrar profundamente no trato respiratório humano e animal. Endotoxina é um importante componente biológico associado ao material particulado (MP) atmosférico que através da inalação pode induzir a efeitos adversos na saúde. Endotoxina é encontrada nas frações grossa e fina do MP, em ar ambiente e interno. Amostras de material particulado em suspensão em diferentes tamanhos aerodinâmicos (MP<sub>10</sub>, MP<sub>2,5</sub> e MP<sub>1,0</sub>) e 5 sub-frações (< 2,5 µm; 1,0-2,5 µm; 0,5-1,5 µm; 0,25-0,5 µm; > 0,25 µm) foram coletadas no interior de dois diferentes ambientes e analisadas quanto ao conteúdo de endotoxinas e concentração de MP. As amostras de ar foram coletadas sobre filtros de fibra de vidro no interior de uma lavanderia de hospital e de um galpão para criação de frangos. Impactadores de baixo volume ciclones e o impactador em cascata *Sioutas* foram utilizados para as amostragens. A técnica de medida empregada foi baseada na separação e detecção de marcadores químicos (3-hidroxi ácidos graxos) por meio de cromatografia. Na lavanderia, o MP fino representou 47 % do MP grosso. As concentrações variaram foram de 94,1 µg m<sup>-3</sup> para MP<sub>10</sub>; 43,2 µg m<sup>-3</sup> para MP<sub>2,5</sub> e 38,9 µg m<sup>-3</sup> na fração MP<sub>1,0</sub>. Os níveis de endotoxina variaram entre 3.522 a 6.624 ng m<sup>-3</sup>. As concentrações de endotoxina associadas ao MP foram muito elevadas excedendo alguns valores limites de exposição não oficiais propostos por vários autores. No interior da granja de frangos de corte, o MP<sub>10</sub> apresentou altas concentração (209 a 533 µg m<sup>-3</sup>). MP<sub>2,5</sub> e MP<sub>1,0</sub> apresentaram concentrações baixas inicialmente (20,8 a 16,0 µg m<sup>-3</sup>, respectivamente), com níveis crescentes (412,9 a 344,8 µg m<sup>-3</sup>, respectivamente) durante a amostragens. Os níveis de concentração de PM são considerados excessivamente elevados, com grande potencial para afetar a saúde animal e humana. As concentrações de endotoxina variaram entre, 3.101 ng m<sup>-3</sup> para PM<sub>2,5</sub>, e 5.829 ng m<sup>-3</sup> para PM<sub>10</sub>. Na última amostra de endotoxina, o PM<sub>1,0</sub> correspondeu 89 % da fração fina. O perfil obtido foi de distribuição bimodal com maior concentração de MP na fração grossa e a seguir na fração de partículas consideradas quase ultrafinas. Endotoxina foi encontrada em todas as frações com concentrações bem elevadas na fração grossa. O perfil obtido nesta técnica de amostragem mostrou a distribuição do LPS associado ao MP simulando a penetração de partículas tóxicas no trato respiratório. Foi proposto o cálculo da taxa percentual LPS/MP. Os valores encontrados mostraram que focando a massa de endotoxina, sua maior concentração esteve sempre associada à fração fina e mais prejudicial do material particulado atmosférico.

**Palavras-chave:** Endotoxinas. Inalável. Respirável. Material particulado fino. *Sioutas*.

AMADOR, Ismael Rodrigues. **Study of endotoxins associated with coarse and fine particulate matter in ambient air**. 2016. 136 p. Thesis (Doctoral Degree in Chemistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

## ABSTRACT

Atmospheric particulate matter is an important constituent of ambient air. The determination of its concentration and size distribution in different environments is essential because of its ability to penetrate deeply into animal and human respiratory tract. Endotoxin is an important biological component of atmospheric particulate matter (PM) which upon inhalation can induce adverse health effects. Endotoxin is found in PM coarse and fine fraction in indoor and outdoor air. Size-resolved airborne particulate matter samples (PM<sub>10</sub>, PM<sub>2.5</sub>, and PM<sub>1.0</sub>) and 5 sub-fractions (< 2.5 μm; 1.0-2.5 μm; 0.5-1.5 μm; 0.25-0.5 μm; > 0.25 μm) collected inside two different ambient were analyzed for endotoxin and PM concentrations. Air samples were collected on glass fibre filters in a hospital laundry and in a broiler house. Low-vol impactors, cyclones, and *Sioutas* cascade impactor were used for the sampling. The measurement technique was based on the detection of 3-hydroxy fatty acids (3-OH-FAs) as chemical markers of the endotoxin lipopolysaccharide by means of chromatography. Inside the laundry, fine PM represented 47% of course PM. The PM concentrations were 94.1 μg m<sup>-3</sup> for PM<sub>10</sub>; 43.2 μg m<sup>-3</sup> for PM<sub>2.5</sub> and 38.9 μg m<sup>-3</sup> for PM<sub>1.0</sub>. Endotoxin levels varied between 3522 a 6624 ng m<sup>-3</sup>. The concentrations of airborne endotoxin determined exceeded many no officially approved threshold limit value proposed by various authors. Inside de broiler house, PM<sub>10</sub> showed high concentration (209 - 533 μg m<sup>-3</sup>). PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>1.0</sub> initially presented relatively low concentration (20.8 and 16.0 μg m<sup>-3</sup> respectively) with significantly increasing levels (412.9 and 344.8 μg m<sup>-3</sup> respectively) during the samplings. PM concentration levels are considered excessively high, with great potential to affect animal and human health. Endotoxin concentrations varied between, 3101 ng m<sup>-3</sup> for PM<sub>2.5</sub>, and 5829 ng m<sup>-3</sup> for PM<sub>10</sub>. In the last sample collected PM<sub>1.0</sub> endotoxin corresponded to 89% of the fine fraction. The size-resolved concentration of PM and endotoxin were obtained in five aerodynamic size fractions in both locations. The profile obtained was bimodal distribution with highest concentration of PM fine and quasi ultrafine particles. Endotoxin was found in all fractions with high concentration on coarse mode. The profile obtained with this sampling technique showed the distribution of LPS associated with the PM simulating the penetration of toxic particles in the respiratory tract. A percentage rate LPS/PM was proposed. The values found showed that focusing on the endotoxin mass, their largest concentration was always associated with the fine fraction and more damaging atmospheric PM.

**Key words:** Endotoxin. Inhalable. Breathable. Fine particulate matter. *Sioutas*

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Representação esquemática da expansão da parte lipídica da endotoxina, evidenciando os ésteres de ácidos graxos ..... 19
- Figura 2** – Representação esquemática do tamanho do material particulado grosso (MP10) e fino (MP2,5) ..... 22
- Figura 3** – Representação esquemática da deposição por tamanho de partículas em três regiões do trato respiratório humano ..... 23
- Figura 4** – Esquema representativo do invólucro da célula de uma bactéria Gram-negativa e suas quatro regiões (camadas) distintas. A membranas interna, periplasma, membrana externa e lipopolissacarídeo ..... 25
- Figura 5** – Representação ilustrativa das duas principais estruturas que compõem a endotoxina e suas subdivisões: Cadeia Polissacarídica contendo cerne (interno e externo) e cadeia polissacarídica específica (antígeno-O); Glicofosfolípideo (Lipídeo A) ..... 26
- Figura 6** – Esquema representativo das reações em cascata de LAL desencadeadas na presença de endotoxinas. As glucanos também podem levar ao mesmo resultado por outra via ..... 28
- Figura 7** – Ilustração genérica da estrutura química do lipídeo A, constituinte da endotoxina ..... 29
- Figura 8** – Imagem dos coletores MP10 *Low-vol* ZUF – Universidade de *Frankfurt* – Alemanha ..... 37
- Figura 9** – Imagem dos coletores ciclones *Teflon® Coated Aluminum Cyclones* MP<sub>1,0</sub> URG-2000-30EHB ..... 38
- Figura 10** – Imagem do coletor impactador *Sioutas*. Desmontado evidenciando as cinco seções responsáveis pelo fracionamento por tamanho (a), a sequência de montagem do coletor (b) e uma das seções responsável pelo fracionamento (d). Montado pronto para coleta (c) ..... 39
- Figura 11** – Representação da rota sintética para a produção do biomarcador 3-hidroxi-octadecanoico de metila: A1) ácido malônico, A2) ácido de Meldrum, A3) ácido hexadecanônico, A4) Cloreto de

hexadecanoila, A5) 2,2-dimetil-5-(hexadecan-1-ona)-1,3-dioxona-4,6-dion .....	40
<b>Figura 12</b> – Esquema reacional do ácido de Meldrun (A2) .....	41
<b>Figura 13</b> – Esquema reacional do cloreto de hexadecanoila (A4) .....	41
<b>Figura 14</b> – Esquema reacional do 2,2-dimetil-5-(hexadecan-1-ona)-1,3-dioxano-1,4-diona (A5) .....	41
<b>Figura 15</b> – Esquema reacional do 3-oxi-octadecanoato de metila (A6) .....	42
<b>Figura 16</b> – Esquema reacional para formação do 3-hidroxi octadecanoato de metila (A7) .....	42
<b>Figura 17</b> – Planta sala de lavagem da lavanderia do HU (área suja) onde foi realizada a amostragem. O destaque em vermelho representa a disposição dos coletores durante a amostragem .....	43
<b>Figura 18</b> – Imagem da montagem dos dois conjuntos usados para amostragem na “área suja” da lavanderia do HU. Lado esquerdo: da esquerda para a direita coletores; MP <sub>1,0</sub> A, MP <sub>2,5</sub> A, MP <sub>1,0</sub> B e MP <sub>2,5</sub> B. Lado direito: da esquerda para direita; MP <sub>10</sub> A, impactador <i>Sioutas</i> A, MP <sub>10</sub> B e impactador <i>Sioutas</i> B. ....	44
<b>Figura 19</b> – Imagem do conjunto montado para amostragem na granja de frangos de corte. Da esquerda para direita, coletores MP <sub>1,0</sub> , MP <sub>2,5</sub> , MP <sub>10</sub> e impactador <i>Sioutas</i> .....	45
<b>Figura 20</b> – Cromatogramas (CG-DIC) do monitoramento da formação de A7 (3-hidroxi octadecanoato de metila) da primeira tentativa: a) cromatograma completo; b) ampliação na região dos picos cromatográficos .....	55
<b>Figura 21</b> – Cromatogramas (CG-DIC) do monitoramento da formação de A7 (3-hidroxi octadecanoato de metila) da segunda tentativa: a) cromatograma completo; b) ampliação na região dos picos cromatográficos .....	56
<b>Figura 22</b> – Cromatograma e espectro de massas de A7 (3-hidroxi-octadecanoato de metila) não derivatizado .....	57
<b>Figura 23</b> – Cromatograma e espectro de massas de A7 (3-hidroxi-octadecanoato de metila) derivatizado com BSTFA .....	58
<b>Figura 24</b> – Curva analítica e gráfico de linearidade (razão área/concentração vs. concentração) do 3-OHDES .....	60

<b>Figura 25</b> – Curva analítica e gráfico de linearidade (razão área/concentração vs. concentração) do 3-OHDES.....	60
<b>Figura 26</b> – Curva analítica e gráfico de linearidade (razão área/concentração vs. concentração) do 3-OHTDS.....	61
<b>Figura 27</b> – Curva analítica e gráfico de linearidade (razão área/concentração vs. concentração) do 3-OHHDS.....	61
<b>Figura 28</b> – Curva referência e gráfico de linearidade (razão área/concentração vs. concentração) do 3-OHODS.....	62
<b>Figura 29</b> – Perfil de concentração do MP <sub>10</sub> no interior da lavanderia do Hospital Universitário da UEL (Média A e B). Impactadores <i>Low-vol</i> .....	65
<b>Figura 30</b> – Perfil de concentração do MP <sub>2,5</sub> no interior da lavanderia do Hospital Universitário da UEL (Média A e B). Amostrador ciclone.....	66
<b>Figura 31</b> – Perfil de concentração do MP <sub>1,0</sub> no interior da lavanderia do Hospital Universitário da UEL (Média A e B). Amostrador ciclone.....	67
<b>Figura 32</b> – Distribuição por tamanho do MP no interior da lavanderia do Hospital Universitário da UEL. Impactador de cascata <i>Sioutas</i> (Média A e B). Período de coleta de 24/02 a 03/03 de 2015, única amostragem.....	68
<b>Figura 33</b> – Concentração de MP <sub>10</sub> no interior do galpão de frangos de corte.....	72
<b>Figura 34</b> – Perfil de concentração do MP <sub>2,5</sub> no interior da granja de frangos de corte.....	73
<b>Figura 35</b> – Perfil de concentração do MP <sub>1,0</sub> no interior da granja de frangos de corte.....	74
<b>Figura 36</b> – Distribuição por tamanho do MP no interior da granja de frangos de corte. Impactador de cascata <i>Sioutas</i> . Período de coleta de 09 a 15/06 e 15 a 19/06 de 2015.....	75
<b>Figura 37</b> – Gráfico representativo do percentual de contribuição de cada faixa de tamanho de MP das partículas finas coletadas no impactador <i>Sioutas</i> .....	76
<b>Figura 38</b> – Perfil de concentração de endotoxinas (MP <sub>10</sub> ) no interior da lavanderia do Hospital Universitário da UEL. Impactadores <i>Low-vol</i> (A e B) em paralelo.....	80

<b>Figura 39</b> – Perfil de concentração de endotoxinas (MP <sub>2,5</sub> ) no interior da lavanderia do Hospital Universitário da UEL. Ciclones (A e B) em paralelo .....	81
<b>Figura 40</b> – Perfil de concentração de endotoxinas (MP <sub>1,0</sub> ) no interior da lavanderia do Hospital Universitário da UEL. Ciclones (A e B) em paralelo .....	82
<b>Figura 41</b> – Concentração de endotoxina por faixa de tamanho do MP no interior da lavanderia do Hospital Universitário da UEL. Impactador de cascata <i>Sioutas</i> (A e B) em paralelo. Período de coleta de 24/02 a 03/03 de 2015, única amostragem .....	84
<b>Figura 42</b> – Perfil de concentração de endotoxina no MP <sub>10</sub> no interior da granja de frangos de corte .....	87
<b>Figura 43</b> – Perfil de concentração de endotoxina no MP <sub>2,5</sub> no interior da granja de frangos de corte .....	88
<b>Figura 44</b> – Perfil de concentração de endotoxina no MP <sub>1,0</sub> no interior da granja de frangos de corte .....	89
<b>Figura 45</b> – Distribuição da concentração de endotoxina associada às frações do MP. Distribuição por tamanho do MP utilizando impactador <i>Sioutas</i> . Período de coleta: 09 a 15 de julho e 15 a 19 de julho de 2015. Amostragens realizadas no ar interior do galpão de criação de frangos de corte .....	91
<b>Figura 46</b> – Taxa percentual de endotoxina em relação ao MP nas diferentes frações no ar interior do galpão de frangos de corte.....	93
<b>Figura 47</b> – Taxa percentual de endotoxina em relação ao MP nas diferentes frações coletadas com o impactador <i>Sioutas</i> no ar interior da granja de frangos de corte .....	94

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Dados da faixa de trabalho utilizando padrões 3-HOAG silanizados .....	47
<b>Tabela 2</b> – Dados das concentrações dos 3-OHAG utilizadas no teste recuperação.....	48
<b>Tabela 3</b> – Faixa de trabalho e coeficientes de correlação dos padrões 3-HOAG silanizados .....	59
<b>Tabela 4</b> – Limites de detecção e quantificação para os 3-OHAGS silanizados .....	62
<b>Tabela 5</b> – Porcentagem de recuperação (R) dos 3-OHAG em três níveis de concentração, próximo ao valor inferior, intermediário e máximo da faixa de aplicação do método .....	63
<b>Tabela 6</b> – Dados das concentrações do material particulado encontrados na lavanderia do HU utilizando os amostradores MP <sub>1,0</sub> , MP <sub>2,5</sub> , MP <sub>10</sub> e <i>Sioutas</i> .....	70
<b>Tabela 7</b> – Dados das concentrações do material particulado encontrados na granja de frango de corte utilizando os amostradores MP <sub>1,0</sub> , MP <sub>2,5</sub> , MP <sub>10</sub> e <i>Sioutas</i> .....	78
<b>Tabela 8</b> – Dados das concentrações endotoxinas associada ao material particulado encontrados na lavanderia do HU utilizando os amostradores MP <sub>1,0</sub> , MP <sub>2,5</sub> , MP <sub>10</sub> e <i>Sioutas</i> .....	85
<b>Tabela 9</b> – Dados das concentrações endotoxinas associada ao material particulado encontrados na granja de frango de corte utilizando os amostradores MP <sub>1,0</sub> , MP <sub>2,5</sub> , MP <sub>10</sub> e <i>Sioutas</i> .....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3-OHAG	3-hidróxi ácidos graxos
3-OHDD	3-hidoxi dodecanoato
3-OHED	3-hidoxi decanoato
3-OHEMAG	3-hidroxi ésteres metílicos de ácidos graxos
3-OHHD	3-hidroxi hexadecanoato
3-OHOD	3-hidroxi octadecanoato
3-OHODM	3-hidroxi octadecanoato de metila
3-OHTD	3-hidroxi tetradecanoato
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BioMP	Bioaerossóis
BSTFA	N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CC	Cromatografia clássica
CG	Cromatografia em fase gasosa
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
DECOS	<i>Dutch Expert Committee on Occupational Safety</i>
DIC	Detector de ionização por chama
dp	Diâmetro médio de partícula
EM	Espectrômetro de massas
EU	<i>Endotoxin units</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
HPA	Hidrocarboneto policíclico aromático
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HU	Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina
IL1	Interleucina 1
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
KDO	Ácido cetodesoxioctanoico
LACA	Laboratório de Análises Cromatográficas e Ambientais
LAL	<i>Limulus ameobocyte lysate</i>
LD	Limite de detecção
LPMB	Laboratório de Pesquisa de Moléculas Bioativas
LPS	Lipopolissacarídeo

LQ	Limite de quantificação
MP	Material particulado atmosférico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PM <sub>0,10</sub>	Partículas de tamanho aerodinâmico médio entre que 0,10 µm
PM <sub>0,25</sub>	Partículas de tamanho aerodinâmico médio menores que 0,25 µm
PM <sub>2,5</sub>	Partículas de tamanho aerodinâmico médio menores que 2,5 µm
PM <sub>2,5-10</sub>	Partículas de tamanho aerodinâmico médio entre 2,5 e 10 µm
PQAr	Padrões de qualidade do ar
PTS	Partículas totais suspensas
RMN	Ressonância magnética nuclear
SIMEPAR	Sistema Meteorológico do Paraná
TNF	Fator de necrose tumoral
UEL	Universidade Estadual de Londrina
US-EPA	<i>United States – Environmental Protection Agency</i>
USP	<i>United States Pharmacopeia</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	21
2.1	MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO .....	21
2.2	ENDOTOXINAS .....	24
2.3	JUSTIFICATIVA .....	32
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	33
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>4</b>	<b>EXPERIMENTAL</b> .....	34
4.1	MATERIAIS.....	34
4.1.1	Reagentes, Padrões, Equipamentos e Condições de Análises.....	34
4.1.2	Tratamento dos Filtros.....	35
4.1.3	Análises Gravimétricas .....	36
4.1.4	Amostradores .....	36
4.2	MÉTODOS.....	39
4.2.1	Síntese do 3-Hidroxi Octadecanoato de Metila (3-OHODM) .....	39
4.2.2	Amostragem .....	42
4.2.3	Determinação de Endotoxinas.....	45
4.2.4	Estimativas de Figuras de Mérito .....	47
4.2.4.1	Exatidão.....	47
4.2.4.2	Linearidade.....	48
4.2.4.3	Limite de detecção .....	49
4.2.4.4	Limite de quantificação .....	50
4.2.4.5	Sensibilidade .....	51
4.2.5	Razão LPS/MP .....	51
<b>5</b>	<b>RESULTADO E DISCUSSÃO</b> .....	52
5.1	SÍNTESE DO 3-OH OCTADECANOATO DE METILA .....	52
5.1.1	Purificação e Monitoramento do Produto Formado .....	52

5.2	ESTIMATIVA DE FIGURAS DE MÉRITO.....	58
5.2.1	Curva Analítica e Cálculos dos Limites.....	58
5.2.2	Ensaio de Recuperação dos Analitos 3-OHAG .....	62
5.3	DISTRIBUIÇÃO POR TAMANHO DE PARTÍCULA DO MATERIAL PARTICULADO EM AMBIENTE INTERNO .....	63
5.3.1	Lavanderia do Hospital Universitário da UEL .....	63
5.3.2	Granja de Frangos de Corte .....	71
5.4	ENDOTOXINA ASSOCIADA AO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO.....	79
5.4.1	Lavanderia do Hospital Universitário da UEL .....	79
5.4.2	Granja de frangos de Corte .....	86
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>96</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>98</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>114</b>
	ANEXO A – Certificado dos cinco padrões dos 3-hidroxiácidos ácido graxos utilizados .....	115
	ANEXO B – Planta da lavanderia do HU, compreendendo todas as áreas .....	120
	ANEXO C – Espectro no infravermelho do intermediário a2 (Ácido de Meldrum) e do obtido no Spectral Database for Organic Compounds (SDBS) .....	121
	ANEXO D – Cromatograma (CG-DIC) do intermediário A6 (10,9 min) e subproduto (11,1 min) formados na quarta etapa .....	124
	ANEXO E – Cromatograma (CG-DIC) do padrão de palmitato de metila com tempo de retenção em 11,0 min .....	125
	ANEXO F – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H e de <sup>13</sup> C do intermediário a6 .....	126
	ANEXO G – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C do produto a7 purificado por CC.....	131
	ANEXO H – Perfil agrupado das concentrações de micotoxinas associadas aos três tamanhos de material particulado (MP <sub>10</sub> , MP <sub>2,5</sub> , MP <sub>1,0</sub> ).....	136

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 7 milhões de pessoas podem ter morrido em função da poluição atmosférica somente no ano 2012. Ainda segundo a OMS, o material particulado atmosférico (MP) grosso e fino, são responsáveis por milhares de mortes prematuras todo ano (FAJERSZTAJN et al., 2013; WHO 2014; WHO 2016).

As primeiras preocupações do MP como poluente ambiental se deram em função da queima ineficiente de carvão na indústria e no aquecimento doméstico. Contudo, nas últimas décadas novas fontes emissoras e a capacidade em medir e caracterizar partículas na atmosfera evoluiu do material particulado total ( $dp < 100 \mu\text{m}$ ) ao particulado fino ( $dp < 2,5 \mu\text{m}$ ). Mais recentemente, passou-se a estudar as partículas em uma faixa de tamanho ainda mais restrito, a qual é denominada ultrafina (BRUNSHIDLE et al., 2003).

O material particulado pode ser classificado considerando seu tamanho aerodinâmico médio. Dessa forma, partículas com diâmetro aerodinâmico médio no intervalo de 2,5 a 10  $\mu\text{m}$  são classificadas com partículas inaláveis grossas ( $MP_{2,5-10}$ ) e inferiores a 2,5  $\mu\text{m}$  são partículas finas ou respiráveis ( $MP_{2,5}$ ). Em considerações mais atuais partículas com tamanho aerodinâmico inferior a 0,25  $\mu\text{m}$  são classificadas como quase-ultrafinas ( $MP_{0,25}$ ) e ultrafinas ( $MP_{0,1}$ ) partículas com tamanho inferiores a 0,1  $\mu\text{m}$  (BAIRD 2012; MINGUILLÓN et al., 2008). O diâmetro aerodinâmico depende da densidade da partícula e corresponde ao tamanho de uma esfera de densidade de 1  $\text{g cm}^{-3}$  com as mesmas características aerodinâmicas. As partículas com o mesmo tamanho e forma, mas diferentes densidades, possuem diferentes diâmetros aerodinâmicos (FIERRO, 2000; WHO, 2014).

As agências que regulamentem, monitoram e fiscalizam as emissões atmosféricas, a exemplo da *Environmental Protection Agency (EPA)* e outras, normalmente monitoram as concentrações das partículas com tamanho aerodinâmico  $< 2,5 \mu\text{m}$  e  $< 10 \mu\text{m}$ ,  $MP_{2,5}$  e  $MP_{10}$  respectivamente (HEI PERSPECTIVES, 2002). Embora o  $MP_{10}$  seja encontrado em maior concentração no ar ambiente em relação ao  $MP_{2,5}$ , a capacidade de penetrar nas regiões pulmonares responsáveis pelas trocas gasosas é de aproximadamente 1 %, enquanto o  $MP_{2,5}$  é entorno de 80 % (US-EPA, 2012).

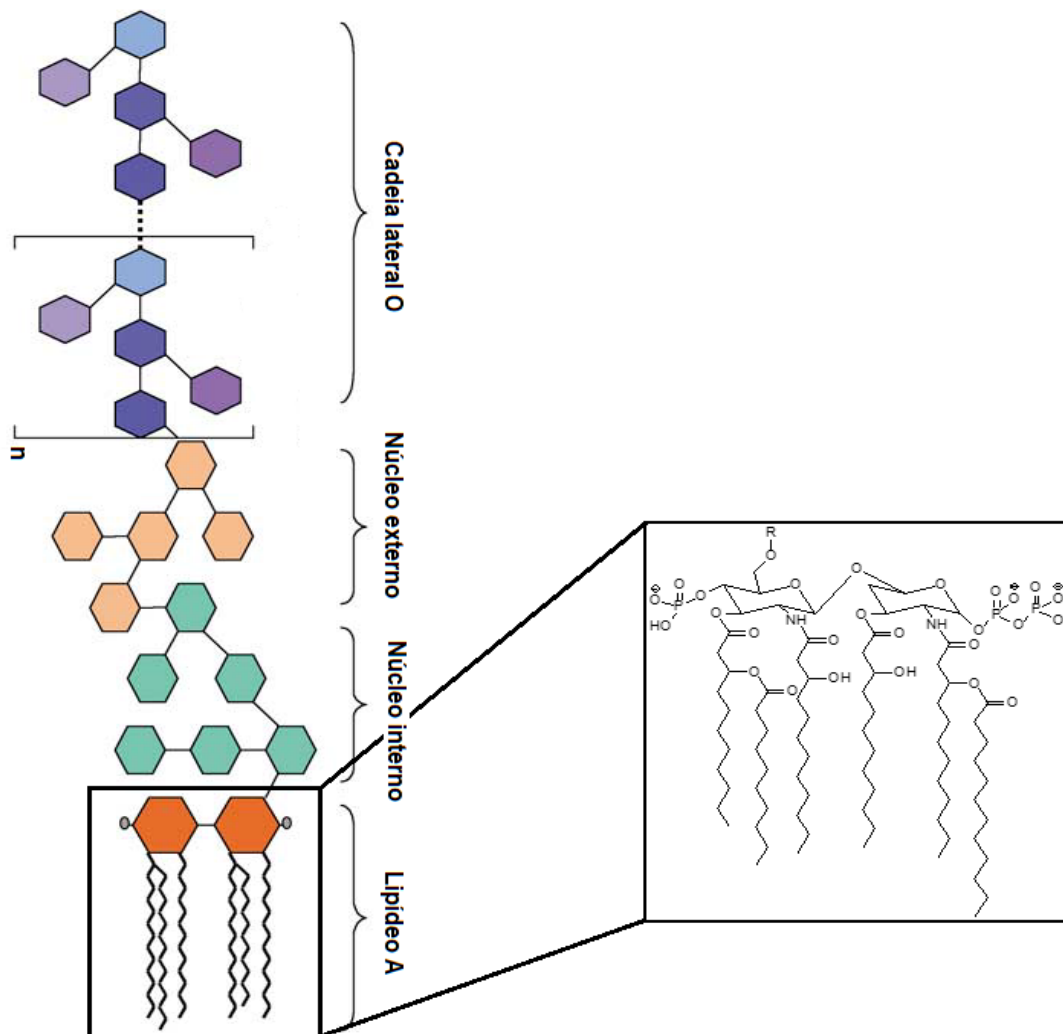
O potencial do MP em causar danos à saúde humana depende principalmente da região do trato respiratório onde é depositado e sua composição. A composição do MP depende do local e da fonte geradora, e pode ser bastante variada. Bioaerossóis (BioMP), por exemplo, são de origem biológica e predominantemente compostos de pólen de plantas, microrganismos (fungos e bactérias), metabólitos ou fragmentos microbianos. Os BioMP podem ser classificados por tipo ou componente. As endotoxinas, fragmentos microbianos, são os principais contaminantes orgânicos dos BioMP (SIMPSON et al., 1999; HARRISON et al., 2008; POPE et al., 2006; MENETREZ et al., 2000; MENETREZ et al., 2001).

Endotoxina, um lipopolissacarídeo (LPS), é um componente importante que está localizado na parte externa da membrana externa das bactérias gram-negativas. Essa macromolécula é composta por uma molécula de lipídio conhecido como lipídio A, e uma cadeia de polissacarídeo chamada de antígeno-O que é parcialmente extracelular (LIN; LOWRY, 1998).

O componente lipídico do LPS é composto inteiramente de ácidos graxos, com variação de tamanho da cadeia carbônica, normalmente de C<sub>10</sub> a C<sub>22</sub>, como representado na figura 1 (ELIN; WOLFF, 1976).

As endotoxinas podem ter diversas ações no organismo humano. São prototípicos ativadores de células do sistema imunológico, sistemas inflamatórios e iniciam as mudanças sistêmicas, o que é conhecido como choque séptico. A endotoxemia, hipertensão pulmonar, é o resultado da constrição de artérias pulmonares durante a fase inicial (GLAUSER et al., 1991; LAMBERMONT et al., 1999). A injeção de LPS provoca febre entre 60 a 90 minutos, e leucopenia precoce seguida da leucopenia secundária, também provoca hipoglicemia com o aumento da glicólise na grande maioria das células. Outro fato que pode ocorrer com a injeção de LPS é a ativação da via alternativa da cascata do complemento promovendo a anafilatoxinas, respostas quimiotáticas, lesão da membrana além da queda dos níveis séricos (BROOKS et al., 2012). A coagulação intravascular disseminada (CID), pode ser acionada pelo LPS numa sequência de eventos que culmina na produção de uma enzima proteolítica (plasmina), com capacidade de firmar agentes que degradam a fibrina. A necrose hemorrágica ou isquêmica, provocada pela adesão das plaquetas ao endotélio vascular e a oclusão dos vasos sanguíneos pequenos, é do mesmo modo, provocada pela ação de endotoxina (BROOKS et al., 2012; MIMS et al., 1999).

**Figura 1** – Representação esquemática da expansão da parte lipídica da endotoxina, evidenciando os ésteres de ácidos graxos.



**Fonte:** Adaptado de Erridge, Bennett-Guerrero e Poxton (2002)

Existem muitos relatos na literatura reportando a exposição de trabalhadores aos níveis de concentração de endotoxinas no ar ambiente, e possíveis danos à saúde que essa exposição possa acarretar (MEHTA et al., 2008; KIRYCHUK et al., 2010; SIMPSON et al., 1999). No entanto, existem poucos estudos na literatura relatando sobre o tamanho do MP relacionado com a concentração de endotoxinas, e não foi encontrado uma relação de proporcionalidade de LPS por MP. Dessa forma, nesse estudo foi investigada a relação de distribuição desse BioMP e o material particulado atmosférico nas frações fina e grossa  $MP_{1,0}$  ( $< 1,0 \mu m$ ),  $MP_{2,5}$  ( $< 2,5 \mu m$ ),  $MP_{10}$  ( $< 10 \mu m$ ) e cinco faixas de tamanho ( $> 10 \mu m$ ; 2,5 a  $10 \mu m$ ; 1,0 a  $2,5 \mu m$ ; 0,5 a  $1,0 \mu m$ ; 0,25 a  $0,5 \mu m$  e  $< 0,25 \mu m$ ). Os amostradores utilizado para coleta do MP foram

impactador MP10 *Low-vol* ZUF (Universidade de *Frankfurt* – Alemanha), ciclones *Teflon*® *Coated Aluminum Cyclones* MP<sub>2,5</sub> URG-2000-30EH e MP<sub>1,0</sub> URG-2000-30EHB (URG Corporation) e *Personal Cascade impactor* (SKC Inc.).

Para validação da metodologia na determinação das endotoxinas há a necessidade de padrões analíticos. Comercialmente, estas substâncias têm custo elevado e nem sempre de fácil acesso. Sendo assim, é proposto inicialmente uma rota sintética com o objetivo de obter padrões com menor custo e maior acessibilidade.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO

As partículas suspensas no ar ambiente são chamadas de material particulado atmosférico (MP). Estas partículas podem ser formadas por uma variedade de constituintes químicos na forma sólida ou líquida. A composição do MP está relacionada basicamente a duas características, fonte formadora e tamanho da partícula. Normalmente a composição de partículas grossas são atribuídas às fontes naturais como *spray* marinho e ressuspensão do solo. Já as partículas finas são resultantes de ações antrópicas como queima de combustíveis, processos industriais, tráfego veicular, entre outros (BAIRD, 2002; US-EPA, 2016; GRIFFIN, 2013).

A classificação do MP é feita em relação ao seu tamanho aerodinâmico, usualmente dado em micrometros ( $\mu\text{m}$ ). Dessa forma, há partículas classificadas em grossas, cujo tamanho aerodinâmico é menor que  $10 \mu\text{m}$  ( $\text{MP}_{10}$ ); partículas finas, quando o tamanho aerodinâmico da partícula é menor que  $2,5 \mu\text{m}$  ( $\text{MP}_{2,5}$ ); e mais recentemente as ultrafinas, quando as partículas têm tamanho aerodinâmico menores que  $0,10 \mu\text{m}$  ( $\text{MP}_{0,1}$ ). Outra classificação bastante utilizada é a que relaciona o potencial do MP em causar efeitos nocivos à saúde. Com isso, de acordo com essa classificação, há partículas inaláveis, quando as partículas possuem tamanho aerodinâmico entre  $2,5$  e  $10 \mu\text{m}$  ( $\text{MP}_{2,5-10}$ ) e partículas respiráveis, quando o tamanho aerodinâmico da partícula é menor que  $2,5 \mu\text{m}$  ( $\text{MP}_{<2,5}$ ). A figura 2 apresenta uma perspectiva de tamanho de partícula (BAIRD, 2002; US-EPA, 2016; OSHA, 2015).

**Figura 2** – Representação esquemática do tamanho do material particulado grosso (MP10) e fino (MP2,5)

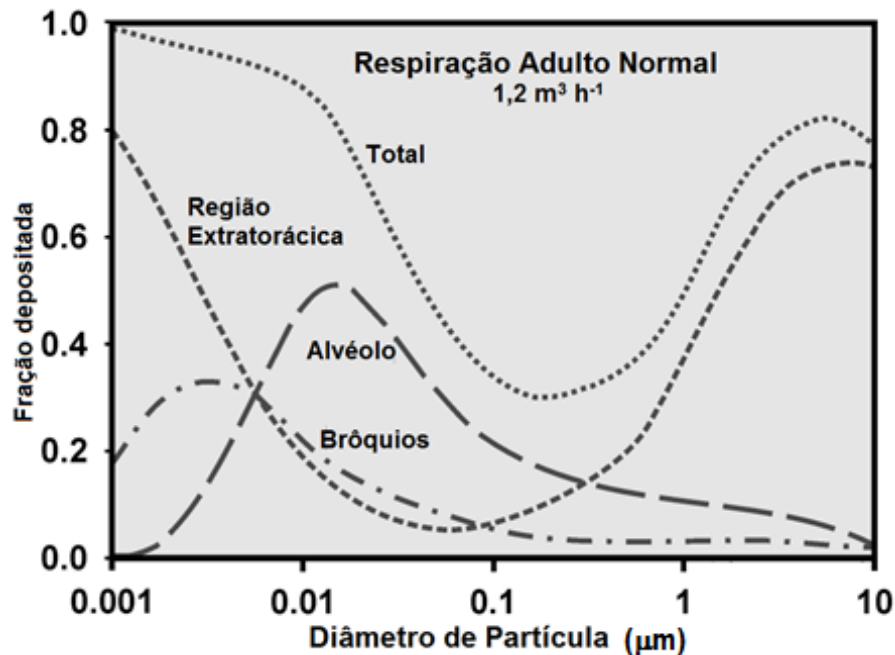


Fonte: US-EPA (2016)

O MP tem grandes impactos em materiais, como construções e monumentos, e também na saúde humana. Quando o MP é analisado em relação aos efeitos prejudiciais à saúde humana dois aspectos muito importantes devem ser levados em consideração, o tamanho do MP e composição desse MP (US-EPA, 2008; KROLL et al., 2013)

O tamanho do MP está relacionado com capacidade de penetração no trato respiratório humano, e potencial em afetar a saúde humana dependendo desse alcance. A exemplo disso, De Vizcaya-Ruiz et al. (2006) constataram em suas pesquisas *in vitro* que, além da concentração, o tamanho da partícula também influenciava diretamente na toxicidade das células. Alguns estudos, reportados por Hussain, Madl e Khan (2011), demonstram que partículas de menor tamanho aerodinâmico possuem maior taxa de deposição nos brônquios e alvéolos pulmonares, ou seja, essas partículas podem acessar regiões mais profundas do trato respiratório humano. A figura 3 ilustra como cada região do trato respiratório humano é impactado por determinada faixa de tamanho aerodinâmico de partícula.

**Figura 3** – Representação esquemática da deposição por tamanho de partículas em três regiões do trato respiratório humano



**Fonte:** adaptado Hussain, Madl e Khan (2011)

A composição do MP é outro aspecto que pode aumentar seu potencial em afetar a saúde. Nesse sentido, alguns trabalhos buscam caracterizar a composição do MP em relação à composição química: metais, sais, hidrocarboneto policíclico aromático (HPA), etc. em ar ambiente aberto ou fechado (FREITAS; SOLCI, 2009; PINTO et al., 2014a; KRUGLY et al., 2014; MOHIUDDIN et al., 2014).

Agências de regulamentação nacionais estabelecem valores de exposição ao MP para definir a qualidade do ar ambiente, visando garantir parâmetros que sejam menos nocivos à saúde humana, com isso, é importante investigar locais com potencial de formação de MP. O Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) estabelece como padrões de qualidade do ar (PQAr) a concentração de  $80 \mu\text{g m}^{-3}$  de média geométrica anual, não podendo exceder mais de uma vez ao ano em um período de médio de 24 horas a  $240 \mu\text{g m}^{-3}$ , pertinente a partículas totais suspensas (PTS). Já para partículas inaláveis ( $\text{PM}_{10}$ ), esses valores são de  $50 \mu\text{g m}^{-3}$  para média aritmética anual e  $150 \mu\text{g m}^{-3}$  para um período médio de 24 horas (CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE, 2015).

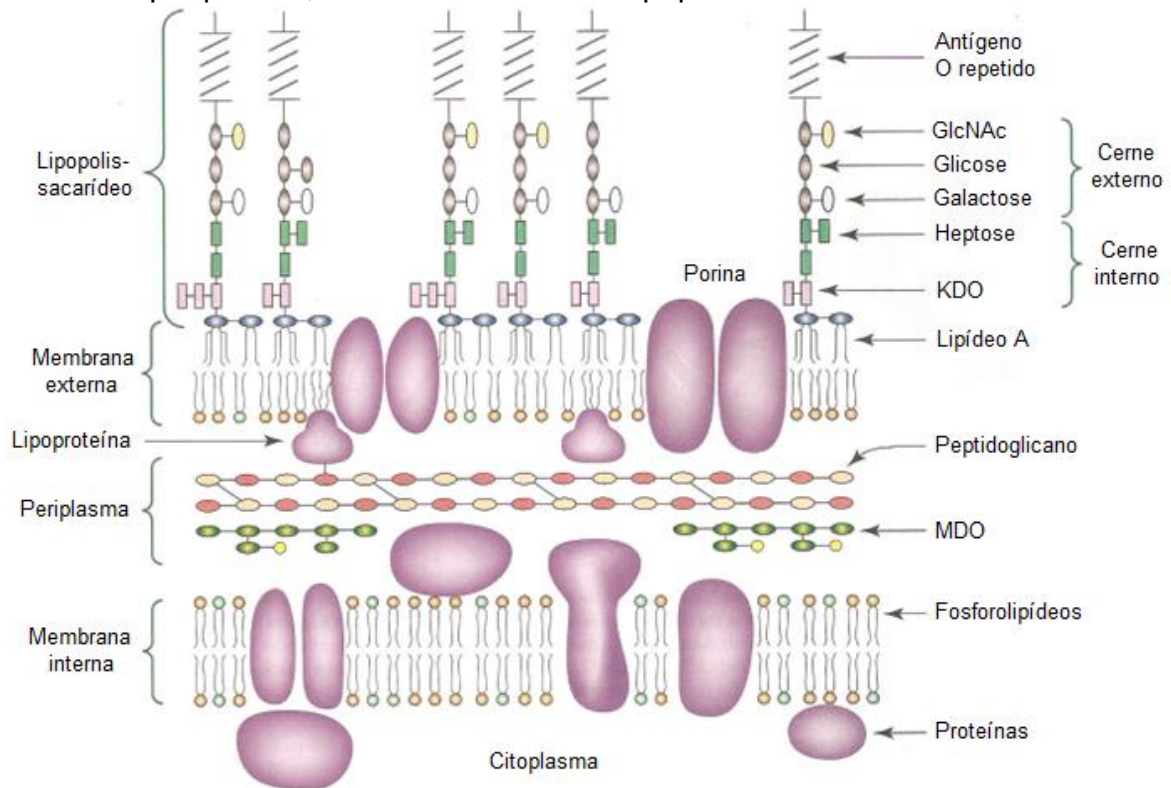
A Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB) instituiu os mesmos valores de PQAr estabelecidos pelo CONAMA referentes a PTS. No entanto,

as concentrações para  $MP_{10}$  são mais restritiva, sendo  $40 \mu\text{g m}^{-3}$  de média aritmética anual e  $120 \mu\text{g m}^{-3}$  para um período médio de 24 horas. Além desses dois parâmetros, a CETESB também estabelece como PQAr o  $MP_{2,5}$ , nesse caso as concentrações são de  $20 \mu\text{g m}^{-3}$  de média aritmética anual e de  $60 \mu\text{g m}^{-3}$  para um período média de 24 horas (CETESB, 2015).

## 2.2 ENDOTOXINAS

As endotoxinas ou lipopolissacarídeos (LPS) são constituintes da parede celular externa bacteriana. Bastante tóxico aos animais, o LPS também é chamado de endotoxina das bactérias, por estarem fortemente ligadas à superfície celular das bactérias Gram-negativas (Figura 4). Sintetizado sobre a membrana citoplasmática, o LPS é transferido até a membrana externa da célula. Este constituinte confere certa resistência às grandes moléculas de antibióticos de adentrarem a membrana externa das bactérias Gram-negativas (BROOKS et al., 2012; MIMS et al., 1999).

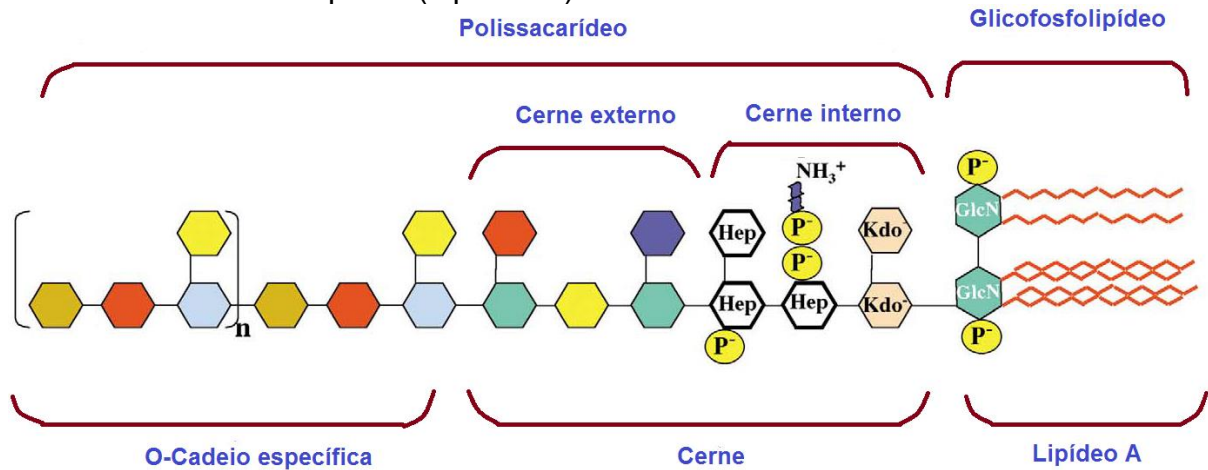
**Figura 4** – Esquema representativo do invólucro da célula de uma bactéria Gram-negativa e suas quatro regiões (camadas) distintas. A membranas interna, periplasma, membrana externa e lipopolissacarídeo



**Fonte:** Adaptado Brooks et al. (2012)

Toda endotoxina é composta basicamente por três partes, antígeno O, cerne (interno e externo) e lipídio A (Figura 5). O antígeno O é a repetição de unidades de carboidrato e recobre toda membrana externa excluindo componentes hidrofóbicos, também é o responsável pelo caráter antigênico do LPS. Todas as bactérias gram-negativas possuem o cerne semelhante contendo os açúcares heptose e ácido cetodesoxioctanoico (KDO) (BROOKS et al., 2012; COX; PERRY, 1996; CHATTERJEE; CHAUDHURI, 2012; MIMS et al., 1999).

**Figura 5** – Representação ilustrativa das duas principais estruturas que compõem a endotoxina e suas subdivisões: Cadeia Polissacarídica contendo cerne (interno e externo) e cadeia polissacarídica específica (antígeno-O); Glicofosfolipídeo (Lipídeo A)



**Fonte:** Adaptado Caroff et al. (2002)

As unidades de dissacarídeos de glicosamina fosforilada formam o lipídeo A, a esse estão ligados ácidos graxos de cadeia longa. A variabilidade desses ácidos depende da espécie de bactéria. No entanto, os  $\beta$ -hidroxiácidos (3-hidroxiácidos graxos) são comuns a todas as endotoxinas, o  $\beta$ -hidroximirístico (C14) é exclusivo e sempre presente nesse lipídio (BROOKS et al., 2012; RIETSCHEL, 1976; WOLLENWEBER et al., 1980).

Independentemente da origem bacteriana, os efeitos fisiopatológicos das endotoxinas são semelhantes. Uma vez dentro da corrente sanguínea, as endotoxinas agem inicialmente ligando-se a proteínas circulantes, na sequência interagem com os receptores que estão nos macrófagos, monócitos e outras células do sistema reticuloendotelial. Como isso pode haver a liberação da interleucina 1 (IL1), do fator de necrose tumoral (TNF) e da cascata do complemento. Como consequência, pode ocorrer hipotensão e choque, leucopenia, hipoglicemia, febre, acarretando no comprometimento da perfusão de órgãos essenciais como rim, cérebro, coração, morte celular entre outros (BROOKS et al., 2012; MIMS et al., 1999).

A exposição crônica a endotoxinas também pode apresentar efeitos adversos à saúde. Estudos realizados por Kang et al. (2013) demonstraram haver uma relação entre a concentração de endotoxinas no plasma sanguíneo e inflamação com maior risco de edemas colaterais. Gallagher et al. (2012) apontaram, em seu trabalho, uma

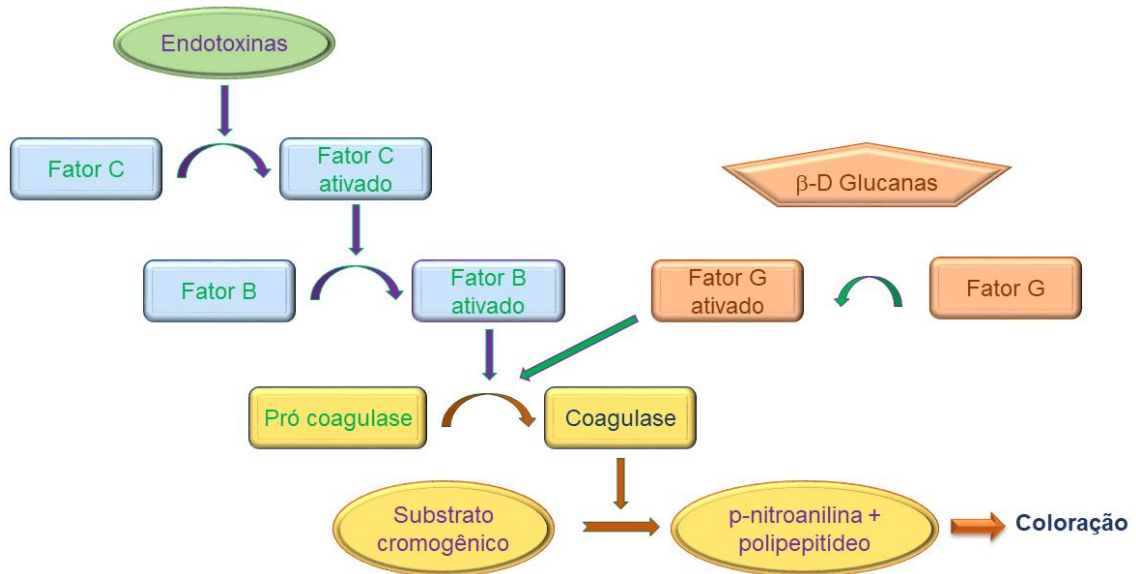
possível relação entre mortalidade por doenças cardiovasculares de trabalhadoras da indústria têxtil e exposição crônica de LPS. Alfaro-Moreno et al. (2007) investigaram que LPS associado ao MP<sub>10</sub> pode ter função na ativação células endoteliais.

A liberação de endotoxina na forma livre para o ambiente pode ocorrer durante crescimento das bactérias Gram negativas, mas a contribuição mais significativa é com a lise da célula após a morte desse microrganismo. Uma vez livre a endotoxina pode ser encontrada em variados tipos de ambientes como fluidos de diálise, água potável, instrumentação medicocirúrgica e principalmente em ar ambiente associada ao MP (ABDULRAHEEM, et al., 2012; HUNTINGTON, et al., 2007; KULANDER, et al., 1993; MASAKANE, et al., 2013; MENETREZ, et al., 2009; MITRA, 2014).

A determinação de endotoxina, em diferentes matrizes, usualmente é feita pela técnica que emprega o lisado extraído do caranguejo ferradura *Limulus polyphemus*, denominada de ensaio *Limulus ameobocyte lysate* (LAL). Esse ensaio consiste essencialmente no processo de coagulação da hemolinfa promovida por uma série de reações enzimáticas em cascata quando em presença de LPS (Figura 6). Nas avaliações qualitativas as amostras são colocadas em contato com os reagentes do ensaio, e quando há formação de um gel pode ser indicativo da presença de endotoxinas (HURLEY, 1995; RYLANDER, 2012).

No caso de análises quantitativas as amostras também entram em contato com os reagentes do ensaio LAL, mas este agora possui um substrato cromogênico que é liberado para o meio durante as reações caso haja endotoxina. Desse modo, a presença de LPS pode ser detectada e quantificada por espectrofotometria. A capacidade de detecção de endotoxina por essa técnica bastante baixa, na ordem de pico gramas por mililitro ( $10^{-12}$  g mL<sup>-1</sup>) (HURLEY, 1995; RYLANDER, 2012).

**Figura 6** – Esquema representativo das reações em cascata de LAL desencadeadas na presença de endotoxinas. As glucanos também podem levar ao mesmo resultado por outra via



**Fonte:** adaptado de Duquenne, Marchand e Duchaine (2013)

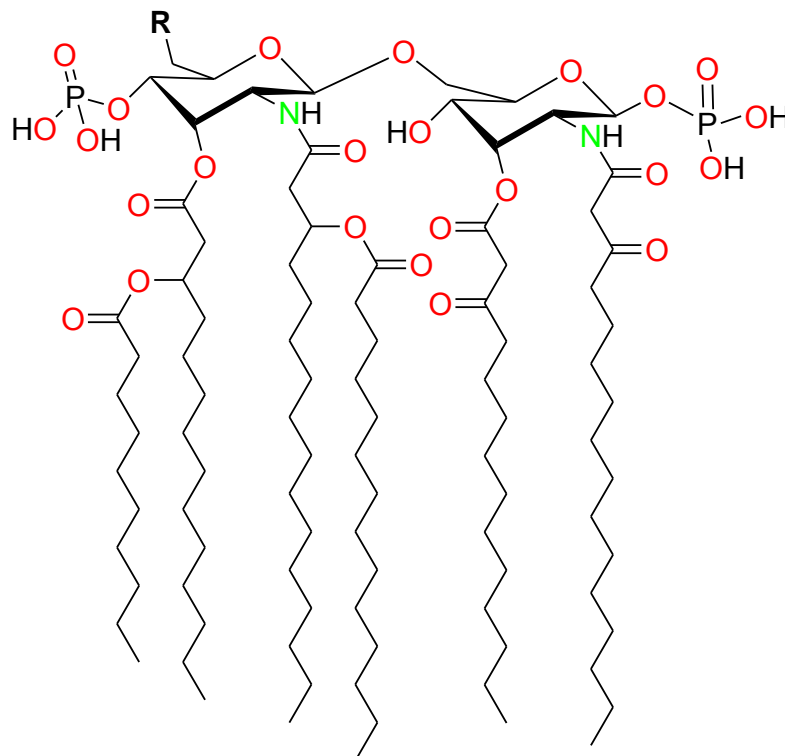
Algumas agências regulatórias internacionais como *United States Pharmacopeia* (USP) e *Food and Drug Administration* (FDA), recomendam o ensaio LAL para determinação de endotoxinas em diferentes matrizes. Entretanto, há relatos na literatura apontando para uma série potenciais interferentes que podem ocorrer quando esse ensaio é utilizado para determinação de LPS em material particulado.

Esses interferentes podem estar relacionados a estrutura da endotoxina. Esses fatores estruturais comprometem a eficiência das reações enzimáticas em cascata, que por sua vez afetam na correta detecção e quantificação das endotoxinas. Entre os fatores que afetam interação enzima substrato estão a capacidade de formar micelas em solução aquosa, a alta capacidade de adsorção em superfícies, a diversidade de estruturas das endotoxinas, estar associada a fragmentos da célula bacteriana, entre outras. Os interferentes também podem estar relacionados a reação do ensaio LAL. Por exemplo, fatores físico-químicos como pH e temperatura, contaminação por  $\beta$ -D-glucanas (falso positivo), o tempo da reação em ensaio cinético, entre outros (DUQUENNE; MARCHAND; DUCHAINE, 2013).

Outras técnicas vêm sendo estudadas com o objetivo de contornar esses interferentes. Algumas das técnicas exploradas com essa finalidade são a cromatografia em fase gasosa (CG), os biossensores por impedância, as células

receptoras e eletroquímicas, cisteamina modificada com nanopartículas de ouro, entre outras (PETERS; FRITZ; BUFE, 2012; SU et al., 2012; SUN et al., 2012; ZUZUARREGUI et al., 2014). A cromatografia em fase gasosa acoplada a diferentes tipos de detectores está um pouco mais estabelecida. A utilização de CG para análises de endotoxinas é baseada nos 3-OH ácidos graxos que estão ligados no lipídeo A das endotoxinas (Figura 7). Por estarem sempre presentes nas endotoxinas e serem sempre quatro unidades, esses ácidos graxos podem ser utilizados como biomarcadores na determinação de endotoxinas. Embora a técnica cromatográfica neste caso seja menos sensível que a enzimática LAL, a grande maioria dos interferentes que são inerentes ao ensaio LAL não o são quando a técnica cromatográfica é empregada (BINDING et al., 2004; LEE et al., 2004; SARAF et al., 1997).

**Figura 7** – Ilustração genérica da estrutura química do lipídeo A, constituinte da endotoxina



**Fonte:** Adaptado de Costerton, Ingram e Cheng (1974)

A endotoxina associada ao MP pode estar presente em ar ambiente externo e interno em áreas urbanas, rurais e seguimentos industriais (DEGOBBI et al., 2011;

GUAN et al., 2014; MENETREZ et al., 2009; PAVILONIS et al., 2013; SPAAN et al., 2006).

Os estudos sobre a presença de endotoxinas no ar ambiente em áreas urbanas são bastantes variados. Degobbi et al. (2011) avaliaram a relação da variação de temperatura e umidade relativa com as concentrações de endotoxinas associadas ao MP<sub>2,5</sub>, nesse estudo foi possível observar que a variação de temperatura possui maior influência nas concentrações de LPS e pouco influenciada pela variação da umidade relativa. Nilsson, Merritt e Bellander (2011) avaliaram a influência do tráfego veicular e os parâmetros meteorológicos, umidade relativa e temperatura, na concentração de LPS associada ao MP<sub>2,5</sub> e MP<sub>10</sub>, as concentrações encontradas foram de 0,005 a 0,064 EU m<sup>-3</sup> (0,0004 e 0,0053 ng m<sup>-3</sup>, respectivamente) para MP<sub>2,5</sub> de 0,020 a 0,107 EU m<sup>-3</sup> (0,0017 e 0,0089 ng m<sup>-3</sup>, respectivamente) para MP<sub>10</sub>, os parâmetros por eles avaliados parecem não influenciar na concentração de LPS. Já Morgenstern et al. (2005) relataram baixa variação espacial de endotoxinas coletadas em vários locais em Munique.

Nos estudos de diferentes ambientes urbanos e rurais (estação de trem, píer, área siderúrgica, áreas agrícolas, vias de tráfego leve e pesado) realizados por Strak et al. (2011) sobre endotoxinas associadas a MP<sub>2,5-10</sub> e MP<sub>10</sub>, não verificaram correlação entres os parâmetros avaliados e as concentrações de endotoxinas, embora tenha constatado que as áreas rurais possuem níveis mais elevados de endotoxinas. Madsen et al. (2009) avaliaram dois ambientes (interno e externo) de LPS associado ao MP em plantações de pepino e tomate em estufas, níveis superiores de LPS foram encontrados em ambiente interno em ambas as culturas (0,4 a 400 ng m<sup>-3</sup>), eles também identificaram que as folhas das plantas (tomate e pepino) podem ser locais de armazenamento de LPS. Simpson et al. (1999) avaliaram os níveis de LPS em ambientes de diversas atividades industriais como produção de cogumelos, suinocultura, avicultura, moinhos de produção de farinhas, tecelagens entre outros. O'Shaughnessy et al. (2012) pesquisaram a incidência de endotoxinas associadas ao MP em setores de processamento de suínos. O intervalo de concentração encontrado para concentração de endotoxinas foi de 1195 a 84357 EU m<sup>-3</sup> (100 e 7030 ng m<sup>-3</sup>, respectivamente).

Dois diferentes ambientes, criação de aves e suínos, e concentrações de endotoxinas associadas a duas frações de MP (MP<sub>10</sub> e MP<sub>2,5</sub>) foram estudados por

Yang, Wang e Zhang (2014), eles encontraram diferença significativa entre as duas frações de MP estudadas, em MP<sub>10</sub> a variação da concentração de endotoxinas foi de 36,1 a 3572 EU m<sup>-3</sup> (3,0 a 298 ng m<sup>-3</sup>, respectivamente), sendo as mais elevadas, já em MP<sub>25</sub> houve uma variação de 6,3 a 605,7 EU m<sup>-3</sup> (0,5 a 50 ng m<sup>-3</sup>, respectivamente), no entanto, não observaram diferença significativas entre os dois tipos de criação animal. A investigação realizada por Radon et al. (2002) sobre endotoxinas associada ao PM<sub>10</sub> em estufa vegetais e ambiente de criação de aves encontraram concentrações médias de endotoxinas de 0,36 ng m<sup>-3</sup> em estufas vegetais e 257,58 ng m<sup>-3</sup> em ambiente de criação de aves. Lawniczek-Walczyk et al. (2013) encontraram ampla variação na concentração de endotoxinas (0,04 ng m<sup>-3</sup> a 4372 ng m<sup>-3</sup>) em diferentes estágios da produção de aves e diferentes estações do ano, as maiores concentrações de endotoxinas foram observadas no verão e nos últimos dias de vida das aves (próximo ao abate). Huneau-Salaün et al. (2011) avaliaram a presença de LPS associado ao MP em ambiente de criação de aves (galinhas) poedeiras em sistemas de gaiolas e sistema alternativos (convencionais), também avaliaram o efeito da sazonalidade. Os dois sistemas apresentaram diferença significativa, no sistema convencional a variação na concentração de LPS foi de 35 a 3156 EU m<sup>-3</sup> (2,92 e 263 ng m<sup>-3</sup>, respectivamente), enquanto no sistema de gaiolas a variação da concentração de LPS foi de 78 a 576 EU m<sup>-3</sup> (6,5 a 48 ng m<sup>-3</sup>, respectivamente). Porém, não foram encontradas diferenças significativas em relação a sazonalidade.

Estudos em diferentes repartições (recepção, sala de cirurgia, consultório, UTI, etc.) e diversos indivíduos (estudantes e trabalhadores) em hospital veterinário, foram realizados por Samadi et al. (2010) para investigar a exposição a endotoxinas. A exposição mais elevada a endotoxinas ocorreu com estudantes do curso prático em manipulação de animais, sendo de 75 EU m<sup>-3</sup> (6,3 ng m<sup>-3</sup>), já a repartição com maior contaminação por área foi a enfermaria com 24211 EU m<sup>-2</sup> (2017 ng m<sup>-2</sup>). Singh et al. (2010) avaliaram a presença de endotoxinas em MP em diferentes clínicas odontológicas. A concentração mínima encontrada foi de 0,1 EU m<sup>-3</sup> (0,008 ng m<sup>-3</sup>) no setor clínico e máximo de 555,9 EU m<sup>-3</sup> (46,3 ng m<sup>-3</sup>) no laboratório.

O trabalho desenvolvido por Coggins et al. (2012) é um dos poucos trabalhos existente que abordam a presença de endotoxina associada ao MP por tamanho de partículas. Eles investigaram a concentração de LPS em ar ambiente de clínicas

pediátricas para seis faixas de tamanho MP: estágio 1 ( $> 7 \mu\text{m}$ ), estágio 2 ( $4,7 - 7,0 \mu\text{m}$ ), estágio 3 ( $3,3 - 4,7 \mu\text{m}$ ), estágio 4 ( $2,1 - 3,3 \mu\text{m}$ ), estágio 5 ( $1,1 - 2,1 \mu\text{m}$ ) e estágio 6 ( $0,65 - 1,1 \mu\text{m}$ ). Variação na concentração de endotoxinas foi de 0,5 a 32,6 EU  $\text{m}^{-3}$  ( $0,042$  e  $2,72 \text{ ng m}^{-3}$ , respectivamente), as maiores concentrações de LPS foram encontradas no estágio 5 ( $1,1 - 2,1 \mu\text{m}$ ).

### 2.3 JUSTIFICATIVA

Considerando que, em condições normais, LPS encontra-se amplamente distribuído em toda faixa de tamanho de material particulado. Em ar externo, por exemplo, endotoxina tem sido detectada nas frações  $\text{MP}_{2,5}$  e  $\text{MP}_{10}$ , com predominantemente na fração grossa (TRAVERSI et al., 2011). Novas investigações sobre o perfil das concentrações de endotoxinas no ar ambiente devem ser realizadas. Essas investigações acarretam em importantes contribuições para entendimento do ar ambiente impactado. Deve ser considerado que, no Brasil existe poucos relatos na literatura sobre endotoxinas no ar ambiente.

### 3 OBJETIVOS

Avaliara endotoxina associada ao material particulado em dois ambientes laborais, lavanderia do hospital universitário e granja de frango de corte utilizando técnica de cromatografia a gás.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar concentração de endotoxina associada ao material particulado atmosférico na lavanderia do Hospital Universitário e na granja de frangos de corte;

Avaliar concentração de material particulado atmosférico nestes dois ambientes (Lavanderia do HU e granja);

Estudar distribuição da concentração por tamanho do material particulado utilizando amostradores MP<sub>10</sub>, MP<sub>2,5</sub>, MP<sub>1,0</sub> e *Sioutas*;

Investigar distribuição da concentração de endotoxinas por tamanho do material particulado utilizando amostradores MP<sub>10</sub>, MP<sub>2,5</sub>, MP<sub>1,0</sub> e *Sioutas*;

Pesquisar a relação entre massa de endotoxina por massa de material particulado (Taxa LPS/MP);

Propor rota sintética para produção acessível e de baixo custo para 3-hidroxi ácidos graxos, biomarcadores de endotoxinas utilizados em cromatografia a gás.

## 4 EXPERIMENTAL

As amostragens foram realizadas no Hospital Universitário (HU) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e no interior de uma granja de frangos de corte, ambos localizados na cidade de Londrina, Paraná. Todos processos de tratamento e análises das amostras foram realizados no Laboratório de Análises Cromatográficas e Ambientais (LACA). O desenvolvimento da proposta de síntese para o 3-OH ácido graxo foi realizada em parceria com Laboratório de Pesquisa de Moléculas Bioativas (LPMBA). Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos no Laboratório Multiusuário de Espectroscopia. Todos localizados na Universidade Estadual de Londrina Paraná.

O grupo de pesquisa do LACA possui amplo conhecimento em técnicas de coletas e análises de componentes do ar ambiente (FREITAS; SOLCI, 2009; GONCALVES et al., 2000; GUARIEIRO et al., 2011; PELICHO et al., 2006; PINTO et al., 2014a; PINTO et al., 2014b). No entanto, para quantificação de endotoxinas por cromatografia a gás com detecção por ionização na chama, foi utilizado a técnica segundo Lee et al. (2004) adaptado.

### 4.1 MATERIAIS

#### 4.1.1 Reagentes, Padrões, Equipamentos e Condições de Análises

Os espectros no infravermelho foram obtidos no espectrofotômetro Shimadzu FT-IR modelo 8300, em pastilha de KBr. Os espectros de RMN foram obtidos em espectrofotômetro Bruker modelo Avance III operando a 400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ , equipado com sondas multinucleares de 5 mm. Os espectros foram registrados utilizando trimetilsilano (TMS) como padrão interno.

Os cromatógrafos a gás (CG) utilizados foram Shimadzu GC-17A com detector de ionização por chama (DIC) e Shimadzu 17-A (CG-EM) acoplado a espectrômetro de massas QP500. Em ambos, CG-EM e CG-DIC, foi utilizada a coluna

de sílica fundida Phenomenex® Zebron™ ZB-1 (30 m de comprimento, 0,25 mm de d.i., espessura do filme 0,25 mm).

Condições cromatográficas: CG-DIC; injetor e detector 320 °C, nitrogênio como gás de arraste, vazão de 1,1 mL min<sup>-1</sup>, temperatura do forno iniciando em 90 °C mantendo-se por 3,5 min, elevando a 290 °C com taxa de 20 °C min<sup>-1</sup>, permanecendo por 16,5 min, injeção de 2 µL, *Split* 1:10.

Condições cromatográficas: CG-EM; injetor e fonte 320 °C, interface 330 °C, hélio como gás de arraste, vazão de 1,1 mL min<sup>-1</sup>, temperatura do forno iniciando em 90 °C mantendo-se por 3,5 min elevando a 290 °C com taxa de 20 °C min<sup>-1</sup>, permanecendo por 16,5 min, injeção de 2 µL, *Split* 1:20.

Os solventes e reagentes de grau P.A. e HPLC (*High performance liquid chromatography*) utilizados foram hexano, diclorometano, metanol e éter etílico (Biotec®); propanona, piridina e ácido malônico (Vetec); ácido sulfúrico e anidrido acético (Nuclear); ácido clorídrico, carbonato de potássio, hidróxido de sódio, cloreto de tionila e borohidreto de potássio (Synth). Os padrões certificados dos 3-hidroxiácidos graxos utilizados para quantificação de endotoxina foram adquiridos da *Larodon Fine Chemical*, Suécia (ANEXO A).

#### 4.1.2 Tratamento dos Filtros

Os filtros com diâmetros de 47 mm (Sartorius), 37 mm (Merck Millipore) e 25 mm (Macherey-Nagel) utilizados nas amostragens de MP foram de microfibras de vidro. Antes das coletas, todos os filtros passaram por tratamento térmico em estufa (Biopar-S150ST) a 300 °C por 24 h, posteriormente colocados em placas de Petri e levados ao dessecador contendo sílica em local com temperatura e umidade controladas (22 ± 3 °C e 55 ± 2 %, respectivamente) por 24 h, sendo pesados antes de cada coleta. Ao final de cada coleta eram novamente acondicionados em dessecador sob as mesmas condições de temperatura, umidade e tempo mencionadas anteriormente. Após esse período os filtros foram novamente pesados.

#### 4.1.3 Análises Gravimétricas

Para quantificação de massa do MP foi utilizada a micro balança analítica (Mettler Toledo, AX26) com precisão de 1,0  $\mu\text{g}$ , mantida em local com temperatura e umidade controladas ( $22 \pm 3$  °C e  $55 \pm 2$  %, respectivamente). Todas as medidas de massas do MP foram pela diferença entre massa inicial (antes da coleta do MP) e massa final (após a coleta do MP).

#### 4.1.4 Amostradores

Material particulado atmosféricos legislado pelas principais agências regulatórias são  $\text{MP}_{10}$  (Fração grossa) e  $\text{MP}_{2,5}$  (Fração fina). No entanto, União Europeia, EPA e OMS recomendam monitoramento de  $\text{MP}_{1,0}$  pelo seu potencial de penetração no trato respiratório inferior. Além disso, também é importante compreender o perfil da distribuição por faixa de tamanho do material particulado atmosférico. Neste caso último caso, amostrador *Sioutas* é opção bastante interessante por sua versatilidade de utilização (MISRA et al., 2002).

Para coleta de  $\text{MP}_{10}$  foram utilizados os impactadores  $\text{MP}_{10}$  *Low-vol* ZUF – Universidade de *Frankfurt* – Alemanha, com ponto de corte menor que 10  $\mu\text{m}$  de tamanho aerodinâmico do MP, com vazão de trabalho de 9,0  $\text{L min}^{-1}$ , utilizando filtro de microfibras de vidro com diâmetro 47 mm (Figura 8).

**Figura 8** – Imagem dos coletores MP10 *Low-vol* ZUF – Universidade de *Frankfurt* – Alemanha



**Fonte:** Próprio autor

Nas coletas de MP<sub>2,5</sub> e MP<sub>1,0</sub> foram empregues os ciclones *Teflon*<sup>®</sup> *Coated Aluminum Cyclones* MP<sub>2,5</sub> URG-2000-30EH e MP<sub>1,0</sub> URG-2000-30EHB (*URG Corporation*) com ponto de corte para MP de 2,5 e 1,0  $\mu\text{m}$  respectivamente. Ambos trabalhando com vazão de 16,7 L min<sup>-1</sup> e utilizando filtros microfibras de vidro com diâmetro 47 mm (Figura 9).

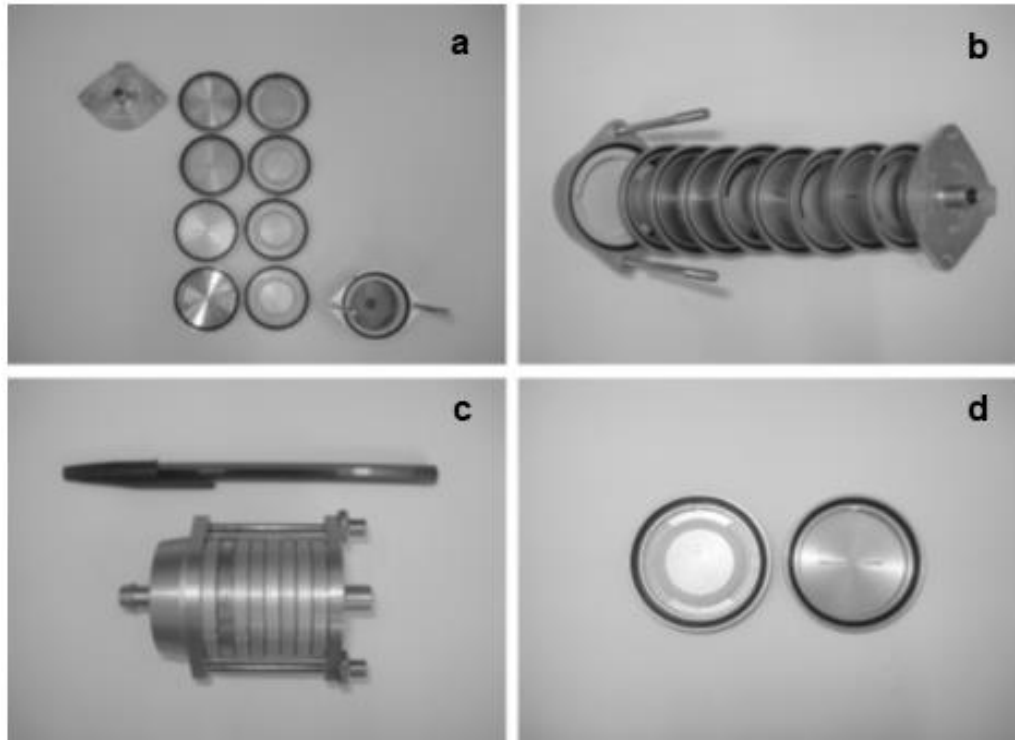
**Figura 9** – Imagem dos coletores ciclones *Teflon<sup>®</sup> Coated Aluminum Cyclones MP<sub>1,0</sub>* URG-2000-30EHB



**Fonte:** Próprio autor

O amostrador *Sioutas Personal Cascade impactor* (SKC Inc.) empregado nas coletas possui 5 faixas de tamanho aerodinâmico. Sendo  $> 2,5$ ;  $1,0 - 2,5$ ;  $0,50 - 1,0$ ;  $0,25 - 0,50 \mu\text{m}$  (Estágios A, B, C e D, respectivamente) coletados em filtros microfibras de vidro com diâmetro 25 mm (Figura 10), e um pós filtro de microfibras de vidro com diâmetro 37 mm e ponto de corte  $< 0,25 \mu\text{m}$ , com vazão de trabalho de  $9,0 \text{ L min}^{-1}$ .

**Figura 10** – Imagem do coletor impactador *Sioutas*. Desmontado evidenciando as cinco seções responsáveis pelo fracionamento por tamanho (a), a sequência de montagem do coletor (b) e uma das seções responsável pelo fracionamento (d). Montado pronto para coleta (c)



**Fonte:** Freitas (2009)

## 4.2 MÉTODOS

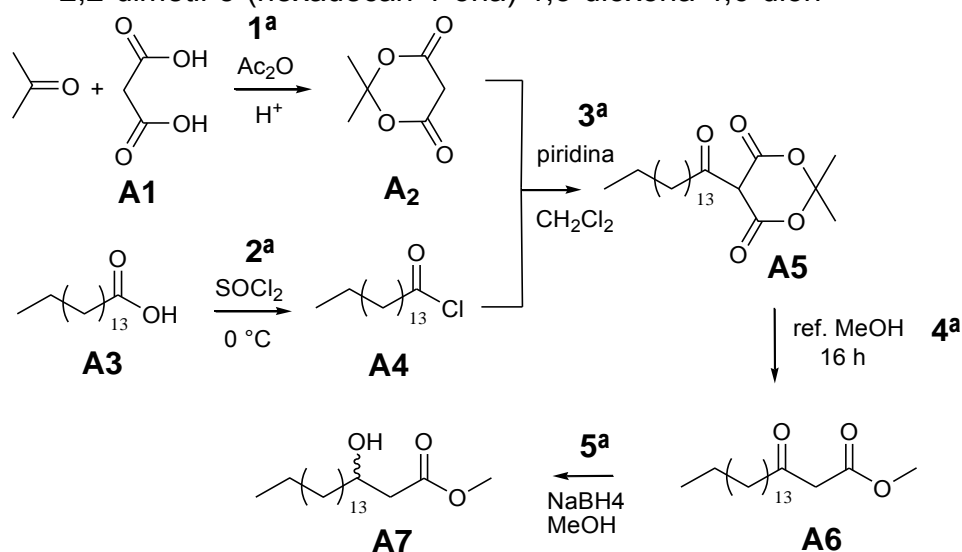
### 4.2.1 Síntese do 3-Hidroxi Octadecanoato de Metila (3-OHODM)

Uma alternativa ao dispendioso ensaio LAL na determinação de endotoxinas é a cromatografia em fase gasosa, no entanto, os ácidos graxos utilizados para padronização externa nem sempre estão comercialmente disponíveis além de possuírem um custo elevados. Com isso, em parceria com membros do LPMBA foi proposta e executado uma síntese visando a produção do 3-OHODM.

A figura 11 ilustra resumidamente as cinco etapas envolvidas na síntese do biomarcador 3-OHODM. Estas etapas foram compostas por uma ciclização do ácido malônico com a propanona (**A1** → **A2**), cloração do ácido palmítico (**A3** → **A4**),

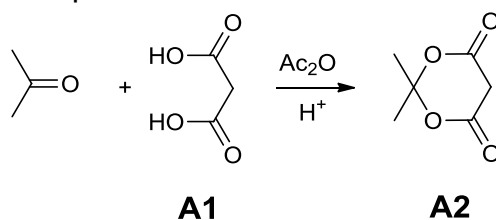
substituição em C-5 do ácido de Meldrum (**A2** + **A4** → **A5**), passando por uma descarboxilação (**A5** → **A6**) e finalizando com a redução da carbonila cetônica (**A6** → **A7**) formando o 3-OHODM.

**Figura 11** – Representação da rota sintética para a produção do biomarcador 3-hidroxi-octadecanoico de metila: A1) ácido malônico, A2) ácido de Meldrum, A3) ácido hexadecanóico, A4) Cloreto de hexadecanoila, A5) 2,2-dimetil-5-(hexadecan-1-ona)-1,3-dioxona-4,6-dion



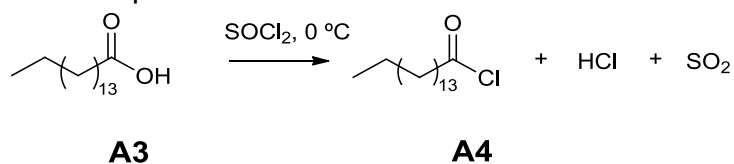
**Fonte:** Próprio autor

O produto (**A2**) formado na 2<sup>a</sup> etapa (Figura 12) foi obtido através da adição de ácido malônico (44,2 mmol; 4,6 g) em anidrido acético (50,4 mmol; 4,8 mL) sob agitação magnética em banho de gelo, seguida da adição lenta de ácido sulfúrico concentrado (3,0 mmol, 0,16 mL). Decorridos 20 min de reação, foi adicionado propanona (54,48 mmol; 4,0 mL) ao sistema reacional. Após alguns instantes da adição da propanona o sistema foi deixado em repouso sob refrigeração ( $\approx 8^\circ C$ ) por 12 horas. O precipitado formado foi filtrado e lavado com água ultrapura gelada e posto para secagem em temperatura ambiente (JIN et al., 2006).

**Figura 12** – Esquema reacional do ácido de Meldrun (A2)

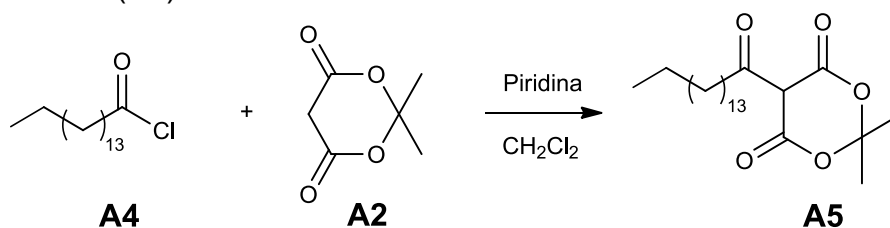
Fonte: Próprio autor

A etapa de formação de **A4** (Figura 13) ocorreu com adição de ácido hexadecanóico (19,5 mmol; 5,0 g) em cloreto de tionila (165,4 mmol; 12 mL). A reação ocorreu em temperatura ambiente (25 °C) e atmosfera inerte (N<sub>2</sub>) sob agitação magnética por 30 min. O excesso de cloreto de tionila foi removido por destilação simples ao final da reação.

**Figura 13** – Esquema reacional do cloreto de hexadecanoila (A4)

Fonte: Próprio autor

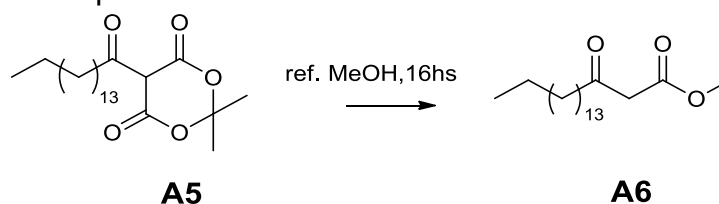
A obtenção de **A5** foi pela reação (Figura 14) entre **A2** (10,20 mmol; 1,47 g), previamente solubilizado em diclorometano (12,0 mL) e **A4** na presença de piridina sob agitação magnética por 90 min em banho de gelo. Na sequência, as impurezas foram extraídas com HCl 2,0 M (3 x 50 mL) e água ultrapura (3 x 50 mL). O solvente orgânico foi removido por rotaevaporação ao final da reação (KOCIEŃSKI et al., 1998).

**Figura 14** – Esquema reacional do 2,2-dimetil-5-(hexadecan-1-ona)-1,3-dioxano-1,4-diona (A5)

Fonte: Próprio autor

Na quarta etapa **A5** foi suspenso em metanol e submetido a refluxo por 16 h. Ao final desse período o solvente foi removido por evaporador rotativo. O sólido resultante foi dissolvido em éter etílico (50 mL). As impurezas foram removidas com solução de  $K_2CO_3$  0,72 M (3 x 15 mL) e água ultrapura (3 x 15 mL). Na sequência, o solvente orgânico foi extraído por rotaevaporação fornecendo o produto **A6**, ilustrado na figura 15 (KOCIEŃSKI et al., 1998).

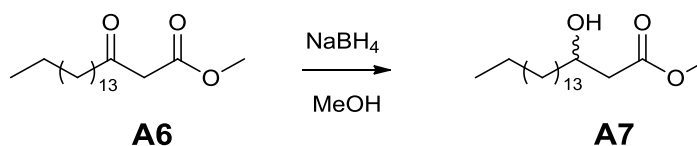
**Figura 15** – Esquema reacional do 3-oxi-octadecanoato de metila (**A6**)



**Fonte:** Próprio autor

A quinta e última etapa, **A6** (5,67 mmol; 1,78 g) foi dissolvido em éter etílico e adicionado a metanol (50 mL). Sob agitação magnética foi adicionado lentamente borohidreto de sódio (5,80 mmol; 0,312 g) em banho de gelo por 15 minutos. O produto final formado **A7** foi extraído com diclorometano (3 x 15 mL), na sequência o solvente foi removido por rotaevaporação (YANG et al., 2004). A figura 16 representa o esquema dessa etapa.

**Figura 16** – Esquema reacional para formação do 3-hidroxi octadecanoato de metila (**A7**)



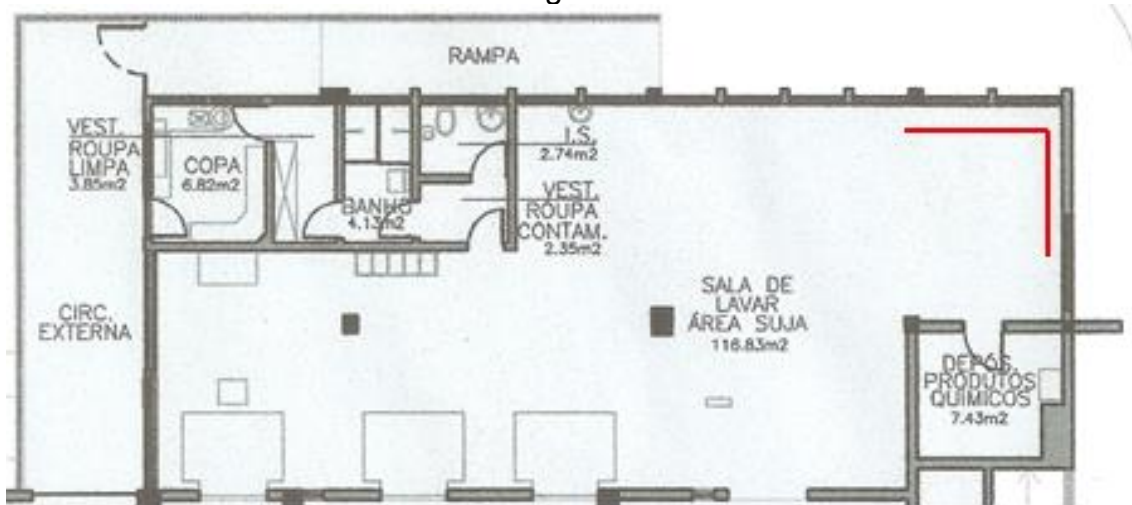
**Fonte:** próprio autor

#### 4.2.2 Amostragem

As amostragens de MP foram realizadas em dois locais distintos. Uma das amostragens foi realizada na lavanderia do Hospital Universitário (HU) da Universidade Estadual de Londrina e outra em uma granja de frangos de corte.

A lavanderia do HU está localizada em Londrina, região norte do Estado do Paraná ( $23^{\circ}19'35,9''S$   $51^{\circ}07'46,3''W$ ), é um local fechado com pouca circulação de pessoas, área de aproximadamente  $116,8\text{ m}^2$  (Figura 17). No anexo B está ilustrado a planta da lavanderia do HU com todos os setores que a compõe.

**Figura 17** – Planta sala de lavagem da lavanderia do HU (área suja) onde foi realizada a amostragem. O destaque em vermelho representa a disposição dos coletores durante a amostragem



O vestiário de todo hospital chega até a lavanderia pela área suja. Nessa área os vestuários são previamente classificados e separados em dois grandes grupos, pouco sujo e muito sujos. Depois são levados separadamente para as máquinas, onde são feitos os procedimentos de lavagens para cada tipo classificado. Em média são lavados  $3.000\text{ Kg}$  de roupas diariamente.

O período de amostragem neste local foi de 25/02 a 05/03/2015. Os coletores utilizados foram  $MP_{10}$ ,  $MP_{2,5}$ ,  $MP_{1,0}$  e impactador *Sioutas*, tendo sido todos utilizados em duplicatas. Os coletores foram montados a uma altura de aproximadamente  $1,5\text{ m}$  do solo (Figura 18). Na lavanderia o regime de trabalho é 12 horas diária durante a semana e 8 horas aos sábados, não funcionando aos domingos. No final de todo expediente o local onde foi realizada a coleta era lavado, com isso, a duração das coletas foram de no máximo 11 horas. As coletas de  $MP_{10}$ ,  $2,5$  e  $1,0$  foram realizadas diariamente (das 9 horas até o final de cada expediente), ao final de cada coleta os filtros eram colocados em placas de Petri, acondicionados em recipiente hermético, levados para acondicionamento no laboratório e posteriormente analisados.

As amostragens dos impactadores *Sioutas* foram cumulativas, ou seja, as bombas eram ligadas e desligadas no início e no final de cada expediente, mas sem que houvesse a troca dos filtros. Somente final do período de coleta os filtros foram retirados e colocados em placas de Petri, acondicionados em recipiente hermético, levados para acondicionamento no laboratório e posteriormente analisados.

**Figura 18** – Imagem da montagem dos dois conjuntos usados para amostragem na “área suja” da lavanderia do HU. Lado esquerdo: da esquerda para a direita coletores; MP<sub>1,0</sub>A, MP<sub>2,5</sub>A, MP<sub>1,0</sub>B e MP<sub>2,5</sub>B. Lado direito: da esquerda para direita; MP<sub>10</sub>A, impactador *Sioutas*A, MP<sub>10</sub>B e impactador *Sioutas*B.



**Fonte:** Próprio autor

O outro local de amostragem foi a granja de frangos de corte. Um local semiaberto com 1.000 m<sup>2</sup> de área, com capacidade para aproximadamente 10.000 aves. Está localizada em uma área rural no município de Londrina, região norte do Estado do Paraná (23°23'05.1"S 51°13'25.8"W).

Os pintainhos chegam a granja com aproximadamente 80,0 g, quando atingem em média 2,5 kg são retirados para o abate, esse período dura cerca de 45 dias, dependendo do desenvolvimento das aves. Durante todo esse tempo os trabalhadores ficam no interior da granja realizando tarefas como manutenção e alimentação dos animais.

A amostragem nesse local foi de 09 a 21/07/2015, sendo utilizados os coletores MP<sub>10</sub>, MP<sub>2,5</sub>, MP<sub>1,0</sub> e *Sioutas*. Os coletores foram montados a uma altura de aproximadamente 1,5 m do solo (Figura 19).

**Figura 19** – Imagem do conjunto montado para amostragem na granja de frangos de corte. Da esquerda para direita, coletores MP<sub>1,0</sub>, MP<sub>2,5</sub>, MP<sub>10</sub> e impactador *Sioutas*



**Fonte:** Próprio autor

A duração de cada coleta para MP<sub>10</sub>, MP<sub>2,5</sub> e MP<sub>1,0</sub> foi de 48 horas. Durante o período de amostragem foi constatado um aumento na concentração do MP, dessa forma, a coleta do impactador *Sioutas* não foi realizada de forma contínua. Com isso, os intervalos de amostragem do impactador *Sioutas* foram de 144 e 96 horas, período de menor e maior concentração de MP, respectivamente.

#### 4.2.3 Determinação de Endotoxinas

A determinação das endotoxinas foram feitas por padronização externa utilizando CG-DIC, a metodologia de quantificação foi adaptada do procedimento descrito por Lee et al. (2004). Essa metodologia leva em consideração o fato de haver, para cada endotoxina, dois pares de 3-hidróxi ácidos graxos (3-OHAG) ligados ao lipídeo A na forma de ésteres e amidas. Desse modo, a hidrólise ácida em metanol de

um mol de endotoxina produz quatro mol de 3-hidroxi ésteres metílicos de ácidos graxos (3-OHEMAG).

Com isso, para determinação das endotoxinas, após a coleta cada filtro foi posto em refluxo a 100 °C por 18 horas em 5,0 mL de HCl 4M (metanólico), posteriormente o sistema reacional foi deixado em repouso até atingir a temperatura ambiente. Em seguida, os 3-OHEMAG formados foram extraídos com 3,0 mL de hexano (2x), o solvente orgânico foi seco em corrente de N<sub>2</sub>, o resíduo formado suspenso em 1,0 mL de hexano/diclorometano (1:1), injetado lentamente em coluna de sílica gel (300 mg) e as impurezas retiradas com 2,0 mL de hexano/diclorometano (1:1). A extração dos 3-OHEMAG da coluna foi com 2,5 mL de éter etílico, o solvente orgânico seco em corrente de N<sub>2</sub> seguido de derivatização com 70 µL de N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) e 10 µL de piridina a 80 °C por 15 min. O derivatizado foi suspenso em 920 µL de diclorometano e injetado no cromatógrafo a gás Shimadzu GC-17A com detector de ionização por chama. O CG estava equipado com uma coluna de sílica fundida da Phenomenex® Zebron™ ZB-1 (30 m de comprimento, 0,25 mm de d.i., espessura do filme 0,25 µm).

Como as cabeias carbônicas dos ésteres formados variam de 10 a 18 carbonos, foram adquiridos padrões certificados *3-hydroxidecanoic acid* (3-OHED); *hydroxidodecanoic acid* (3-OHDD); *hydroxitetradecanoic acid* (3-OHTD); *hydroxihexadecanoic acid* (3-OHHD) e *hydroxiocetadecanoic acid* (3-OHOD) da Larodon Fine Chemical (ANEXO A). Estes padrões foram esterificados e derivatizados conforme descrição anterior utilizada para as amostras (filtros).

Considerando que 4,0 mol de 3-OHEMAG equivalem 1,0 mol de endotoxina, e uma endotoxina possui em média 8.000 Da (BROOKS et al., 2012), as concentrações das endotoxinas foram calculadas de acordo com a equação 1. Como isso, os resultados foram expressos em ng m<sup>-3</sup> de endotoxinas, para efeito de comparação, 1,0 ng equivale aproximadamente 10 EU (*Endotoxin Units*), unidade usualmente empregada para expressar as concentrações de endotoxinas quando o ensaio enzimático LAL é utilizado (LAITINEN et al., 2001; RYLANDER, 2002).

$$\text{Equação 1: } \frac{(\Sigma \text{ mol } 3\text{-OHEMAG}) \times (M_{\text{End.}})}{4 \times V_T}$$

Onde:

$M_{\text{End.}}$  = massa molar de endotoxinas

$V_T$  = volume total de ar coletado

#### 4.2.4 Estimativas de Figuras de Mérito

Observância na qualidade das medidas instrumentais e confiabilidade dos cálculos estatísticos, é essencial em qualquer técnica analítica. Portanto, conhecer o alcance destes dois elementos por meio da estimativa das figuras de mérito, é imprescindível para sua aplicabilidade.

Os requisitos que compõem figuras de mérito são, por exemplo, exatidão, precisão, robustez, linearidade, sensibilidade, seletividade, entre outros. A definição de quais parâmetros devem ser utilizados numa validação está ligado a natureza das alterações realizadas no método analítico (ANVISA, 2015).

O intervalo analítico entre maior e menor concentração do analito, observando de precisão, exatidão e linearidade, é faixa de trabalho. Já faixa linear de trabalho é a faixa de concentração do analito em que os resultados do método são proporcionais à concentração do analito (INMETRO, 2016).

Para constituição das curvas analíticas foram utilizados cinco 3-HOAG silanizados. As curvas analíticas dos padrões 3-OHDES, 3-OHDDS, 3-OHTDS, 3-OHHDS e 3-OHODS estão apresentadas na tabela 1.

**Tabela 1** – Dados da faixa de trabalho utilizando padrões 3-HOAG silanizados

Padrões	Faixa linear de trabalho
	$\mu\text{mol L}^{-1}$
3-OHDES	8,30 – 173,02
3-OHDDS	7,40 – 154,11
3-OHTDS	8,73 – 181,89
3-OHHDS	9,01 – 187,64
3-OHODS	7,39 – 154,21

**Fonte:** Próprio autor

#### 4.2.4.1 Exatidão

A exatidão é concordância entre valor medido e valor verdadeiro mensurando. Também pode ser considerada como grau de concordância entre valores medidos que são atribuídos ao mensurando (INMETRO, 2012; Anvisa, 2015; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Anvisa (2015) preconiza que exatidão seja avaliada por, no mínimo, nove determinações contemplando o intervalo linear do método analítico. Sendo em triplicata para cada nível de concentração (baixa, média e alta). As amostras avaliadas na exatidão podem ser oriundas da mesma solução mãe, no entanto, devem ser preparadas de maneira independente. Pode ser expressa pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra e a concentração teórica correspondente.

Para realização do ensaio de recuperação foi utilizada solução contendo cinco diferentes 3-OHAG. A recuperação foi efetivada em três níveis diferentes de concentração, e cada nível feito em triplicata. Para tanto, em cada nível três filtros foram “fortificados” com solução de cinco diferentes 3-OHAG, sendo submetidos aos mesmos procedimentos descritos no item 4.2.3. Nas três faixas de concentrações dos 3-OHAG na recuperação situaram próximos aos pontos mínimo, médio e máximo da curva linear de trabalho (Tabela 2).

**Tabela 2 – Dados das concentrações dos 3-OHAG utilizadas no teste recuperação**

3-OHAG	Nível 01	Nível 02	Nível 03
	$\mu\text{mol L}^{-1}$		
3-OHDE	8,33	85,00	170,00
3-OHDD	7,29	77,00	154,00
3-OHTD	9,35	91,00	182,00
3-OHHD	9,36	94,00	188,00
3-OHOD	7,30	77,00	154,00

**Fonte:** Próprio autor

#### 4.2.4.2 Linearidade

Linearidade do procedimento analítico é a relação direta da proporcionalidade entre concentração e sinal do analito na amostra (ANVISA, 2015; INMETRO, 2016).

Deve ser avaliada na totalidade da faixa instituída para o método, com no mínimo cinco concentrações diferentes, e no mínimo em triplicata (ANVISA, 2015). Os padrões de calibração devem ser uniformemente espaçados na faixa de concentração de interesse. Abrangendo de 0 – 150 % ou 50 – 150% da concentração provável de ser encontrada, dependendo da conveniência. Dados das concentrações reais e respostas analíticas individuais devem ser os parâmetros utilizados na avaliação da linearidade (ANVISA 2015; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

Alguns dados são importantes constar na avaliação da linearidade, como representação gráfica das respostas em função da concentração do analito, e da dispersão dos resíduos, seguido de sua estimativa estatística. Equação da reta de regressão de y em x, obtida pelo método dos mínimos quadrados. Coeficientes de determinação ( $r^2$ ) e de correlação (r) e significância do coeficiente angular. O coeficiente de correlação deve estar acima de 0,990, e coeficiente angular significativamente diferente de zero (ANVISA, 2015).

#### 4.2.4.3 Limite de detecção

Limite de detecção (LD) pode ser compreendido como valor medido, obtido por dado procedimento de medição, para o qual a probabilidade de declarar falsamente a ausência do constituinte no material seja  $\beta$ , e para probabilidade de declarar falsamente sua presença seja  $\alpha$  (INMETRO, 2012).

A demonstração (sob as condições experimentais estabelecidas) do LD deve ser realizada pela obtenção da menor quantidade do analito presente na amostra, sem necessariamente ser quantificada. Essa demonstração pode ser efetuada por meio de método visual, da razão sinal-ruído, baseado na determinação do branco ou em parâmetros da curva de calibração. Deve ser levado em consideração as particularidades do método analítico utilizado (ANVISA, 2015; INMETRO, 2016).

No caso de métodos visuais, o LD é verificado quando na menor concentração para a qual é possível constatar efeito visual esperado. Em métodos instrumentais, LD pode ser determinado pela razão sinal-ruído, neste caso a utilização da razão sinal/ruído deve ser descrito e justificado. Pede-se que a razão sinal-ruído possa ser maior ou igual a 2:1. Já o limite de detecção baseado em parâmetros da curva analítica

é a razão entre o múltiplo de 3,3 e desvio padrão (s) pela inclinação (S) da curva analítica (mínimo 3).

Equação 2:

$$LD = 3,3 \frac{s}{S}$$

Onde, s é a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear, e S a inclinação da reta de três curvas.

Neste último caso, s pode ser calculado de três formas. Considerando o desvio padrão residual da linha de regressão, a estimativa de ruído proveniente da análise de um apropriado número de amostras do branco, ou ainda pelo desvio padrão do intercepto com o eixo Y de, no mínimo, 3 curvas analíticas construídas contendo concentrações do analito próximas ao suposto limite de detecção (ANVISA, 2015; INMETRO, 2016).

#### 4.2.4.4 Limite de quantificação

Limite de quantificação (LQ) é a menor quantidade do analito na amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis dentro das condições experimentais estabelecidas (ANVISA 2015; INMETRO, 2016).

No estabelecimento do LQ desse ser seguido os mesmos parâmetros utilizados em LD (ANVISA, 2015). Neste caso, sendo que a razão sinal/ruído deve ser no mínimo de 10:1. O baseado em parâmetros da curva analítica, o LQ é a razão entre o múltiplo de 10 e desvio padrão (s) pela inclinação (S) da curva analítica (mínimo 3).

Equação 3:

$$LQ = 10 \frac{s}{S}$$

Onde, s é a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear, e S a inclinação da reta de três curvas.

#### 4.2.4.5 Sensibilidade

Sensibilidade pode ser definida como quociente entre variação da indicação do sistema de medição e variação correspondente ao valor da grandeza medida (INMETRO, 2012; ANVISA, 2015; THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002), ou mudança da resposta no instrumento correspondente a mudança na quantidade medida, inclinação da curva analítica (INMETRO, 2016). Embora seja considerada útil em procedimentos de garantia de qualidade para funcionalidade satisfatória de instrumentos, não é entendida com útil na validação para (THOMPSON; ELLISON; WOOD, 2002).

#### 4.2.5 Razão LPS/MP

O material particulado apresenta um perfil de distribuição por tamanho associado a fonte emissora (BAIRD, 2012). Com isso, as concentrações de MP podem variar significativamente entre os diferentes tamanhos de material particulado.

Considerando que uma diferença acentuada entre as massas dos diferentes tamanhos de MP possa, eventualmente, subestimar a real relação entre a concentração de endotoxina com determinado tamanho de MP, foi proposto a razão massa de endotoxina por massa de MP (Equação 4). Essa proposta objetivou normatizar, através de uma “taxa”, as comparações entre as concentrações de endotoxinas de diferentes tamanhos de material particulado.

$$\text{Equação 4: } \left( \frac{\text{Massa de endotoxina / ng m}^{-3}}{\text{massa de MP / mg m}^{-3}} \right)$$

As massas das endotoxinas foram divididas pelas massas dos respectivos tamanhos de MP a que estavam associadas. Os valores resultantes dessas “taxas” foram comparados entre si para cada local de coleta.

## 5 RESULTADO E DISCUSSÃO

### 5.1 SÍNTESE DO 3-OH OCTADECANOATO DE METILA

#### 5.1.1 Purificação e Monitoramento do Produto Formado

O produto final 3-OHODM e os intermediários da reação foram submetidos às análises por espectroscopia no infravermelho (**A2**), ressonância magnética nuclear (**A6** e **A7**), CG-DIC e espectrometria de massas (**A7**). Uma solução do padrão certificado *hydroxioctadecanoic acid* foi preparada, nas mesmas condições do item 4.2.3, e analisada em CG-DIC somente para confirmação do tempo de retenção.

O intermediário resultante da primeira etapa, ácido de Meldrum (**A2**), foi obtido facilmente pela ciclização do ácido malônico com propanona (JIN et al., 2006), resultando em 4,32 g de um sólido branco cristalino com 68 % de rendimento. A fácil disponibilidade dos reagentes de partida e condições brandas da reação compensam o moderado rendimento dessa etapa. Sua caracterização foi feita por comparação dos espectros de infravermelho de **A2** com dados da literatura (JIANG et al., 2007; RUDOLF et al., 2010). No espectro de IV foi possível observar principalmente duas bandas intensas de deformação axial das carbonilas (1793 e 1754  $\text{cm}^{-1}$ ), uma banda intensa de deformação axial C-O (1323  $\text{cm}^{-2}$ ) e duas bandas de média intensidade características de deformação axial C-H metilênico (3004, 2931  $\text{cm}^{-1}$ ) (ANEXOS C).

O líquido formado na segunda etapa, cloreto de hexadecanoila (**A4**), apresentou coloração âmbar com rendimento próximo de 79 % (4,23 g).

Existem alguns relatos na literatura descrevendo as etapas 3 e 4 empregando ácidos graxos de menores cadeias (OIKAWA; SUGANO; YONEMITSU, 1978; WU; MILLER; MILLER, 2011), no entanto, não foram encontrados trabalhos utilizando o ácido hexadecanóico. Na terceira etapa, reação de eliminação, formou 3,18 g de 2,2-dimetil-5-(hexadecan-1-ona)-1,3-dioxona-4,6-diona (**A5**), um sólido branco amorfo com 82 % de rendimento. Já a quarta etapa, abertura da dilactona, houve a formação do 3-oxo-octadecanoato de metila (**A6**), um sólido branco amorfo. O monitoramento da formação de **A6** foi realizado CG-DIC, a caracterização foi realizada por ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  comparada com dados de literatura.

No cromatograma (CG-DIC) apareceram dois picos com tempo de retenção próximos e áreas similares, indicando que houve considerável formação de subproduto (ANEXO D). A proximidade dos tempos de retenção sugeriu similaridade entre a estrutura química de **A6** e o subproduto, que neste caso poderia ser o éster do ácido palmítico proveniente de **A5**. Para verificar essa hipótese foi injetada uma solução de palmitato de metila no CG-DIC, após a injeção foi observado mesmo tempo de retenção obtido pelo subproduto da reação (ANEXO E).

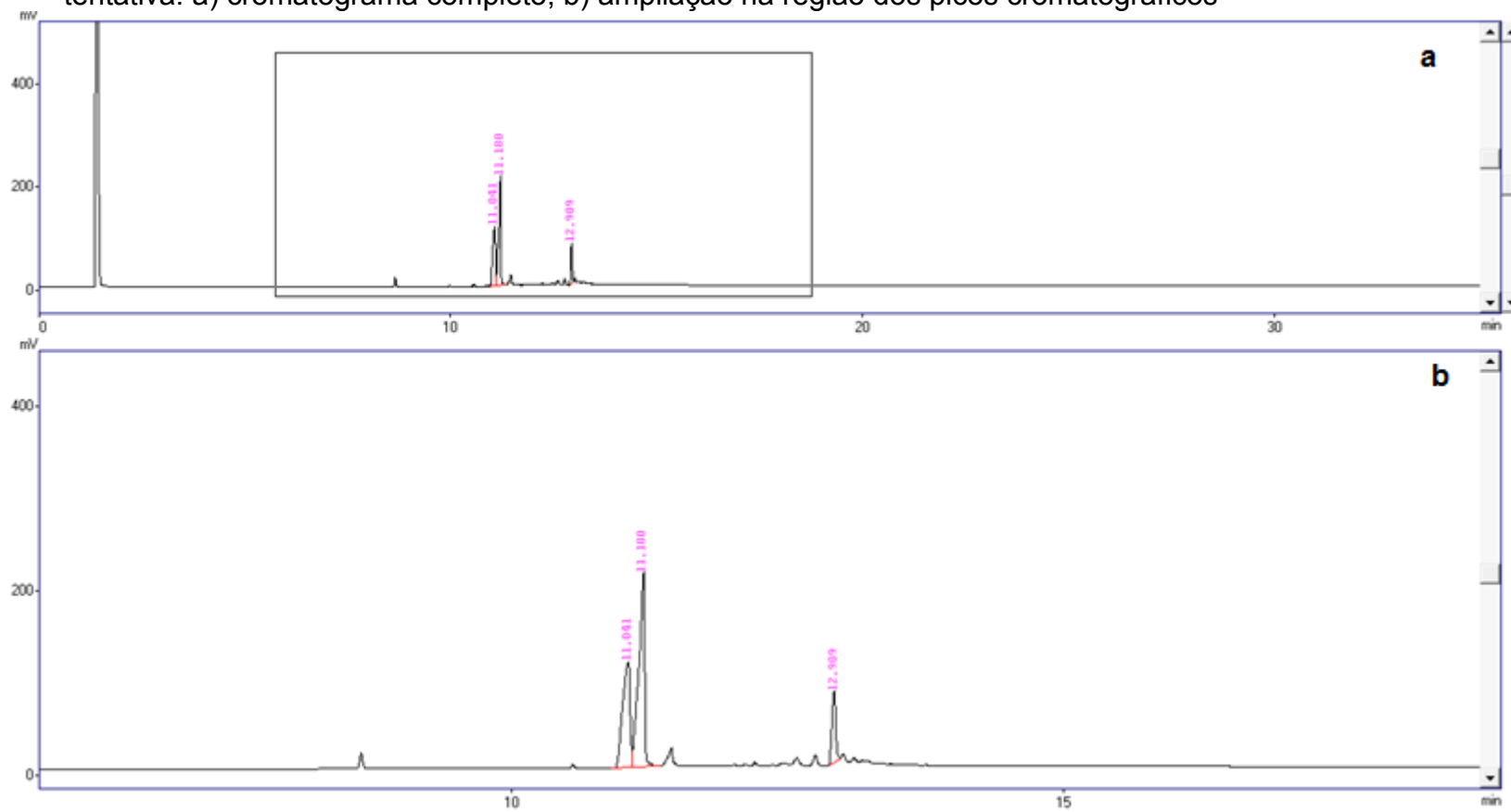
Os dados de RMN corroboraram com os cromatográficos quanto a formação do intermediário **A6** concomitante com palmitato de metila. No espectro de RMN  $^1\text{H}$  há dois sinais de singletos em  $\delta$  3,76 e 3,68, condizentes com os hidrogênios das metoxilas de **A6** e palmitato de metila, respectivamente. O singlete em  $\delta$  3,46 pode ser atribuído aos dois hidrogênios  $\alpha$ -carbonilas do intermediário **A6** (ANEXO F). Já no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , apareceram três sinais que podem ser atribuídos a três carbonos carbonílicos. Os sinais em  $\delta$  202,90 e 167,72 são condizentes com deslocamentos dos carbonos de cetona e éster de **A6**, o sinal em  $\delta$  174,38 foi atribuído ao carbono da carbonila de éster do palmitato de metila. Os deslocamentos em  $\delta$  51,44 e 52,33 são atribuídos os carbonos das metoxilas dessa mistura, sendo o primeiro de **A6** e o segundo do palmitato (ANEXO F). Os dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **A6** também foram comparados com dados da literatura (MORDANT et al., 2004): **3-oxo-octadecanoato de metila (A6)**: RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz):  $\delta$  3,68 (s, 3H); 3,46 (s, 2H); 2,54 (t,  $J = 7,4$  Hz); 1,61 (m, 2H); 1,29 (m, 24H); 0,89 (t,  $J = 6,9$  Hz). (RMN  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 100 MHz):  $\delta$  202,9; 167,7; 52,4; 49,0; 43,1; 31,9; 29,5; 29,3; 29,0; 23,4; 22,7; 14,1.

Na quinta e última etapa, que compreende a redução do carbonila de **A6**, existem alguns trabalhos descritos na literatura que objetivam a enantiosseletividade e são realizadas utilizando normalmente compostos de cadeias carbônicas menores. Nestes casos o processo de redução da carbonila cetônica ocorre usualmente em presença de catalisadores quirais, altas pressões, baixa temperatura ou combinação destes (FUKUZAWA; MATSUZAWA; YOSHIMITSU, 2000; RATOVELOMANANA-VIDAL et al., 2003; CONCELLÍN; CONCELLÓN, 2006; SMITH; UTEULIYEV; TAKACS, 2011). No entanto, os 3-OHEAG como biomarcador não necessita de enantiosseletividade, dessa forma, redução da carbonila pôde ser realizada em condições brandas de reação.

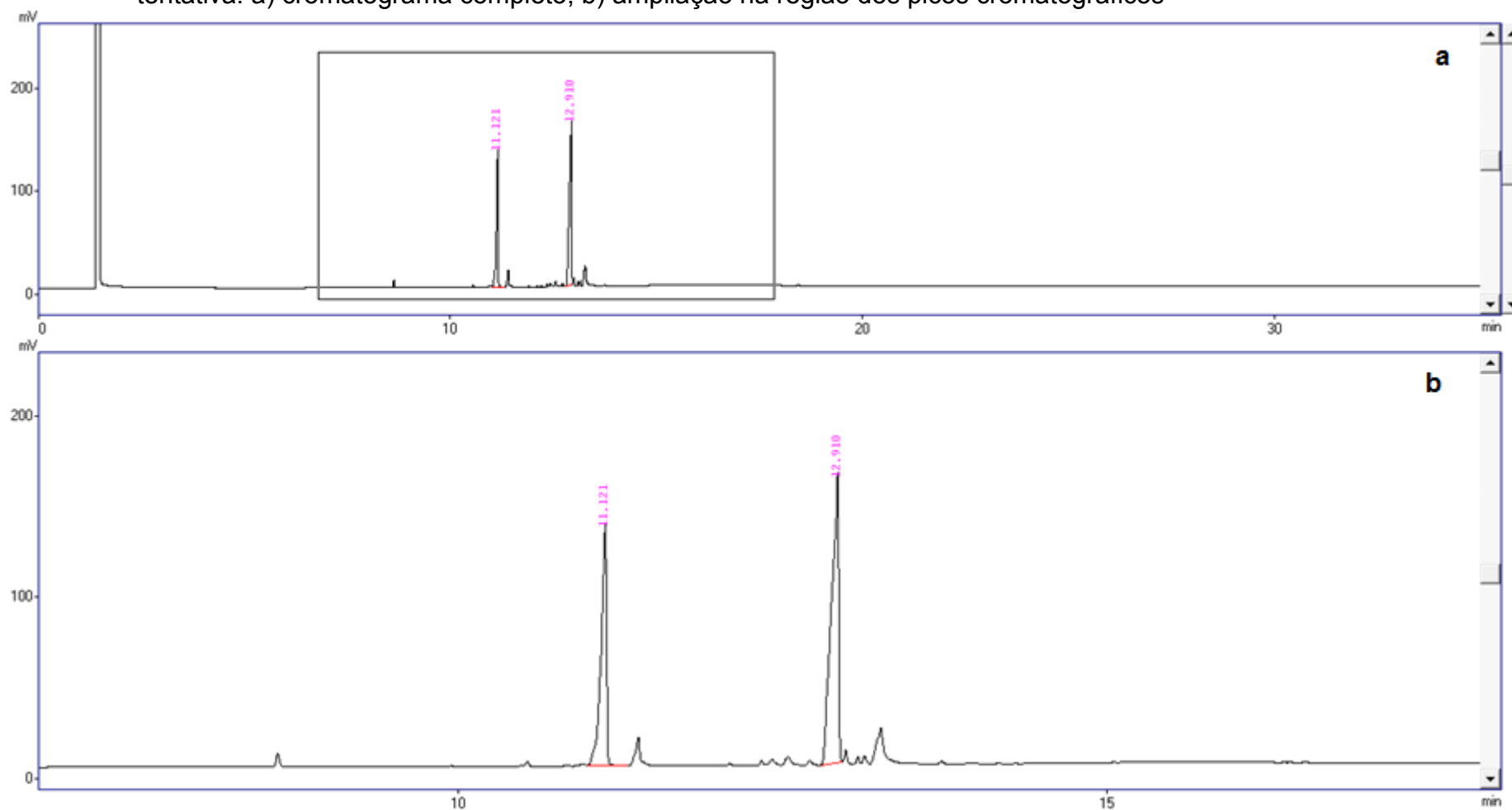
Na primeira tentativa houve pouca formação de **A7**, como pode ser verificado no cromatograma na figura 20 (pico cromatográfico em 12,9 min), possivelmente pela baixa solubilidade de **A6** em metanol. Para contornar essa dificuldade, essa etapa foi repetida com **A6** solubilizado previamente em pequena quantidade de éter etílico (5,0 mL) antes de ser adicionado ao meio reacional. Como pode ser observado na figura 21 (pico cromatográfico em 12,9 min), houve completa formação do produto **A7** sem que houvesse qualquer modificação no subproduto palmitato de metila.

A purificação do composto 3-hidroxi-octadecanoato de metila (**A7**) foi através de cromatografia de coluna com sílica gel 60 com fase estacionária e hexano/éter (1:5) como fase móvel. Foram obtidos 1,58 g de (3-hidroxi-octadecanoato de metila), sólido branco amorfo com 86 % de rendimento.

**Figura 20** – Cromatogramas (CG-DIC) do monitoramento da formação de A7 (3-hidroxi octadecanoato de metila) da primeira tentativa: a) cromatograma completo; b) ampliação na região dos picos cromatográficos

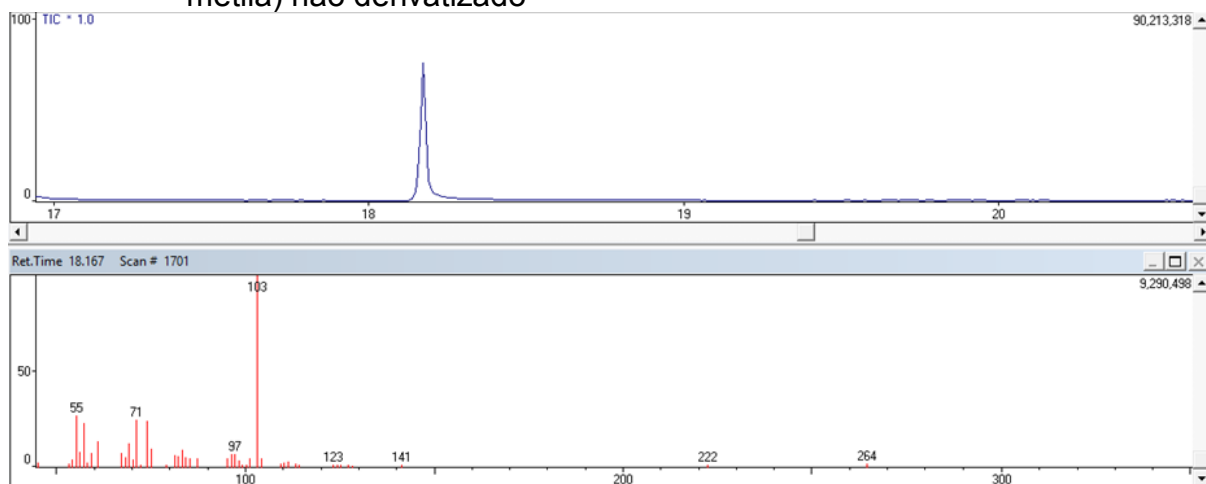


**Figura 21** – Cromatogramas (CG-DIC) do monitoramento da formação de A7 (3-hidroxi octadecanoato de metila) da segunda tentativa: a) cromatograma completo; b) ampliação na região dos picos cromatográficos

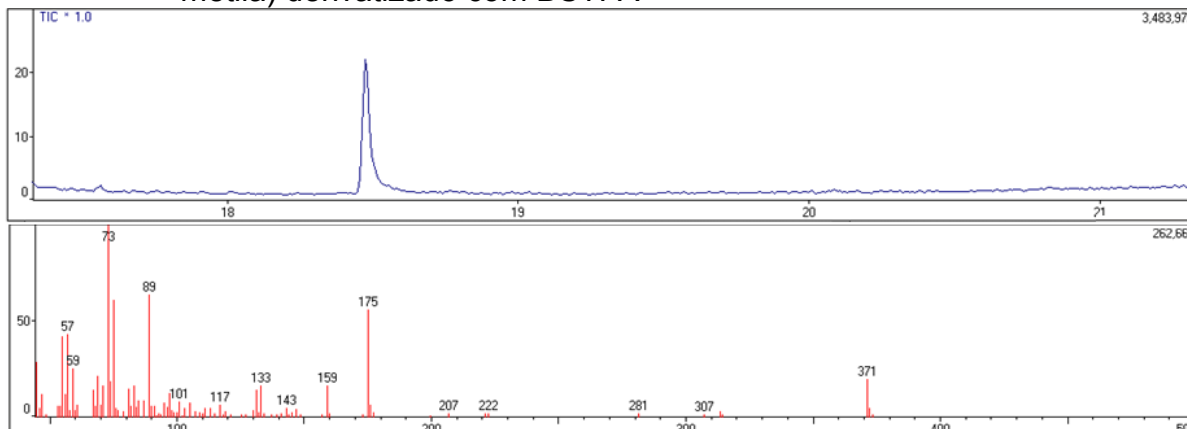


Para caracterização de **A7** foram utilizadas as técnicas de cromatográfica em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas, ressonância magnética nuclear de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ . Na caracterizar **A7** por CG-ME foram utilizadas duas estratégias. Na primeira, **A7** foi solubilizado em diclorometano e injetado no CG-ME, como pode ser observado no espectro de massas na figura 22, há formação do pico do íon base em  $m/z$  103 (100%,  $[\text{M}-\text{C}_{15}\text{H}_{31}]^+$ ) que é característico da fragmentação de um éster metílico contendo uma hidroxila no carbono  $\beta$ -carbonila. Essa hipótese também pode ser observada na segunda estratégia, quando **A7** foi derivatizado (Item 4.2.3) e injetado no CG-ME. Como pode ser notado no espectro de massas na figura 23, a presença do pico do íon  $z/m$  175 (~55%,  $[\text{M}-\text{C}_{15}\text{H}_{31}]^+$ ) também é característico da fragmentação de um éster metílico contendo uma hidroxila no carbono  $\beta$ -carbonila, mas neste caso a hidrogênio da hidroxila é substituído pelo grupo trimetil silano (TMS). Além disso, em ambos os casos (Sem e com derivatização) a biblioteca (Nist 147) apresentou similaridade acima de 95 %.

**Figura 22** – Cromatograma e espectro de massas de A7 (3-hidroxi-octadecanoato de metila) não derivatizado



**Figura 23** – Cromatograma e espectro de massas de A7 (3-hidroxi-octadecanoato de metila) derivatizado com BSTFA



Pela técnica de RMN de  $^1\text{H}$  foi observado principalmente um singleto em  $\delta$  3,72 que pode ser atribuído aos hidrogênios da metoxila e um duplo duplete em  $\delta$  2,42 e 2,53 atribuídos aos hidrogênios  $\alpha$ -carbonila (ANEXO G).

Na RMN de  $^{13}\text{C}$  pode ser observado com maior evidencia os deslocamentos do carbono carbonílico de éster em  $\delta$  173,63, o carbono de metoxila em  $\delta$  51,87, além do sinal em  $\delta$  41,17 de  $-\text{CH}_2-$   $\alpha$ -carbonila e um sinal de  $-\text{CH}-$  em  $\delta$  68,19 de um carbono ligado a hidroxila (ANEXO G).

Sendo assim, foi possível obter o padrão sintetizado 3-OHOD com reagentes de partida de baixo custo e fácil aquisição além de condições brandas de reação. O padrão sintetizado em laboratório torna possível o seu emprego nas determinações analíticas de endotoxinas em diferentes matrizes.

## 5.2 ESTIMATIVA DE FIGURAS DE MÉRITO

### 5.2.1 Curva Analítica e Cálculos dos Limites

Utilizando padrões de referência foram obtidas as curvas analíticas de cinco 3-HOAG silanizados. As faixas de trabalho dos padrões 3-OHDES, 3-OHDDS, 3-OHTDS, 3-OHHDS e 3-OHODS estão apresentadas na tabela 3.

**Tabela 3** – Faixa de trabalho e coeficientes de correlação dos padrões 3-HOAG silanizados

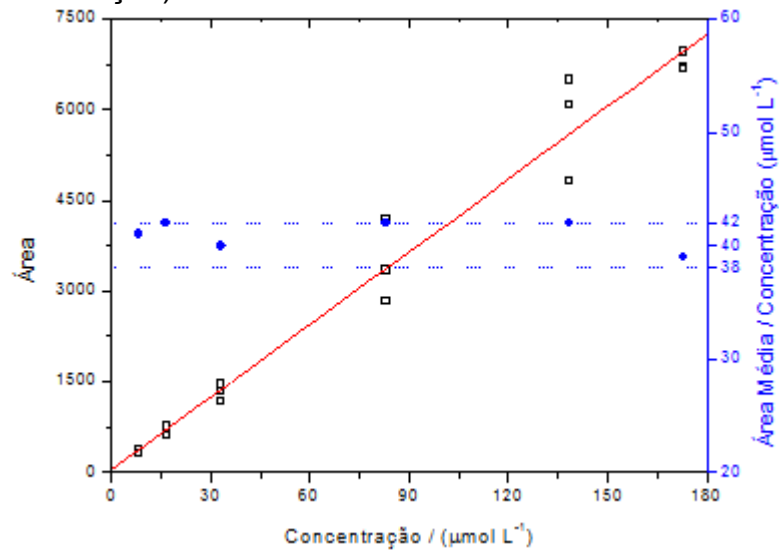
Padrões	Faixa linear de trabalho	Coeficiente de determinação
	$\mu\text{mol L}^{-1}$	$R^2$
3-OHDES	8,30 – 173,02	0,988
3-OHDDS	7,40 – 154,11	0,988
3-OHTDS	8,73 – 181,89	0,987
3-OHHDS	9,01 – 187,64	0,988
3-OHODS	7,39 – 154,21	0,989

**Fonte:** Próprio autor

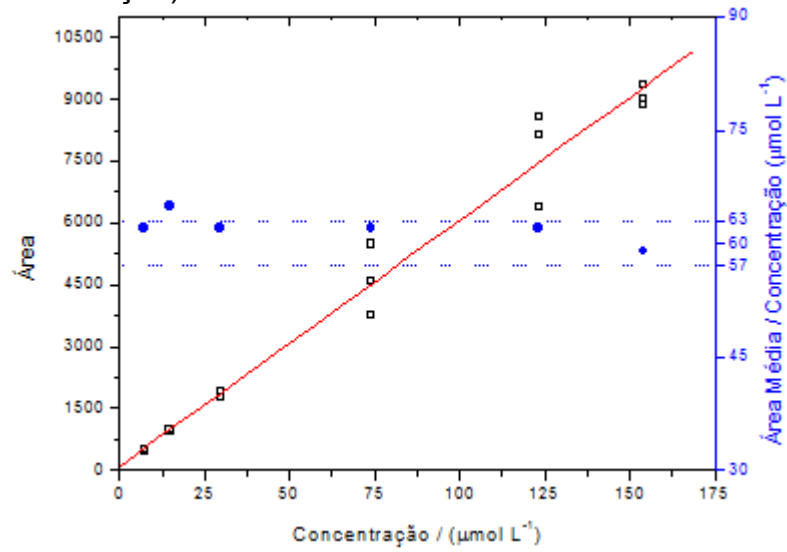
Os coeficientes de determinação podem indicar a qualidade das curvas obtidas. Segundo Anvisa (2015), coeficientes de determinação devem ser superiores a 0,99, para obter evidência do ajuste ideal dos dados para a linha de regressão. As figuras de 20 a 24 apresentam as curvas analíticas para os padrões de referência de cada 3-OHAGS.

Considerando que linearidade de uma curva pode ser observada admitindo que os dados se ajustam a uma equação de reta, a qual possui coeficiente angular constante. Na hipótese idealizada, haverá uma razão constante entre sinal (Área do cromatograma) e sua respectiva concentração (A/C). Dessa forma, a linearidade da faixa de aplicação foi definida como a razão área/concentração (A/C) pela concentração, com 5,0 % do desvio. Nas figuras 24 a 27, são apresentadas as curvas de linearidade (razão entre área/concentração vs. concentração). As curvas de linearidade mostram que os dados se ajustam a equação de reta, a qual tem um coeficiente angular, b, constante. Em todos os gráficos, observa-se a boa linearidade na faixa de trabalho estudada.

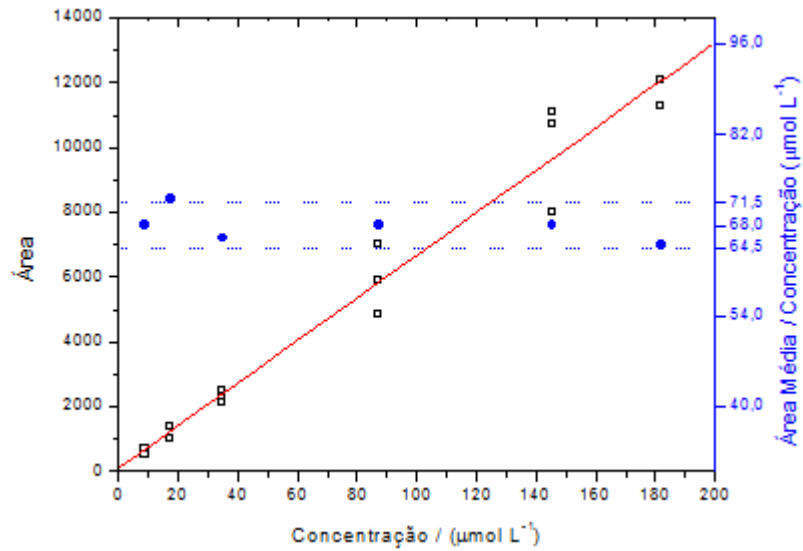
**Figura 24** – Curva analítica e gráfico de linearidade (razão área/concentração vs. concentração) do 3-OHDES



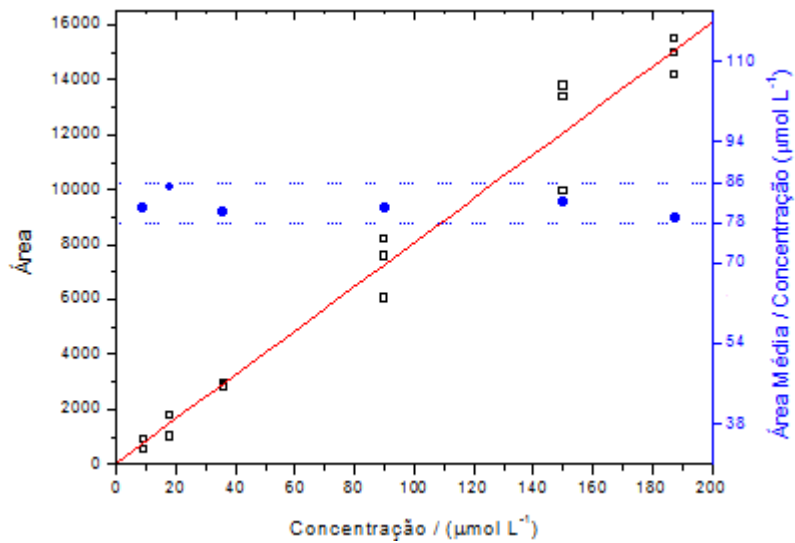
**Figura 25** – Curva analítica e gráfico de linearidade (razão área/concentração vs. concentração) do 3-OHDES



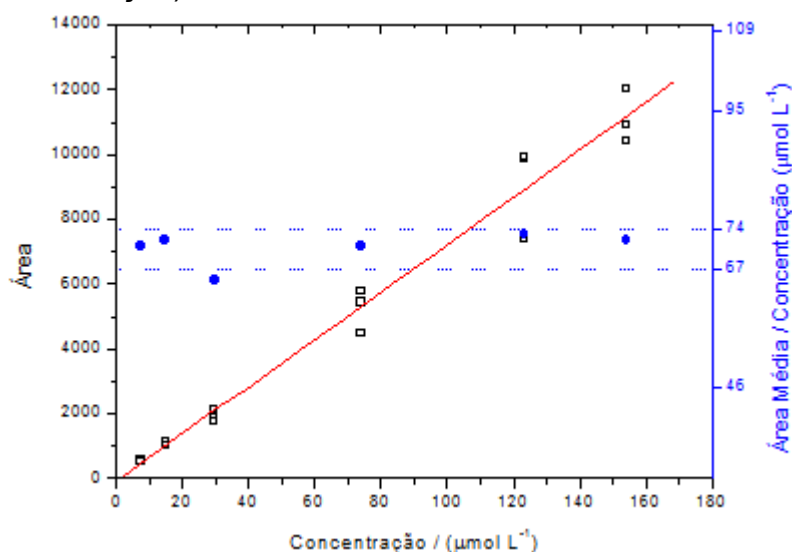
**Figura 26** – Curva analítica e gráfico de linearidade (razão área/concentração vs. concentração) do 3-OHTDS



**Figura 27** – Curva analítica e gráfico de linearidade (razão área/concentração vs. concentração) do 3-OHHDS



**Figura 28** – Curva referência e gráfico de linearidade (razão área/concentração vs. concentração) do 3-OHODS



Foram calculados os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) para os padrões segundo Anvisa (2015). Cujos valores encontram-se na tabela 4.

**Tabela 4** – Limites de detecção e quantificação para os 3-OHAGS silanizados

Padrões	Limite de Detecção	Limite de Quantificação
	μmol L <sup>-1</sup>	
3-OHDES	11,66	38,85
3-OHDDS	10,02	33,40
3-OHTDS	12,68	42,28
3-OHHDS	12,56	41,88
3-OHODS	9,92	33,06

Fonte: Próprio autor

### 5.2.2 Ensaios de Recuperação dos Analitos 3-OHAG

Os ensaios de recuperação possibilitaram a estimativa do fator de recuperação (R), apresentado na tabela 5. Como a eficiência do método varia em função da concentração do analito de interesse, foram selecionadas três diferentes concentrações considerando o limite inferior de quantificação, próximo à concentração máxima e à média da faixa de aplicação do método (ANVISA, 2015).

**Tabela 5** – Porcentagem de recuperação (R) dos 3-OHAG em três níveis de concentração, próximo ao valor inferior, intermediário e máximo da faixa de aplicação do método

3-OHAG	Porcentagem de recuperação dos 3-OHAG			Média	Desvio padrão relativo (%)
	Nível 01	Nível 02	Nível 03		
3-OHDE	79,3	84,7	90,8	84,9	5,8
3-OHDD	80,0	82,5	93,6	85,4	7,2
3-OHTD	79,5	87,7	94,0	87,1	7,3
3-OHHD	86,6	95,3	93,1	91,7	4,5
3-OHOD	88,3	95,1	98,8	94,1	5,3

**Fonte:** Próprio autor

Os dados apresentados de R entre 84,9 a 94,1 %, com precisão entre 4,5 a 7,3 %, encontraram-se em intervalo aceitável de recuperação entre 70 e 120 % (ANVISA, 2015).

### 5.3 DISTRIBUIÇÃO POR TAMANHO DE PARTÍCULA DO MATERIAL PARTICULADO EM AMBIENTE INTERNO

Frações grossa, fina e quase ultrafina de material particulado foram coletadas no ar interior de dois ambientes laborais: lavanderia do HU da UEL e em galpão de granja de frangos de corte. Foram medidas temperatura e umidade relativa ao longo dos períodos de amostragem. Temperatura e umidade relativa permaneceram constantes durante amostragem realizada na lavanderia. No entanto, por problemas técnicos, na granja de frangos de corte estes parâmetros foram perdidos, nesse caso foram utilizados dados do Sistema Meteorológico do Paraná (SIMEPAR) como parâmetro de referência.

#### 5.3.1 Lavanderia do Hospital Universitário da UEL

A amostragem do material particulado atmosférico (MP<sub>10</sub>; MP<sub>2,5</sub>; MP<sub>1,0</sub>; faixas >2,5 µm; 1,0-2,5 µm; 0,5-1,0 µm; 0,25-0,5 µm e <0,25 µm) foi conduzida no interior do

setor de separação e lavagem da lavanderia do hospital universitário da Universidade Estadual de Londrina. Os coletores impactador  $MP_{10}$ , ciclones  $MP_{2,5}$  e  $MP_{1,0}$  e impactador em cascata *Sioutas*, foram empregados em duplicata (A e B). Foram realizadas medidas de temperatura e umidade relativa, dados obtidos pelo monitor HOBO® U17-002 LCD da ONSET. Houveram poucas variações desses parâmetros, a temperatura oscilou entre 24 a 30 °C, enquanto a umidade relativa entre 57 a 80 %. Essa inexpressiva variação dos parâmetros pode relação com a pouca circulação de ar no local.

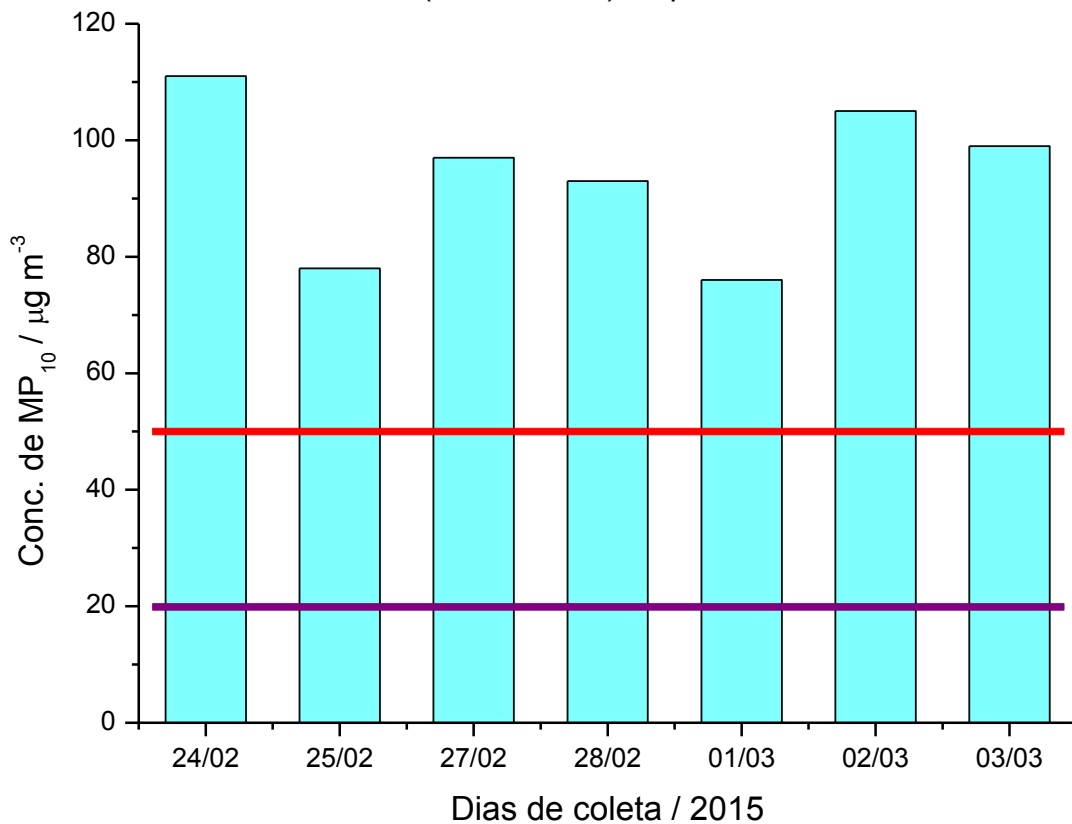
### ***MP<sub>10</sub>***

As coletas utilizando os impactadores  $MP_{10}$ , realizadas na lavanderia do HU, apresentaram faixa de concentração estimadas de 76 a 111  $\mu\text{g m}^{-3}$ . Os valores das concentrações obtidos entre as duplicatas apresentaram poucas variações ao longo do período de amostragem.

A figura 29 ilustra os dados (Média A e B) obtidos durante a coleta, as linhas vermelha e roxa representam os valores máximos de exposição recomendados pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2005). Sendo valor médio de 50  $\mu\text{g m}^{-3}$  para um período de 24 horas (Linha vermelha) e valor médio de 20  $\mu\text{g m}^{-3}$  durante o ano (Linha roxa).

Considerando os limites preconizados pela OMS, as concentrações de  $MP_{10}$  foram excedidas entre 1,5 e 4,7 vezes a média diária (24 horas), ou seja, sempre acima dos limites recomendados. Em relação para média anual, considerando a extrapolação desses dados, o valor foi excedido em 4,7 vezes. Esses dados apontam para um ambiente com baixa qualidade em termos MP grosso.

**Figura 29** – Perfil de concentração do MP<sub>10</sub> no interior da lavanderia do Hospital Universitário da UEL (Média A e B). Impactadores *Low-voI*



### **MP<sub>2,5</sub>**

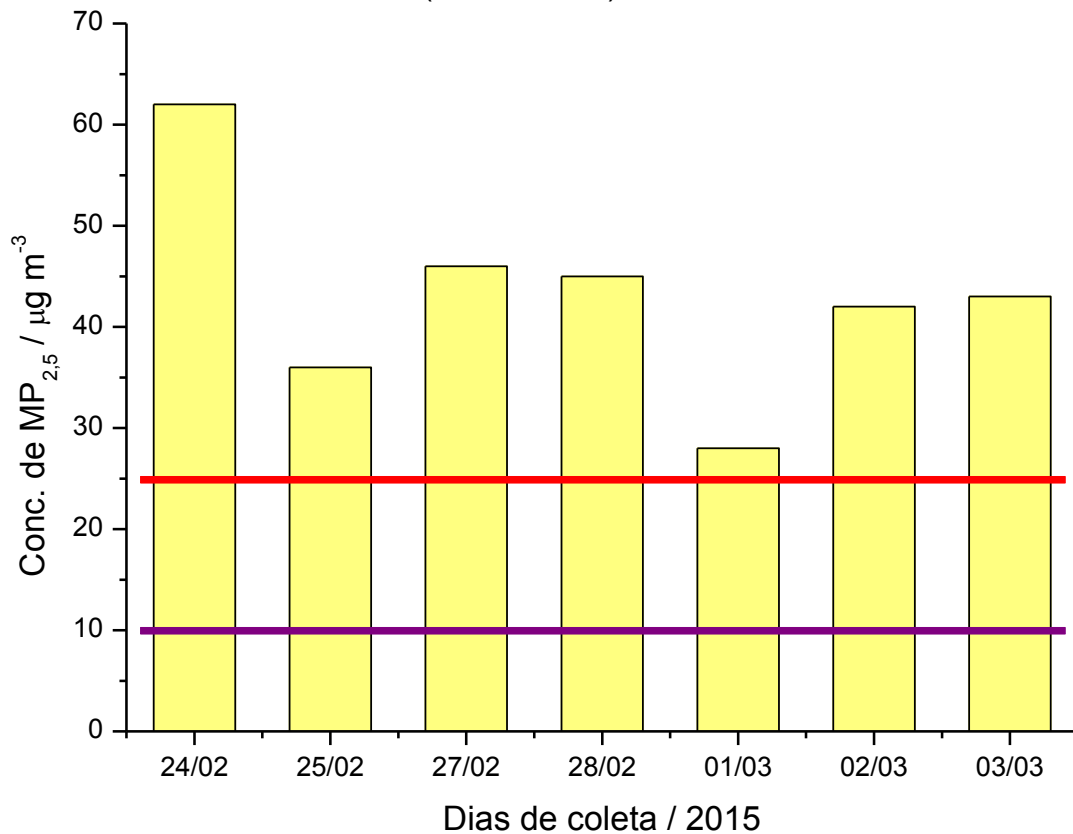
As coletas utilizando o amostrador ciclone MP<sub>2,5</sub> (partículas <2,5 µm) apresentaram concentração média de 43 µg m<sup>-3</sup>, desvio de ± 11,3 µg m<sup>-3</sup>, considerando a média das duplicatas A e B.

Na figura 30 é possível observar o perfil das concentrações durante o período de amostragem. As linhas vermelha e roxa, introduzidas na figura, indicam os valores máximos de exposição que a OMS recomenda para esse tamanho de partícula, sendo 25 µg m<sup>-3</sup> para uma média de 24 horas e 10 µg m<sup>-3</sup> para média anual, respectivamente (WHO, 2005). Avaliando esses dados de concentrações, é possível constatar que os limites recomendados pela OMS foram ultrapassados entre 1,1 a 2,5 vezes o valor médio de 24 horas e em 4,3 vezes a média anual, considerando a extrapolação desses dados.

Considerando investigação de outros ambientes hospitalares para MP<sub>2,5</sub>, as concentrações aqui encontradas foram até 76 % mais altas que o setor pediátrico, por

exemplo. Considerando que este foi o ambiente mais impactado para esse tamanho de partícula (LOMBOY et al., 2015).

**Figura 30** – Perfil de concentração do  $MP_{2,5}$  no interior da lavanderia do Hospital Universitário da UEL (Média A e B). Amostrador ciclone



### ***MP<sub>1,0</sub>***

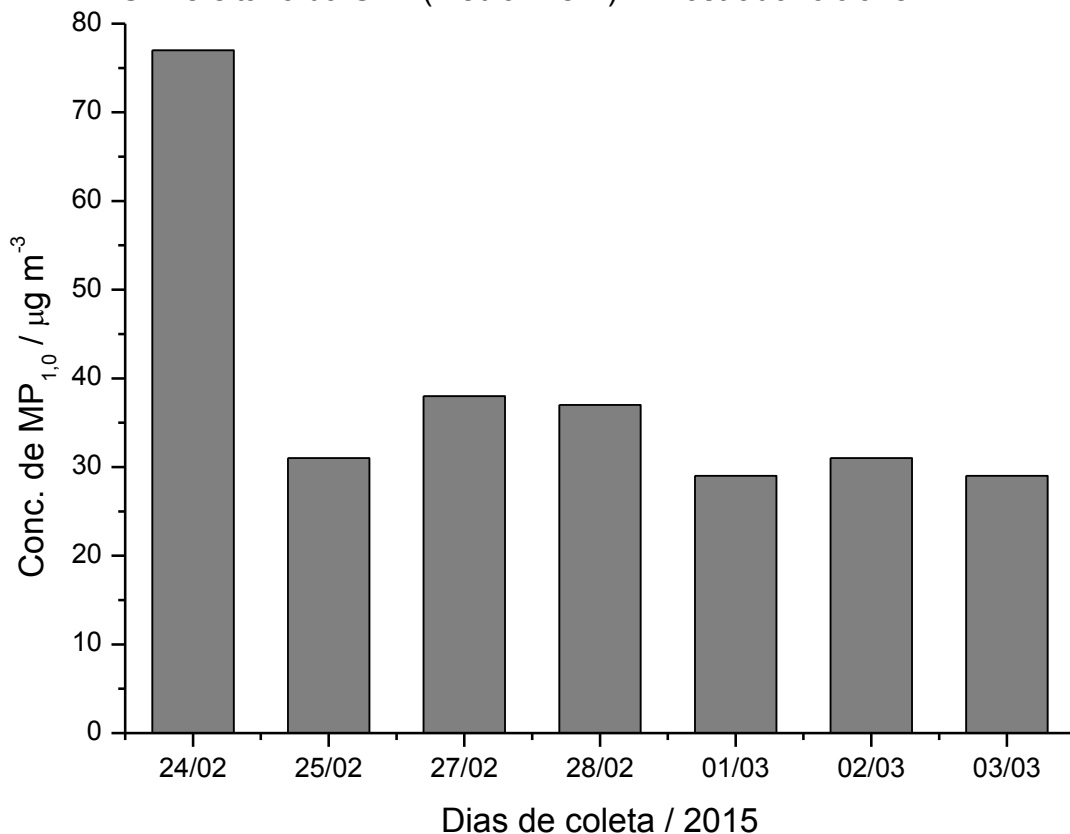
O material particulado  $< 1,0 \mu\text{m}$  ( $MP_{1,0}$ ) foi coletado utilizando o amostrador ciclone (Duplicata A e B), a faixa de concentração encontrada para esse tamanho de material particulado foi de 29 a  $38 \mu\text{g m}^{-3}$ . As duplicatas apresentaram pouca variação durante o período de coleta.

Os dados do dia 24/02 não foram considerados para efeito de comparação geral, pois foi verificado erro de amostragem. O erro observado pode, muito possivelmente, estar relacionado com a tomada amostral do volume de ar desse amostrador, considerando que as massas absolutas de  $MP_{1,0}$  obtidas nesta data de amostragem foram condizentes com as massas absolutas encontradas para  $MP_{2,5}$  e  $MP_{10}$ .

Embora haja estudos demonstrado que esse tamanho de partícula tem maior capacidade de penetração no trato respiratório inferior e possivelmente maior potencial de causar danos à saúde (SIOUTAS; DELFINO; SINGH, 2005), ainda não foram estabelecidos valores sobre os limites de exposição a esse tamanho de partícula.

A figura 31 ilustra o perfil do material particulado  $MP_{1,0}$  durante o período de coleta.

**Figura 31** – Perfil de concentração do  $MP_{1,0}$  no interior da lavanderia do Hospital Universitário da UEL (Média A e B). Amostrador ciclone

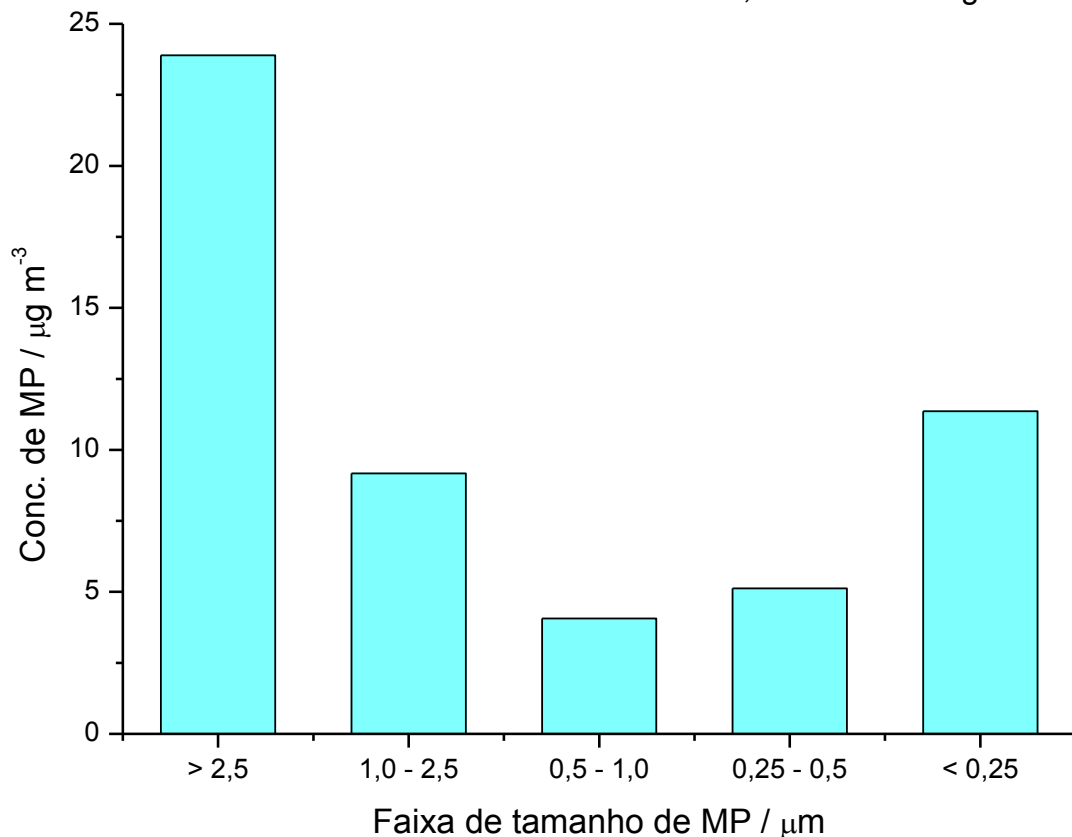


### ***Sioutas (amostragem integrada)***

O perfil de concentrações do MP nas frações do impactador em cascata *Sioutas* apresentaram a característica distribuição bimodal (Figura 32). Para a fração grossa do estágio A ( $>2,5 \mu\text{m}$ ) foi obtida concentração média de  $23,9 \mu\text{g m}^{-3}$  ( $24,5$  e  $23,3 \mu\text{g m}^{-3}$ ) e nas frações abaixo de  $< 2,5 \mu\text{m}$  foi obtida a concentração média de  $7,4 \mu\text{g m}^{-3}$ . Individualmente as frações apresentaram as seguintes concentrações: estágio B ( $1,0\text{-}2,5 \mu\text{m}$ ) média de  $9,2 \mu\text{g m}^{-3}$  ( $9,5$  e  $8,9 \mu\text{g m}^{-3}$ ); estágio C ( $0,5\text{-}1,0 \mu\text{m}$ ) média

de  $4,1 \mu\text{g m}^{-3}$  ( $2,0$  e  $6,2 \mu\text{g m}^{-3}$ ); estágio D ( $0,25$ - $0,5 \mu\text{m}$ ) média de  $5,1 \mu\text{g m}^{-3}$  ( $5,6$  e  $4,7 \mu\text{g m}^{-3}$ ) e estágio E ( $<0,25 \mu\text{m}$ ) com média de  $11,4 \mu\text{g m}^{-3}$  ( $10,4$  e  $12,3 \mu\text{g m}^{-3}$ ).

**Figura 32** – Distribuição por tamanho do MP no interior da lavanderia do Hospital Universitário da UEL. Impactador de cascata *Sioutas* (Média A e B). Período de coleta de 24/02 a 03/03 de 2015, única amostragem



Como o amostrador *Sioutas* necessita períodos longos de amostragem para acumulo de massa, para essa amostragem foram 62 horas, os dados desse amostrador não foram comparados com os demais amostradores (Ciclones e *LowVol*  $\text{MP}_{10}$ ).

Na tabela 6 estão os dados do MP coletado na lavanderia do HU ( $\text{MP}_{1,0}$ ,  $\text{MP}_{2,5}$ ,  $\text{MP}_{10}$  e *Sioutas*). A fração fina do MP ( $< \text{MP}_{2,5}$ ) correspondeu à 47% do MP grosso ( $< \text{MP}_{10}$ ). Como o ambiente era higienizado diariamente, pode-se inferir que a origem do MP no ar interior da lavanderia teve origem na manipulação do vestuário levado ao local para lavagem. O vestuário era classificado manualmente, sendo lançado ao chão para separação em lotes. Não foi visualmente identificada outra fonte de MP, uma vez que as janelas são de tamanho reduzido, situadas no alto das paredes

(Aproximadamente 3 metros de altura) e permaneceram constantemente semiabertas.

**Tabela 6** – Dados das concentrações do material particulado encontrados na lavanderia do HU utilizando os amostradores MP<sub>1,0</sub>, MP<sub>2,5</sub>, MP<sub>10</sub> e *Sioutas*

Tamanho do MP	Intervalo de concentração	Média	Desvio
	$\mu\text{g m}^{-3}$	$\mu\text{g m}^{-3}$	$\mu\text{g m}^{-3}$
<b>MP<sub>1,0</sub> A*</b>	27,7 – 40,3	33,7	± 4,6
<b>MP<sub>1,0</sub> B*</b>	27,1 – 37,5	31,2	± 4,1
<b>MP<sub>1,0</sub> A* e B*</b>	27,1 – 40,3	32,5	± 4,3
<b>MP<sub>2,5</sub> A</b>	23,0 – 72,6	45,2	± 15,2
<b>MP<sub>2,5</sub> B</b>	32,5 – 52,3	41,2	± 6,1
<b>MP<sub>2,5</sub> A e B</b>	23,0 – 72,6	43,2	± 11,28
<b>MP<sub>10</sub> A</b>	76,1 – 105,5	92,8	± 12,0
<b>MP<sub>10</sub> B</b>	75,7 – 125,1	95,4	± 16,3
<b>MP<sub>10</sub> A e B</b>	75,6 – 125,1	94,1	± 13,83
<b><i>Sioutas</i> A e B &gt; 2,5 <math>\mu\text{m}</math></b>	23,3 – 24,5	23,9	± 0,9
<b><i>Sioutas</i> A e B 1,0 a 2,5 <math>\mu\text{m}</math></b>	8,9 – 9,5	9,2	± 0,4
<b><i>Sioutas</i> A e B 0,5 a 1,0 <math>\mu\text{m}</math></b>	2,0 – 6,2	4,1	± 3,0
<b><i>Sioutas</i> A e B 0,25 a 0,5 <math>\mu\text{m}</math></b>	4,7 – 5,6	5,1	± 0,6
<b><i>Sioutas</i> A e B &lt; 0,25 <math>\mu\text{m}</math></b>	10,4 – 12,3	11,4	± 1,3

Fonte: Próprio autor

\* foram desconsiderados os dados do dia 24/02

A exposição dos trabalhadores aos altos níveis de MP grosso e fino neste ambiente pode ser considerada preocupante, uma vez que os limites recomendados foram extrapolados durante todo período de coleta. Considerando que a permanência dos trabalhadores nesse ambiente é inerente a sua atividade, a exposição crônica ao MP é outro ponto importante de ser observado. Uma vez que longos períodos de exposição ao material particulado podem causar efeitos adversos ligados ao sistema respiratório (ATKINSON, et al., 2001) e complicações cardiovascular (LIPPMANN, 2014). Além disso, estudos apontam que  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  de incremento no  $\text{MP}_{2,5}$ , por exemplo, esteja associado a 4 % de todos os casos de mortalidade (HIME; COWIE; MARKS, 2015).

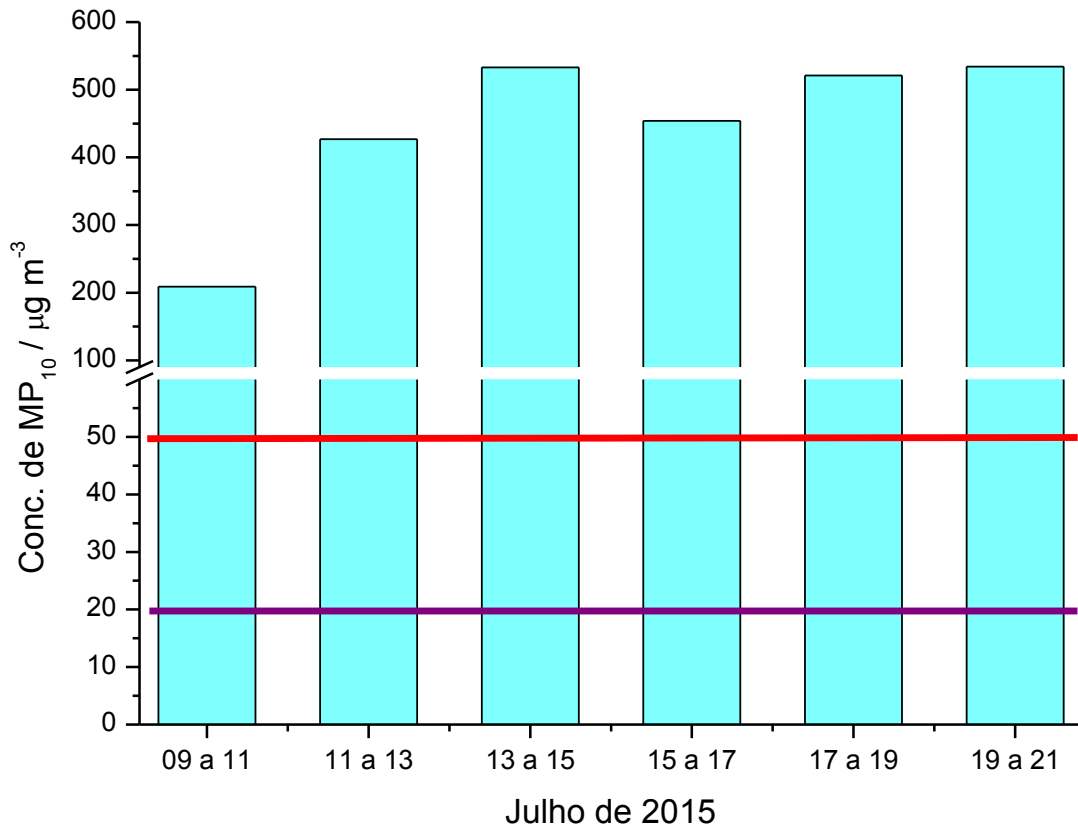
### 5.3.2 Granja de Frangos de Corte

A amostragem do material particulado atmosférico ( $\text{MP}_{10}$ ;  $\text{MP}_{2,5}$ ;  $\text{MP}_{1,0}$ ; faixas  $>2,5 \mu\text{m}$ ;  $1,0-2,5 \mu\text{m}$ ;  $0,5-1,0 \mu\text{m}$ ;  $0,25-0,5 \mu\text{m}$  e  $<0,25 \mu\text{m}$ ) foi conduzida no interior de uma granja de frangos de corte. Por falha do equipamento HOBO® U17-002 LCD da ONSET, medidas de temperatura e umidade relativa coletadas foram perdidas. Sendo assim, por ser ambiente semiaberto, foram empregados dados do SIMEPAR como parâmetro de referência. Variações no período entre 16 a 22 °C para temperatura, e entre 71 a 97 % para umidade relativa.

#### ***MP<sub>10</sub>***

A coleta utilizando o amostrador  $\text{MP}_{10}$ , efetivada na granja de frangos de corte, apresentou concentração média de  $446 \mu\text{g m}^{-3}$ . Conforme dados meteorológicos fornecidos pelo SIMEPAR, nos dias 10, 16 e 17 houve ocorrência de chuvas. Observa-se que o aumento de umidade externa pode ter levado à diminuição na concentração do  $\text{MP}_{10}$  uma vez que a origem da fração grossa do MP pode também ser externa.

A figura 33 ilustra o perfil, em termos de concentração, do  $\text{MP}_{10}$  coletado. Nas linhas vermelha e roxa estão os valores máximos de exposição recomendados pela OMS (WHO, 2005). Sendo valor médio de  $50 \mu\text{g m}^{-3}$  para um período de 24 horas (Linha vermelha) e valor médio de  $20 \mu\text{g m}^{-3}$  durante o ano (Linha roxa).

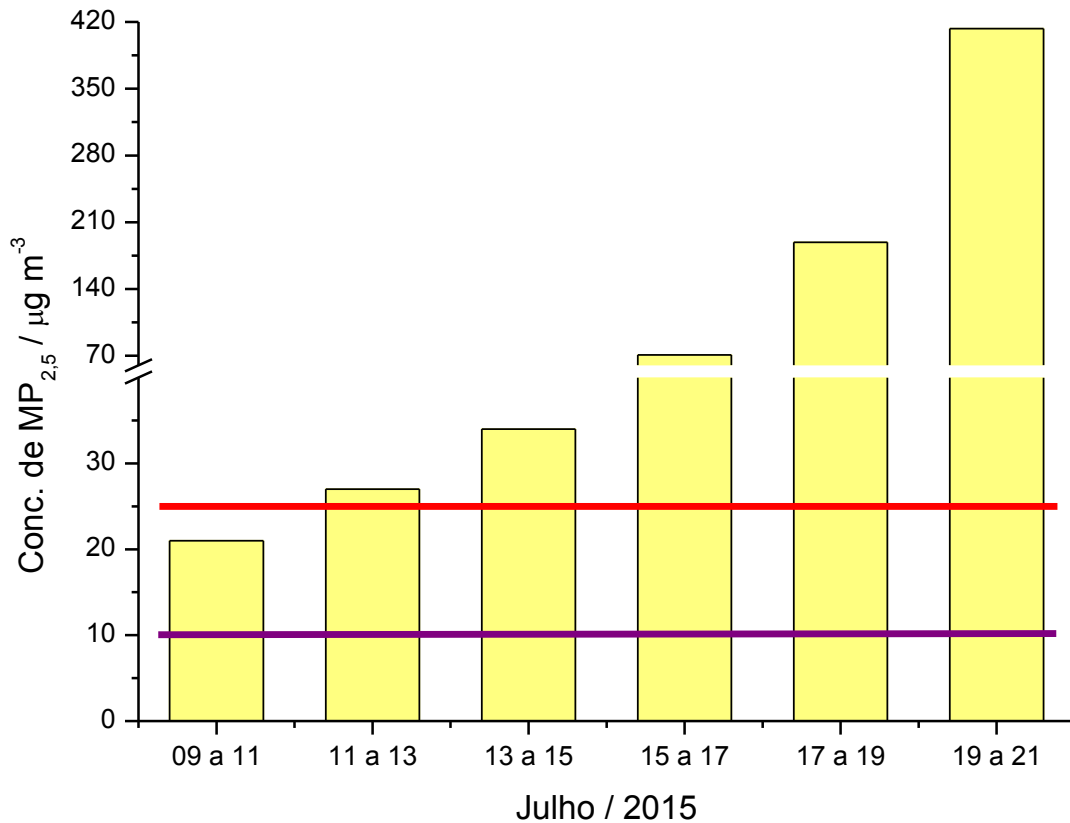
**Figura 33** – Concentração de  $MP_{10}$  no interior do galpão de frangos de corte

As concentrações encontradas estão em níveis elevados. Para efeito de comparação, os limites recomendados pela OMS a esse tamanho de partícula, foram excedidos entre 4,2 a 10,7 vezes a média diária (24 horas). Em relação à média anual, considerando a extrapolação desses dados, o valor foi de 22,3 vezes acima do preconizado. Esses dados apontam para um ambiente com baixíssima qualidade de ar em termos MP grosso.

### ***MP<sub>2,5</sub>***

A coleta utilizando o amostrador ciclone  $MP_{2,5}$  (partículas < 2,5  $\mu\text{m}$ ) apresentou concentração média de 126  $\mu\text{g m}^{-3}$ . A figura 34 ilustra o perfil, em termos de concentração, do  $MP_{2,5}$  coletado. Nas linhas vermelha e roxa estão os valores máximos de exposição recomendados pela OMS (WHO, 2005).

**Figura 34** – Perfil de concentração do MP<sub>2,5</sub> no interior da granja de frangos de corte



Diferentemente do ocorrido com as partículas grossas (MP<sub>10</sub>), pouca variação da concentração, no MP<sub>2,5</sub> houve forte tendência de crescimento. Na fase final da coleta, a concentração foi praticamente 20 vezes superior em relação à fase inicial.

Os dados amostrados foram relativamente baixos nos primeiros dias de coleta (21 µg m<sup>-3</sup>), levemente abaixo do recomendado pela OMS para uma média de 24 horas (25 µg m<sup>-3</sup>). Porém, no decorrer da amostragem os níveis de concentração de MP<sub>2,5</sub> se elevaram bastantes, chegando ao alarmante 413 µg m<sup>-3</sup>, 16,5 vezes acima da concentração recomendada pela OMS para esse tamanho de partícula (Média de 24 horas). Já em relação à média anual, considerando a extrapolação desses dados, o ambiente estava 12,6 vezes acima do valor pedido pela OMS (10 µg m<sup>-3</sup>).

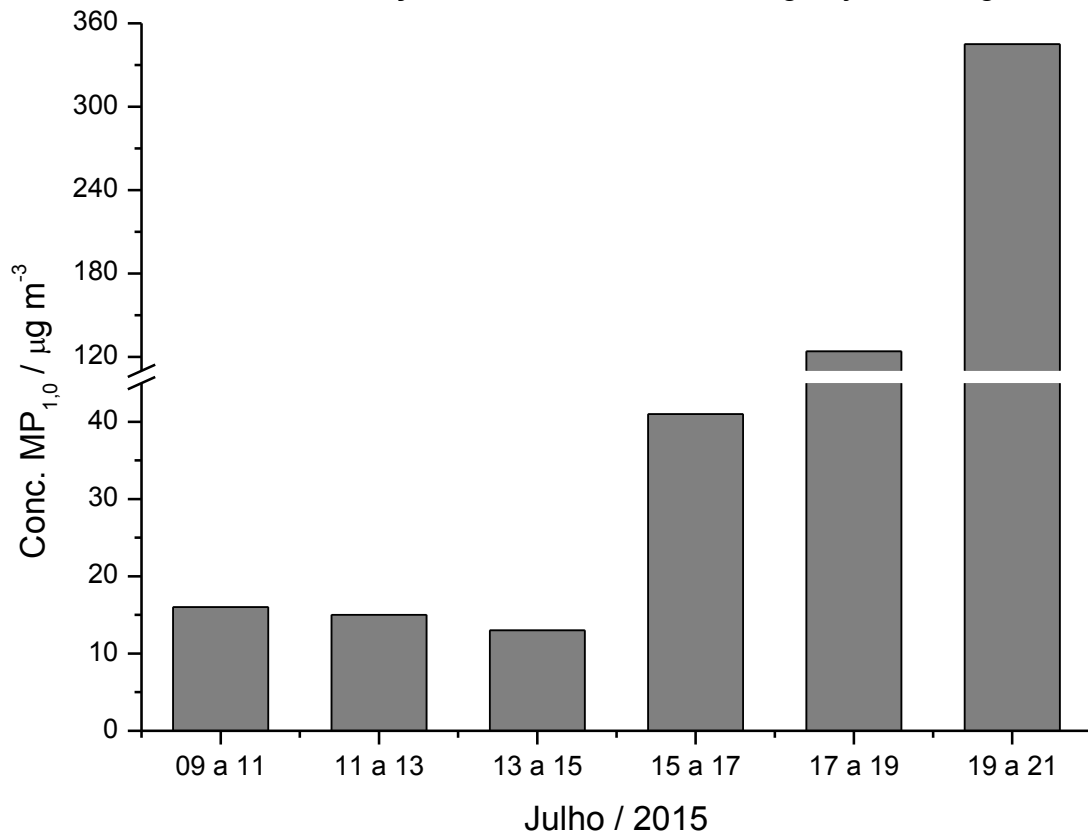
Órgãos internacionais recomendam paralização imediata das atividades laborais em ambiente onde a qualidade do ar apresenta elevado risco à saúde humana como as encontradas nesse local (US-EPA, 2015).

#### **MP<sub>1,0</sub>**

A coleta utilizando o amostrador MP<sub>1,0</sub>, efetivada na granja de frangos de corte, apresentou concentração média de 92 µg m<sup>-3</sup>. O perfil de concentração foi

similar ao pelo  $MP_{2,5}$  (Figura 35). No início a concentração esteve relativamente baixa ( $16 \mu\text{g m}^{-3}$ ), aumentando posteriormente para algo próximo de 21 vezes o valor da concentração inicial ( $334 \mu\text{g m}^{-3}$ ).

**Figura 35** – Perfil de concentração do  $MP_{1,0}$  no interior da granja de frangos de corte



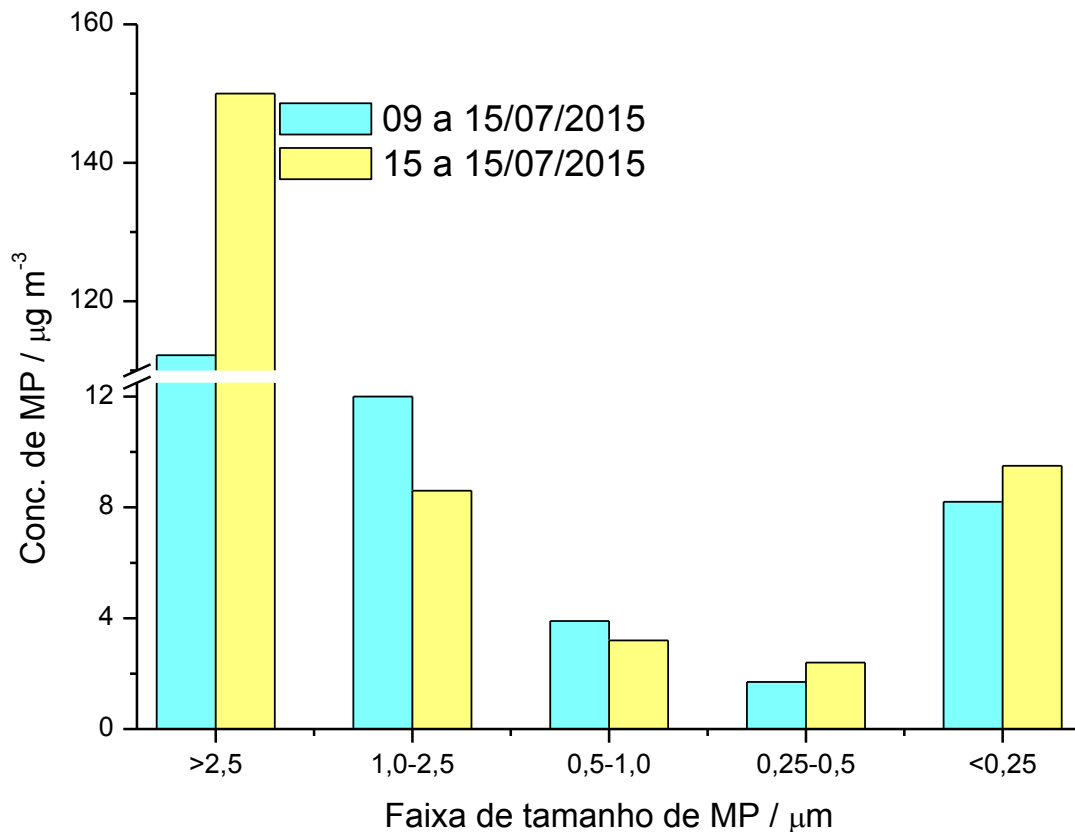
A ocorrência de chuvas nos dias 10, 16 e 17 não alterou o perfil de concentração do MP fino, este fato pode ser entendido no sentido de que as partículas finas possuem origens exclusivamente interna. Considerando que o  $MP_{1,0}$  está contido no  $MP_{2,5}$ , e confrontadas seus dados de concentrações, foi possível observar que  $MP_{1,0}$  contribui significativamente na formação de  $MP_{2,5}$ , exceto na coleta 13/15. No geral,  $MP_{1,0}$  representou mais de 50 %  $MP_{2,5}$ .

Parâmetro legislativo deixam de contemplar o  $MP_{1,0}$  no tocante aos limites de exposição, no entanto, estudos assinalaram que quanto mais finas são as partículas, maior será sua capacidade em penetrar profundamente no sistema respiratório (CROWDER et al., 2002; SIOUTAS; DELFINO; SINGH, 2005).

***Impactador Sioutas (amostragem integrada)***

Os resultados obtidos utilizando o impactador *Sioutas* apresentaram perfil típico bimodal na distribuição de concentração (FREITAS; SOLCI, 2009; PLAZA et al., 2011). Sendo maior contribuição percentual do estágio A ( $> 2,5 \mu\text{m}$ ), material particulado grosso, decresceu até o estágio D ( $0,25$  a  $0,50 \mu\text{m}$ ) e invertendo a tendência decrescente no estágio pós-filtro ( $< 0,25 \mu\text{m}$ ). Em termos de percentual a distribuição foi 84,1 % no estágio A, 6,6 % estágio B, 2,3 % estágio C, 1,3 % estágio D e 5,7 % no pós-filtro. A figura 36 ilustra o perfil de distribuição ( $\mu\text{g m}^{-3}$ ) obtido pelo coletor *Sioutas* no interior da granja de frango de corte.

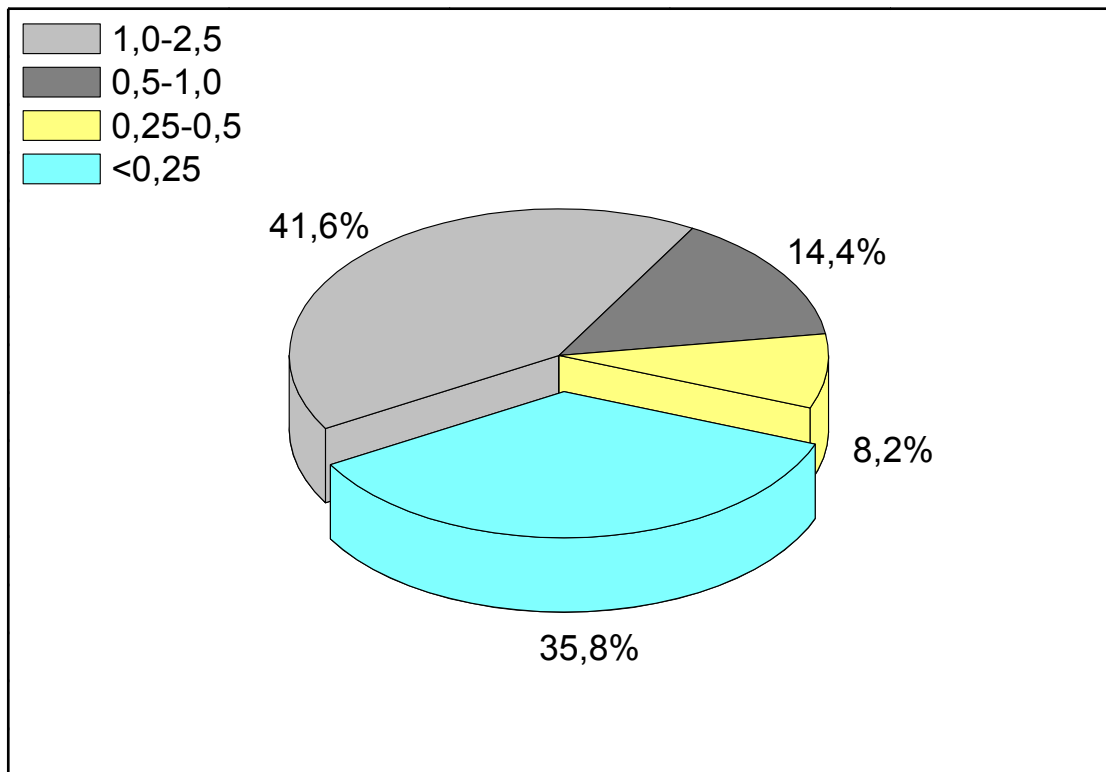
**Figura 36** – Distribuição por tamanho do MP no interior da granja de frangos de corte. Impactador de cascata *Sioutas*. Período de coleta de 09 a 15/06 e 15 a 19/06 de 2015



Desconsiderando a fração grossa, estágio A, e analisando somente as frações finas (Estágios B, C, D e pós-filtro), foi observado que faixa de menor tamanho de partícula ( $< 0,25 \mu\text{m}$ ) contribuiu com 36 % do total (Figura 37). Esses dados corroboram com observado na relação entre  $\text{MP}_{2,5}$  e  $\text{MP}_{1,0}$ , indicando maior contribuição das partículas finas no MP. Um ambiente laboral com esse perfil pode

ser potencialmente aos trabalhadores desse local, considerando o poder de alcance no trato respiratório inferior dessas partículas finas (CROWDER et al., 2002).

**Figura 37** – Gráfico representativo do percentual de contribuição de cada faixa de tamanho de MP das partículas finas coletadas no impactador *Sioutas*



### **Correlação de Pearson**

A correlação de Pearson foi usada para inferir sobre a origem do material particulado grosso e fino no ar interno do galpão de frangos de corte. Foram correlacionadas as concentrações de  $MP_{10}$ ,  $MP_{2,5}$  e  $MP_{1,0}$ . Foi observada correlação forte (0,99) entre  $MP_{2,5}$  e  $MP_{1,0}$ , sugerindo mesma origem para esses dois tamanhos de partículas.

As correlações observadas tanto entre  $MP_{10}$  e  $MP_{1,0}$  (0,45), quanto entre  $MP_{10}$  e  $MP_{2,5}$  (0,50), foram correlações moderadas. Isso se deve, possivelmente, a contribuição de fonte externa da fração grossa, já que existe forte relação entre as frações finas ( $MP_{2,5}$  e  $MP_{1,0}$ ). Na fonte interna o solo do galpão, coberto com forração natural (serragem, cascas de café, arroz etc.), também pode ter contribuído para fração grossas.

Na tabela 7 estão os dados do MP coletado na granja de frango de corte (MP<sub>1,0</sub>, MP<sub>2,5</sub>, MP<sub>10</sub> e *Sioutas*). O período de crescimento das aves aparenta estar ligado ao aumento na concentração de MP fino. Seria necessário fazer um acompanhamento do desenvolvimento da massa corpórea das aves para averiguação.

**Tabela 7** – Dados das concentrações do material particulado encontrados na granja de frango de corte utilizando os amostradores MP<sub>1,0</sub>, MP<sub>2,5</sub>, MP<sub>10</sub> e *Sioutas*

Tamanho do MP	Intervalo de concentração	Média	Desvio
	$\mu\text{mg m}^{-3}$	$\mu\text{mg m}^{-3}$	$\mu\text{mg m}^{-3}$
MP <sub>1,0</sub>	13 – 345	92	± 131
MP <sub>2,5</sub>	21 – 413	126	± 154
MP <sub>10</sub>	209 – 534	446	± 124
<i>Sioutas</i> A* e B** > 2,5 $\mu\text{m}$	112,2 – 150,0	131,1	± 26,8
<i>Sioutas</i> A* e B** 1,0 a 2,5 $\mu\text{m}$	8,6 – 12	10,3	± 2,4
<i>Sioutas</i> A* e B** 0,5 a 1,0 $\mu\text{m}$	3,2 – 3,9	3,6	± 0,5
<i>Sioutas</i> A* e B** 0,25 a 0,5 $\mu\text{m}$	1,7 – 2,4	2,0	± 0,5
<i>Sioutas</i> A* e B** < 0,25 $\mu\text{m}$	8,2 – 9,5	8,9	± 0,9

Fonte: Próprio autor

\* coleta 09 a 15 do 07; \*\* coleta 15 a 19 do 07

A exposição dos trabalhadores aos altos níveis de MP grosso e fino neste ambiente pode ser considerada preocupante, os limites recomendados pela OMS foram extrapolados durante todo período de coleta. Como permanecer nesse ambiente é inerente a atividade do trabalhador, a exposição crônica também deve ser observada. Pois, longos períodos de exposição ao material particulado podem causar efeitos adversos ligados ao sistema respiratório (ATKINSON, et al., 2001) e complicações cardiovascular (LIPPMANN, 2014). Além disso, estudos apontam que  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  de incremento no  $\text{MP}_{2,5}$ , por exemplo, esteja associado a 4 % de todos os casos de mortalidade (HIME; COWIE; MARKS, 2015).

#### 5.4 ENDOTOXINA ASSOCIADA AO MATERIAL PARTICULADO ATMOSFÉRICO

Endotoxinas associadas ao material particulado grosso, fino e quase ultrafino foram coletadas no ar interior de dois ambientes laborais: lavanderia do HU da UEL e em galpão de granja de frangos de corte. Foram medidas temperatura e umidade relativa ao longo dos períodos de amostragem. Temperatura e umidade relativa permaneceram constantes durante amostragem realizada na lavanderia. No entanto, por problemas técnicos, na granja de frangos de corte estes parâmetros foram perdidos, nesse caso foram utilizados dados do Sistema Meteorológico do Paraná (SIMEPAR) como parâmetro de referência.

##### 5.4.1 Lavanderia do Hospital Universitário da UEL

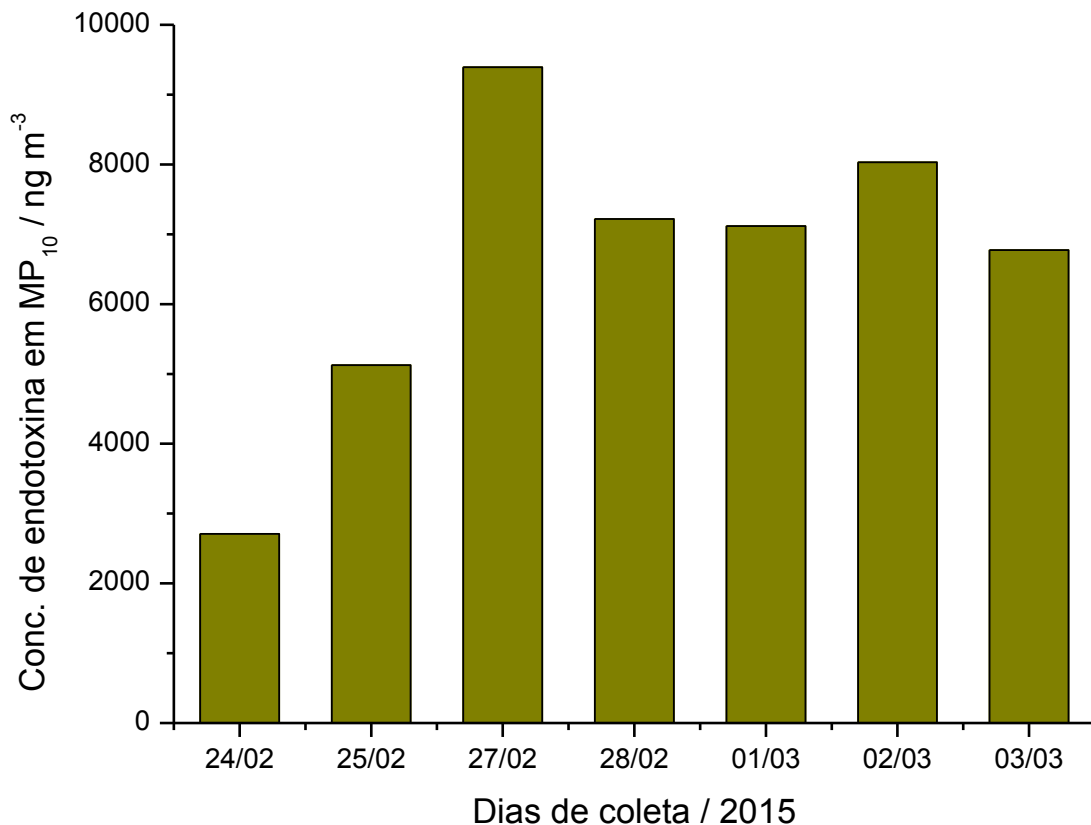
A amostragem de endotoxina associada ao material particulado atmosférico ( $\text{MP}_{10}$ ;  $\text{MP}_{2,5}$ ;  $\text{MP}_{1,0}$ ; faixas  $>2,5 \mu\text{m}$ ;  $1,0-2,5 \mu\text{m}$ ;  $0,5-1,0 \mu\text{m}$ ;  $0,25-0,5 \mu\text{m}$  e  $<0,25 \mu\text{m}$ ) foi conduzida no interior do setor de separação e lavagem da lavanderia do hospital universitário da Universidade Estadual de Londrina. Os coletores impactador  $\text{MP}_{10}$ , ciclones  $\text{MP}_{2,5}$  e  $\text{MP}_{1,0}$  e impactador em cascata *Sioutas*, foram empregados em duplicata (A e B). Foram realizadas medidas de temperatura e umidade relativa, dados obtidos pelo monitor HOBO® U17-002 LCD da ONSET. Houveram poucas variações desses parâmetros, a temperatura oscilou entre 24 a 30 °C, enquanto a umidade

relativa entre 57 a 80 %. Essa inexpressiva variação dos parâmetros pode relação com a pouca circulação de ar no local.

### **MP<sub>10</sub>**

Amostragem de endotoxina associada ao material particulado < 10  $\mu\text{m}$  foi realizada através impactador *Low-vo/* MP<sub>10</sub> em duplicada (A e B). Dados aqui apresentados são referente as médias das duplicatas. As coletas foram efetuadas durante expediente de trabalho da lavanderia. A figura 38 apresenta o perfil de concentração de endotoxina associada ao MP<sub>10</sub> encontra na lavanderia do HU.

**Figura 38** – Perfil de concentração de endotoxinas (MP<sub>10</sub>) no interior da lavanderia do Hospital Universitário da UEL. Impactadores *Low-vo/* (A e B) em paralelo

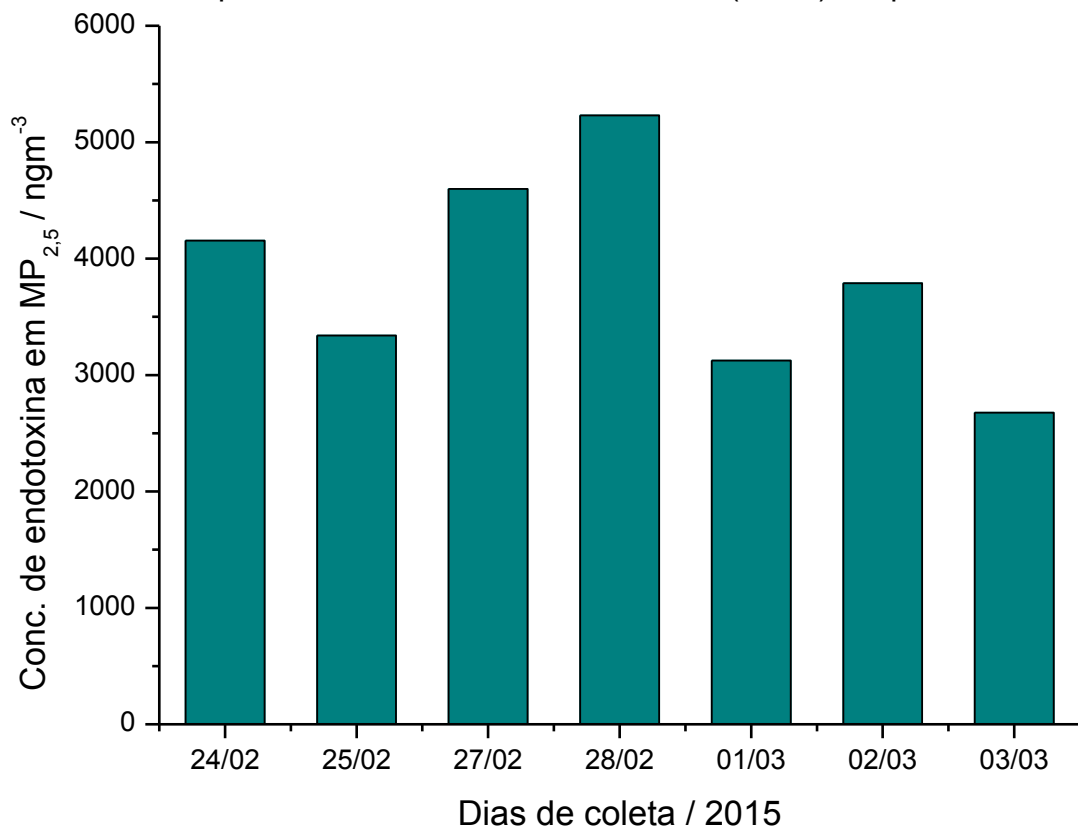


A concentração média de endotoxina encontrada associada a esse tamanho de partícula ficou acima de 6.500 ng m<sup>-3</sup>. Os extremos de concentração foram no dia 24 (2.710 ng m<sup>-3</sup>) e dia 27 (9.393 ng m<sup>-3</sup>), a menor concentração de endotoxina no dia 24, possivelmente, deve estar relacionado com a menor quantidade de roupas lavadas nessa data.

**MP<sub>2,5</sub>**

As coletas de endotoxinas associadas as partículas finas ( $< 2,5 \mu\text{m}$ ), foram realizadas utilizando amostrador ciclone MP<sub>2,5</sub> em duplicada (A e B). Dados aqui apresentados são referente as médias das duplicatas. A figura 39 apresenta o perfil de concentração do LPS associado a fração fina nesse tamanho de particulado.

**Figura 39** – Perfil de concentração de endotoxinas (MP<sub>2,5</sub>) no interior da lavanderia do Hospital Universitário da UEL. Ciclones (A e B) em paralelo



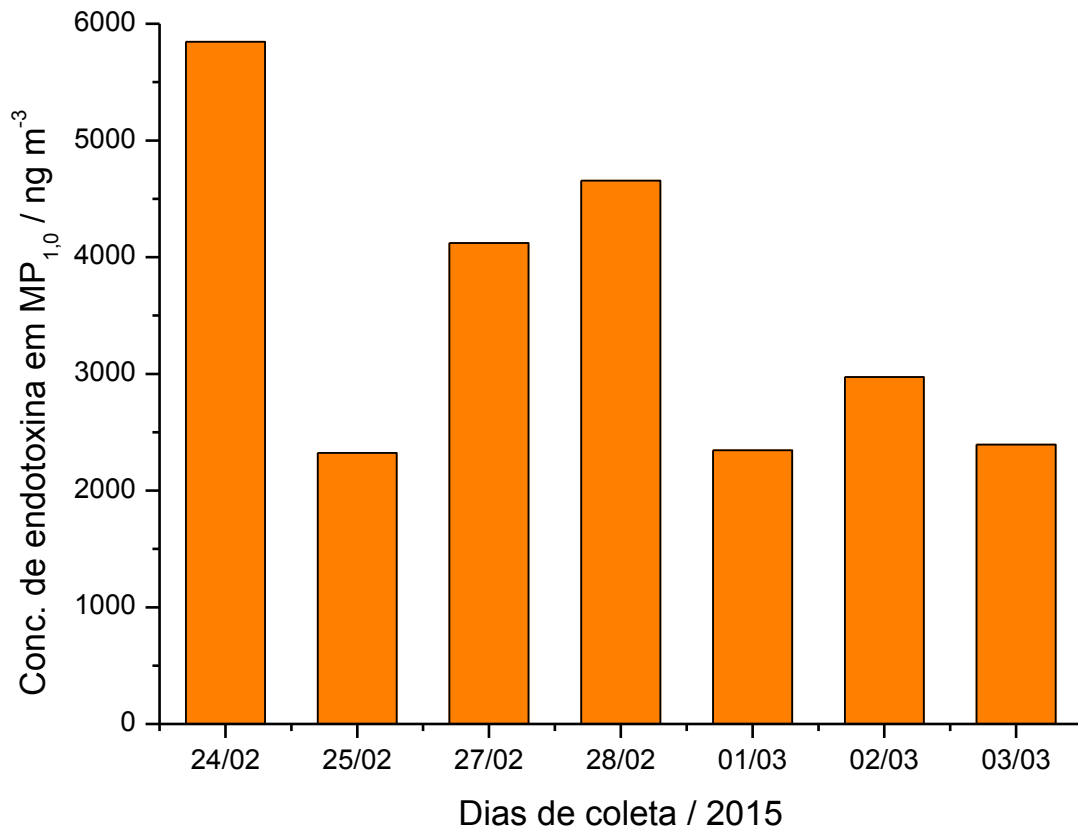
A concentração média de endotoxinas encontradas nas partículas finas (3.844 ng m<sup>-3</sup>), representa 58 % da concentração média encontrada nas partículas grossas (MP<sub>10</sub>). Isso implica que o MP grosso possui mais da metade de sua concentração de endotoxina associada a partícula de tamanho  $< 2,5 \mu\text{m}$ . Com isso, esse LPS associado ao MP<sub>10</sub>, mesmo se tratando de partículas grossas, apresenta considerável potencial para afetar a saúde, lembrando que partículas menores possui mais habilidade em adentrar no trato respiratório inferior.

**MP<sub>1,0</sub>**

Coletas de endotoxinas associadas as partículas finas ( $< 1,0 \mu\text{m}$ ), foram realizadas utilizando amostrador ciclone MP<sub>1,0</sub> em duplicada (A e B). Dessa forma,

dados aqui apresentados são referentes as médias das duplicatas. A figura 40 ilustra o perfil de concentração do LPS associado a fração fina desse material particulado.

**Figura 40** – Perfil de concentração de endotoxinas ( $MP_{1,0}$ ) no interior da lavanderia do Hospital Universitário da UEL. Ciclones (A e B) em paralelo



Como reportado anteriormente (Seção 5.3.1), dados do dia 24/02 não foram considerados para efeito de comparação geral, quando foi constatado erro de amostragem.

A concentração média de endotoxina encontrada associada ao  $MP_{1,0}$  foi  $3.135\ ng\ m^{-3}$ . Essa concentração corresponde um pouco mais de 80 % do valor médio encontrado para  $MP_{2,5}$  e 47 % para  $MP_{10}$ . Dados semelhantes foram encontrados nas concentrações médias do material particulado, quando foi observado que o MP encontrado neste ambiente é constituído majoritariamente das partículas mais finas.

Para todos os tamanhos de material particulado, os níveis de endotoxina encontrados neste ambiente de trabalho foram, em média, muito elevados considerando a recomendação do *Dutch Expert Committee on Occupational Safety*, 2010 (DECOS), que é de  $9\ ng\ m^{-3}$  ( $90\ EU\ m^{-3}$ ) como limite de exposição ocupacional

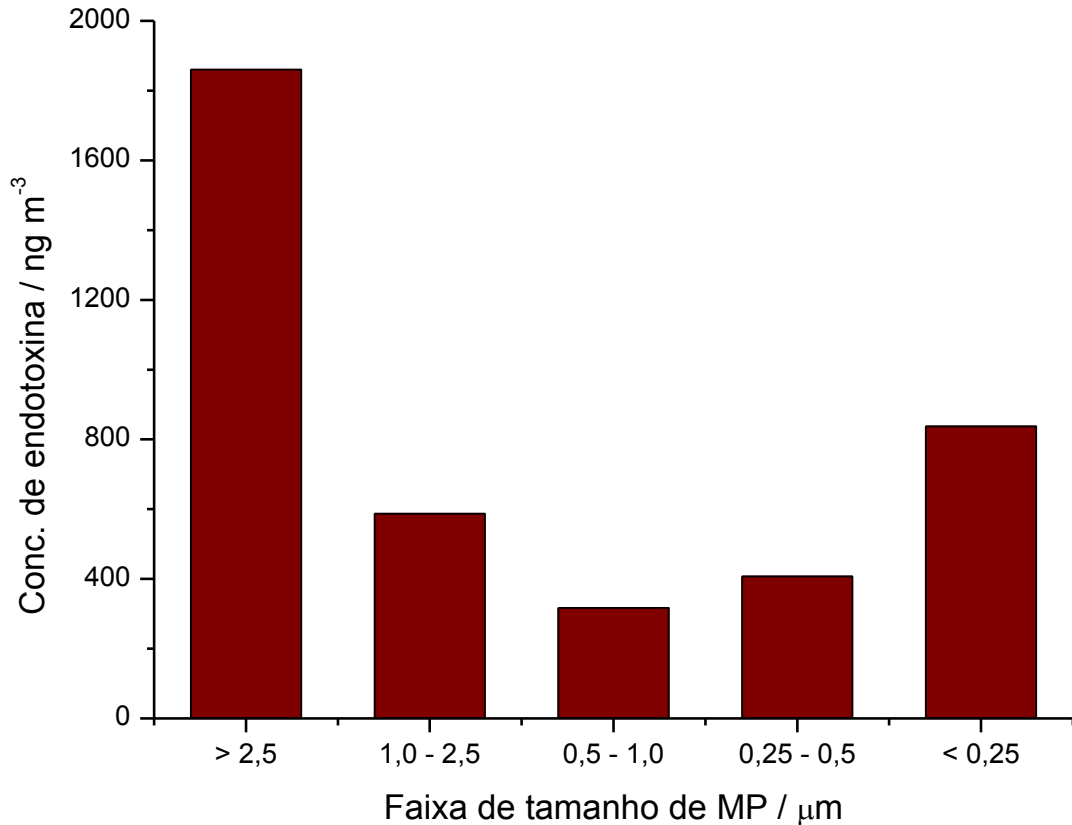
(DUQUENNE et al., 2013). As partículas grossas (MP<sub>10</sub>) excederam em 736 vezes esse limite, enquanto as finas (MP<sub>2,5</sub> e MP<sub>1,0</sub>) extrapolaram em 427 e 348 vezes, respectivamente.

Embora, os efeitos adversos causados a saúde pelas endotoxinas dependam dos níveis de concentrações no MP, também deve ser considerado o forte alcance das partículas finas no sistema respiratório. Pelos dados encontrados neste local, concentrações de endotoxinas associadas a partículas grossas possuem alta contribuição das associadas a partículas finas, fazendo com que o LPS associado ao PM grosso possa ser considerado potencialmente “equivalente” ao MP fino.

#### ***Sioutas (amostragem integrada)***

A amostragem com o coletor *Sioutas* foi conduzida de forma integrada com 63 horas de duração, em duplicada (A e B). Este procedimento foi necessário devido à pequena área superficial de coleta nos diferentes estágios do impactador. Endotoxina foi determinada em todas as frações coletadas. A figura 41 apresenta os dados obtidos. Na fração grossa (> 2,5 µm), a concentração média de endotoxina encontrada foi de 1.860 ng m<sup>-3</sup>.

**Figura 41** – Concentração de endotoxina por faixa de tamanho do MP no interior da lavanderia do Hospital Universitário da UEL. Impactador de cascata *Sioutas* (A e B) em paralelo. Período de coleta de 24/02 a 03/03 de 2015, única amostragem



Nas frações intermediárias (0,25 a 2,5  $\mu\text{m}$ ), em média, as concentrações de LPS foi de 437  $\text{ng m}^{-3}$ . Já para o pós-filtro, que compreende a fração ultrafina do MP (< 0,1), a média de concentração foi de 837  $\text{ng m}^{-3}$ .

A distribuição por tamanho do MP obtida através do uso do impactador *Sioutas* mostra a tendência bimodal que é característica do MP atmosférico. Estes dados devem ainda ser analisados cautelosamente pois o excessivo tempo de coleta pode ser fator importante para a formação de artefato negativo. De qualquer forma, as concentrações de endotoxina encontradas neste ambiente laboral excedem qualquer recomendação para limites de exposição de um trabalhador (DUQUENNE et al., 2013).

A tabela 8 traz os dados das endotoxinas associadas ao material particulado ( $\text{MP}_{1,0}$ ,  $\text{MP}_{2,5}$ ,  $\text{MP}_{10}$  e *Sioutas*) coletado na lavanderia do HU.

**Tabela 8** – Dados das concentrações endotoxinas associada ao material particulado encontrados na lavanderia do HU utilizando os amostradores MP<sub>1,0</sub>, MP<sub>2,5</sub>, MP<sub>10</sub> e *Sioutas*

Tamanho do MP	Intervalo de concentração	Média	Desvio
	ng m <sup>-3</sup>	ng m <sup>-3</sup>	ng m <sup>-3</sup>
<b>MP<sub>1,0</sub> A*</b>	2513 – 4512	3279	± 903
<b>MP<sub>1,0</sub> B*</b>	1906 – 497	2991	± 1179
<b>MP<sub>1,0</sub> A* e B*</b>	1906 – 497	3135	± 1012
<b>MP<sub>2,5</sub> A</b>	2573 – 4923	3782	± 935
<b>MP<sub>2,5</sub> B</b>	2780 – 5534	3906	± 893
<b>MP<sub>2,5</sub> A e B</b>	2573 – 5534	3844	± 881
<b>MP<sub>10</sub> A</b>	2710 – 9212	6278	± 2183
<b>MP<sub>10</sub> B</b>	2710 – 9573	6970	± 2267
<b>MP<sub>10</sub> A e B</b>	2710 – 9573	6624	± 2167
<b><i>Sioutas</i> A e B &gt; 2,5 µm</b>	1792 – 1926	1860	± 95
<b><i>Sioutas</i> A e B 1,0 a 2,5 µm</b>	386 – 788	587	± 284
<b><i>Sioutas</i> A e B 0,5 a 1,0 µm</b>	147 – 486	317	± 240
<b><i>Sioutas</i> A e B 0,25 a 0,5 µm</b>	296 – 517	407	± 156
<b><i>Sioutas</i> A e B &lt; 0,25 mm</b>	805 – 868	837	± 44

Fonte: Próprio autor

\* foram desconsiderados os dados do dia 24/02

Não foram encontrados trabalhos relatando endotoxinas associadas a material particulado nesse tipo de ambiente laboral.

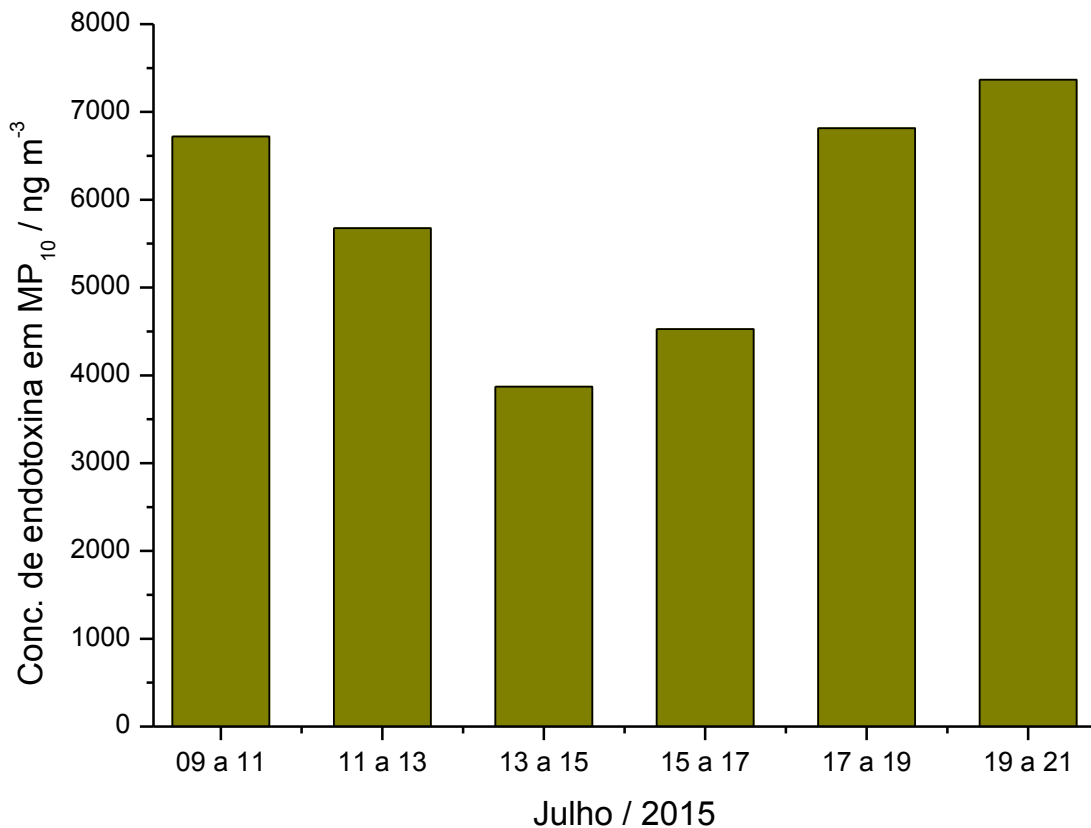
#### 5.4.2 Granja de frangos de Corte

Amostragem de endotoxina associada ao material particulado atmosférico (MP<sub>10</sub>; MP<sub>2,5</sub>; MP<sub>1,0</sub>; faixas >2,5 µm; 1,0-2,5 µm; 0,5-1,0 µm; 0,25-0,5 µm e <0,25 µm) foi conduzida no interior de uma granja de frangos de corte. Por falha do monitor HOBO® U17-002 LCD da ONSET, medidas de temperatura e umidade relativa coletadas foram perdidas. Sendo assim, por ser ambiente semiaberto, foram empregados dados do SIMEPAR como parâmetro de referência. Variações no período entre 16 a 22 °C para temperatura, e entre 71 a 97 % para umidade relativa. A abertura das cortinas para proteção do ambiente foi conduzida nos períodos noturno e parcialmente pela manhã. A abertura das cortinas esteve relacionada com a temperatura interna do galpão.

##### **MP<sub>10</sub>**

Amostragem de endotoxina associada ao material particulado < 10 µm foi realizada através impactador *Low-vol* MP<sub>10</sub>. A figura 42 apresenta o perfil de concentração de endotoxina associada ao MP<sub>10</sub> encontra na granja de frango de corte.

**Figura 42** – Perfil de concentração de endotoxina no MP10 no interior da granja de frangos de corte



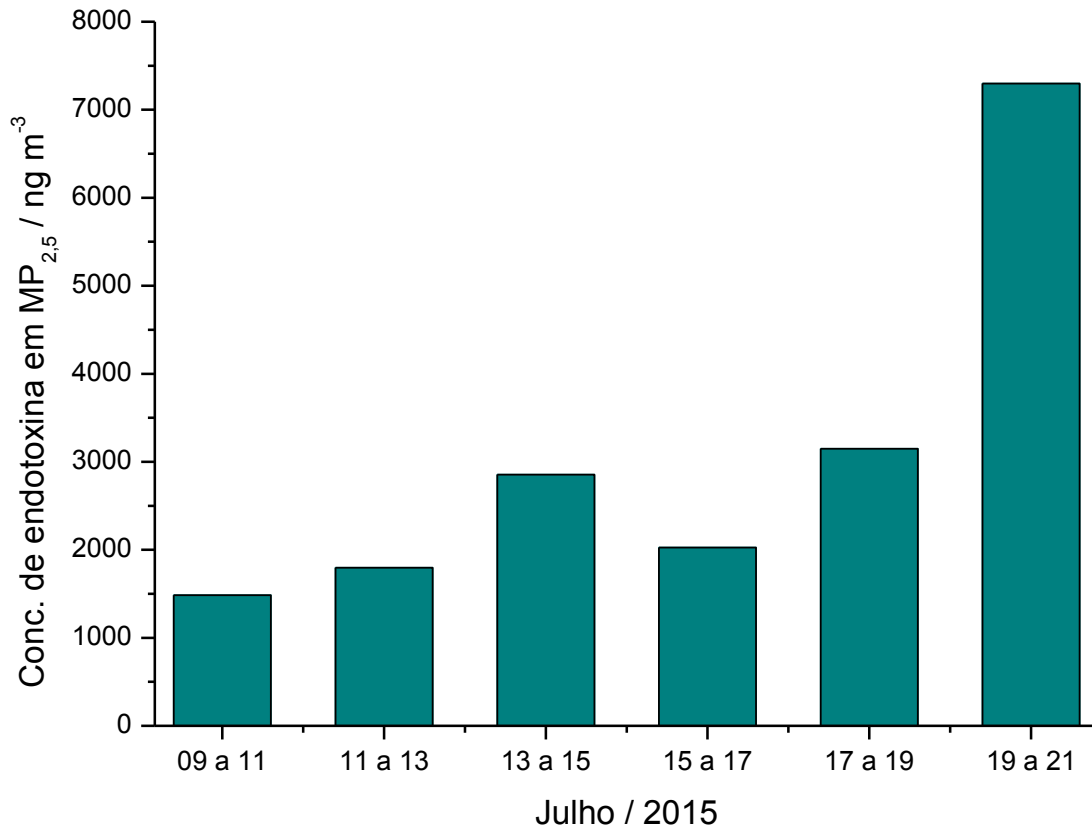
A concentração média de endotoxina encontrada associada ao material particulado > 10  $\mu\text{m}$  foi 5.829  $\text{ng m}^{-3}$ . O LPS apresentou perfil de concentração distinto do perfil encontrado no material particulado MP<sub>10</sub> (Figura 33). Uma possível explicação, seria o leve aumento da concentração de endotoxinas associadas ao MP<sub>2,5</sub> (11 a 17). Por motivos ainda não muito claros, endotoxinas aparentam ter se associado mais em partícula < 2,5  $\mu\text{m}$  nesse período.

Em todo período de coleta, as concentrações de endotoxinas ficaram acima dos limites sugeridos pela DECOS (DUQUENNE et al., 2013). O maior nível de concentração de LPS encontrado (7.367  $\text{ng m}^{-3}$ ) ultrapassou em mais de 800 vezes o limite da DECOS. Os valores mais elevados em ar ambiente urbano Mueller-Anneling et al. (2004) obtiveram 0,544  $\text{ng m}^{-3}$  (5,44 EU  $\text{m}^{-3}$ ). Enquanto Radon et al. (2002) em granja de aves na Suíça mediram máximos de 257  $\text{ng m}^{-3}$ . No entanto, em condições próximas as desse trabalho, Lawniczek-Walczyk et al. (2013) encontraram 8.364  $\text{ng m}^{-3}$  para maior nível de endotoxinas.

**MP<sub>2,5</sub>**

As coletas de endotoxinas associadas as partículas finas (< 2,5 µm), foram realizadas utilizando amostrador ciclone MP<sub>2,5</sub>. A figura 43 apresenta o perfil de concentração do LPS associado a fração fina nesse tamanho de particulado.

**Figura 43** – Perfil de concentração de endotoxina no MP<sub>2,5</sub> no interior da granja de frangos de corte



A concentração média de endotoxinas encontrada em MP<sub>2,5</sub> foi 3.101 ng m<sup>-3</sup>. Em todo período de coleta o nível de concentração de endotoxinas neste tamanho de partícula foi superior ao recomendado por DECOS (DUQUENNE et al., 2013). O valor máximo encontrado superou em mais de 800 essa recomendação. Quando comparado com outros trabalhos para mesmo tamanho aerodinâmico de partícula, Menetrez et al. (2009) encontraram em média 140 ng m<sup>-3</sup> (14,0 EU m<sup>-3</sup>) em ambiente rural, nível bem inferior ao encontrado neste trabalho.

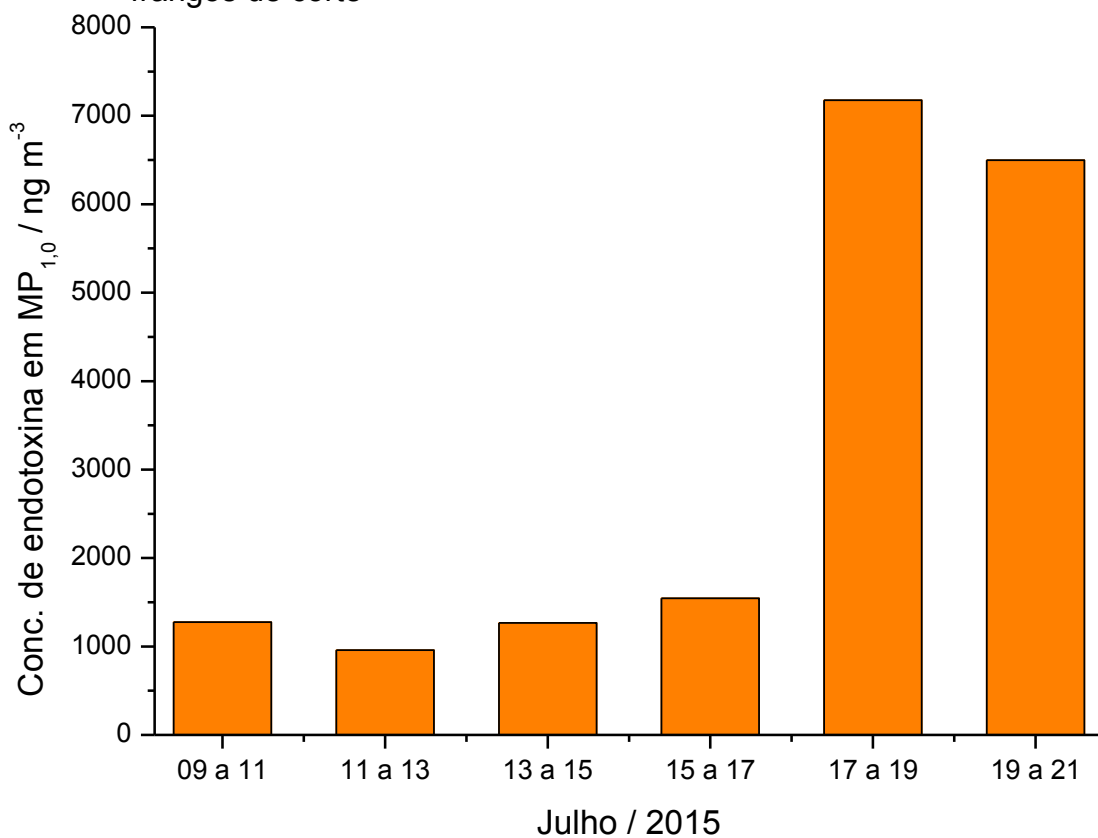
Yang, Wang e Zhang (2014), utilizando outras condições de coleta, avaliaram criações de aves e suínos. Foi na criação de aves as maiores médias encontradas, sendo 1073 e 1409 ng m<sup>-3</sup> (107,3 e 140,9 EU m<sup>-3</sup>) para peru e galinhas poedeiras

(respectivamente). Mesmo sendo valores de concentrações altos, ainda ficaram bem abaixo da concentração média avaliada no presente trabalho.

### **MP<sub>1,0</sub>**

Coletas de endotoxinas associadas as partículas finas (< 1,0 µm), foram realizadas utilizando amostrador ciclone MP<sub>1,0</sub>. A figura 44 ilustra o perfil de concentração do LPS associado a essa fração fina de material particulado.

**Figura 44** – Perfil de concentração de endotoxina no MP<sub>1,0</sub> no interior da granja de frangos de corte



As concentrações de MP<sub>1,0</sub> variaram de 959 a 7.177 ng m<sup>-3</sup>. Em média, as partículas < 1,0 µm representaram mais de 53 % da concentração de endotoxinas contidas na fração grossa (MP<sub>10</sub>). Comparado com nível recomendados por DECOS (DUQUENNE et al., 2013), essa média está 347 vezes acima desse nível recomendado.

Embora até o presente trabalho não tenha sido localizado estudos na literatura sobre concentrações de endotoxinas em condições similares as realizadas por este estudo para esse tamanho de partícula. Investigação realizada, em ambiente interno

e externo, por Kujundzic, Hernandez e Miller (2006) em um piloto de estudo de campo, concluíram que dentre as faixas de tamanho de partículas avaliadas, endotoxinas são encontradas com maior frequência nas partículas  $< 1,0 \mu\text{m}$ .

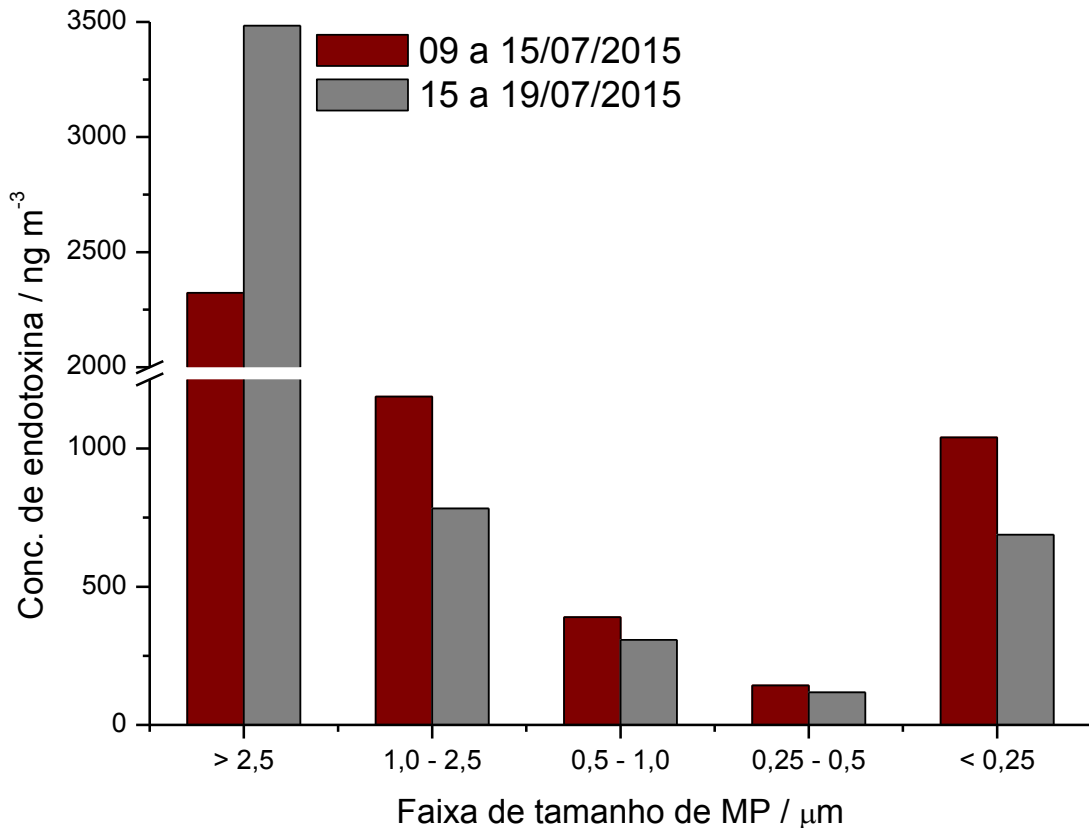
Para efeito de comparação, a figura no anexo H exhibe as concentrações de LPS associados às três frações de material particulado ( $\text{MP}_{10}$ ,  $\text{MP}_{2,5}$ ,  $\text{MP}_{1,0}$ ). Através deste perfil pode-se inferir que a endotoxina associada à fração grossa do MP pode ter origem diferente da fração fina. Material particulado grosso pode ter origem de ambiente externo, como da ressuspensão do solo ao entorno do galpão. O LPS na fração fina mostra-se crescente conforme crescimento das aves. A combinação de fontes de MP e endotoxina associada ao bioaerossol de qualquer forma torna o ambiente poluído, impactando a saúde dos trabalhadores e dos animais.

#### ***Sioutas (amostragem integrada)***

Na amostragem de endotoxina associada a cinco faixas de tamanho de material particulado foi empregado impactador *Sioutas*. Essa amostragem foi realizada em tempo integrado, porém, em dois períodos pela grande quantidade de material particulado encontrado no  $\text{MP}_{10}$ ,  $2,5$  e  $1,0$ . Evitando assim possível perda de massa.

A figura 45 demonstra o perfil da distribuição das concentrações das endotoxinas encontradas nos estágios do impactador *Sioutas*. Em ambos períodos de coleta, essa distribuição demonstrou perfil bimodal. Concentrações mais altas ( $2.323$  e  $3.484 \text{ ng m}^{-3}$ ) foram obtidas no estágio A ( $\text{MP}_{>2,5}$ ) e menores ( $143$  e  $118 \text{ ng m}^{-3}$ ) no estágio D ( $\text{MP}_{0,25-0,5}$ ).

**Figura 45** – Distribuição da concentração de endotoxina associada às frações do MP. Distribuição por tamanho do MP utilizando impactador *Sioutas*. Período de coleta: 09 a 15 de julho e 15 a 19 de julho de 2015. Amostragens realizadas no ar interior do galpão de criação de frangos de corte



Valores elevados de concentração de endotoxinas foram nos estágios A, B e pós-filtro. A ocorrência de chuvas nos dias 10, 16 e 17 parecem não ter alterado perfil de concentração do LPS. Temperatura e umidade relativa, também aparenta não ter influenciado na ocorrência de LPS associado ao material particulado. O coeficiente de correlação entre concentrações de endotoxinas com esses parâmetros meteorológicos apresentaram valores inferiores a 0,3, indicando fraca correlação.

Na literatura não foram localizados trabalhos que reportassem o uso do amostrador *Sioutas* para coleta de endotoxinas associadas ao MP nas faixas de tamanho estudadas. Alguns trabalhos que investigaram endotoxinas nas faixas de tamanho de material particulado avaliaram ar interno e externo em residências (MENETREZ; FOARDE; ENSOR, 2001), ambiente externo rural (TRAVERSI; ALESSANDRIA; SCHILIRO; GILLI, 2011), porém, utilizando outros amostradores.

A tabela 9 traz os dados das endotoxinas associadas ao material particulado (MP<sub>1,0</sub>, MP<sub>2,5</sub>, MP<sub>10</sub> e *Sioutas*) coletado na granja de frango de corte.

**Tabela 9** – Dados das concentrações endotoxinas associada ao material particulado encontrados na granja de frango de corte utilizando os amostradores MP<sub>1,0</sub>, MP<sub>2,5</sub>, MP<sub>10</sub> e *Sioutas*

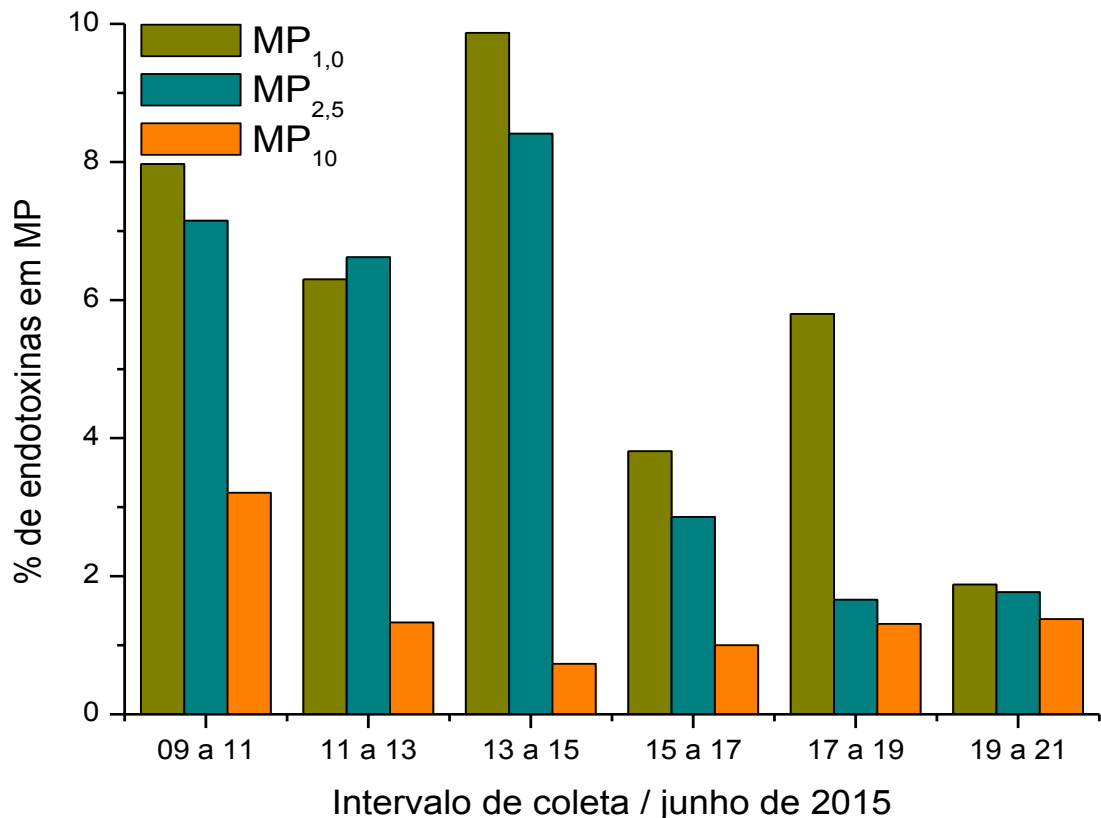
Tamanho do MP	Intervalo de concentração	Média	Desvio
	ng m <sup>-3</sup>	ng m <sup>-3</sup>	ng m <sup>-3</sup>
MP <sub>1,0</sub>	959 – 7177	3120	± 2893
MP <sub>2,5</sub>	1484 – 7298	3101	± 2152
MP <sub>10</sub>	3870 – 7367	5829	± 1392
<i>Sioutas</i> A e B > 2,5 µm	2323 – 3484	2904	± 821
<i>Sioutas</i> A e B 1,0 a 2,5 µm	783 – 1188	986	± 287
<i>Sioutas</i> A e B 0,5 a 1,0 µm	308 – 390	349	± 58
<i>Sioutas</i> A e B 0,25 a 0,5 µm	118 – 143	131	± 18
<i>Sioutas</i> A e B < 0,25 µm	688 – 1040	684	± 249

Fonte: Próprio autor

Para melhor compreender como as endotoxinas estavam associadas ao material particulado, também foi avaliada a quantidade de endotoxinas, em massa, nos respectivos tamanhos de material particulado (Amostradores MP<sub>10</sub>, MP<sub>2,5</sub>, MP<sub>1,0</sub> e *Sioutas*), aqui denominada de taxa LPS/MP. Essa taxa representa a porcentagem em massa de endotoxina na massa de MP.

Essa avaliação (Taxa LPS/MP) apresentou perfil de distribuição de endotoxina diferente do observado na concentração (ng m<sup>-3</sup>). A figura 46 apresenta perfil da taxa LPS/MP ao longo dos dias de amostragem para amostradores MP<sub>10</sub>, MP<sub>2,5</sub>, MP<sub>1,0</sub>.

**Figura 46** – Taxa percentual de endotoxina em relação ao MP nas diferentes frações no ar interior do galpão de frangos de corte



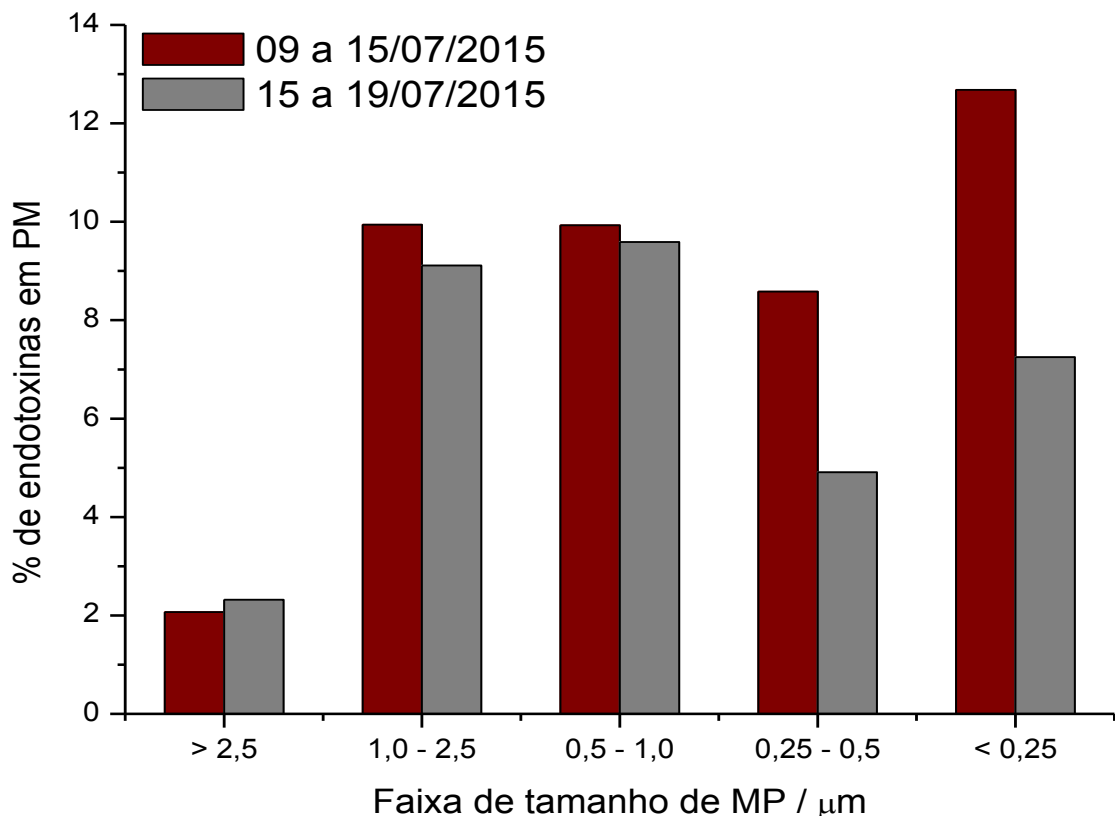
Enquanto perfil de concentração de endotoxinas acompanhou perfil de concentração do MP nas diferentes frações, na taxa LPS/MP apresentou tendência inversa. Maior incidência percentual de endotoxinas, em média, foram observadas em partículas finas. Ficando em 5,9 % para MP<sub>1,0</sub> e de 4,7 % para MP<sub>2,5</sub>, já na fração grossa MP<sub>10</sub> foi de 1,5 %. Possivelmente, incidência mais alta de endotoxina em partículas finas tenha relação com maior área superficial do material particulado fino.

Embora seja necessário estudar a composição químicas do MP para confirmar essa possibilidade.

Como observado na figura 46, a incidência de endotoxina no material particulado diminui ao longo da coleta em todos os tamanhos de partículas (MP<sub>10</sub>, MP<sub>2,5</sub>, MP<sub>1,0</sub>). Provavelmente esse fato pode estar associado com acentuado crescimento da concentração do material particulado em relação a produção de endotoxinas, considerando que fonte de endotoxina é distinta da fonte de MP.

Taxa LPS/MP também foi calculada nas coletas utilizando o amostrador impactador *Sioutas*. A figura 47 ilustra o perfil dos dados obtidos.

**Figura 47** – Taxa percentual de endotoxina em relação ao MP nas diferentes frações coletadas com o impactador *Sioutas* no ar interior da granja de frangos de corte



Na média a taxa LPS/MP observada foi de 2,2 % na fração grossa (> 2,5  $\mu\text{m}$ ), 9,5 % na faixa de 1,0 a 2,5  $\mu\text{m}$ , 9,8 % na faixa 0,5 a 1,0  $\mu\text{m}$ , 6,7 % na faixa de 0,25 a 0,5  $\mu\text{m}$  e 10 % na fração quase ultrafina (< 0,25  $\mu\text{m}$ ). Semelhante ao observado em

MP<sub>1,0</sub>, MP<sub>2,5</sub> e MP<sub>10</sub>, aqui também a maior incidência de endotoxina está em partículas finas comparadas com grossas (> 2,5 µm).

A proposta de cálculo de taxas percentuais LPS/MP foi aplicada também nos dados obtidos no ar interior da lavanderia do HU. Para a fração grossa a taxa LPS/MP média foi de 7,2 %, para a fração fina foi de 9,2 %. Os dados apontam para menor incidência de endotoxinas na fração grossa em relação a fina. As concentrações de MP e endotoxinas associada ao material particulado sofreram baixa variação no período de amostragem, possivelmente esse fato pode ter contribuído para que a diferença da taxa LPS/MP entre os diferentes tamanhos de partículas não ficasse tão pronunciado quanto foi na granja de frango de corte. No entanto, em ambos os casos foram observados incidência maior de endotoxinas em partículas com tamanho aerodinâmico menores.

Alguns trabalhos na literatura encontraram relação entre toxicidade da endotoxina com tamanho do material particulado no qual essa está associada (OSORNIO-VARGAS et al., 2003; SCHINS et al., 2004; DEGOBBI et al., 2011). Desta forma, é importante observar que além avaliar concentrações de endotoxinas, do mesmo modo também deve ser avaliada taxa percentual de LPS nas distintas frações de tamanho.

Como o alcance da penetração do MP biológico no trato respiratório humano é fortemente influenciado pelo seu tamanho, entre outras propriedades, o MP uma vez inalado pode depositar-se nas paredes em diferentes regiões anatômicas do trato respiratório. O cálculo da taxa percentual LPS/MP poderá ser utilizado em estudos epidemiológicos para inferir sobre o mecanismo de ação de endotoxina associada ao material particulado atmosférico em diferentes ambientes.

Medidas da distribuição de endotoxinas nas frações aerodinâmicas de bioaerossóis é, portanto, um passo importante na determinação de seus efeitos de toxicidade. Estes resultados podem ser utilizados para a tomada de medidas de proteção contra a exposição ocupacional de MP e endotoxinas em ambiente laboral.

## 6 CONCLUSÃO

O padrão 3-OHOD foi sintetizado com reagentes de partida de baixo custo e fácil aquisição além de condições brandas de reação. Esta rota de reações poderá ser empregada para obtenção dos quatro ácidos graxos utilizados como padrões para determinação analítica de endotoxinas em diferentes matrizes utilizando a cromatografia em fase gasosa.

Foi avaliada a distribuição por tamanho do material particulado nas frações grossa e fina em ar interior de dois ambientes laborais. Cada ambiente representou condições específicas de exposição ao material particulado e às endotoxinas associadas. As seguintes conclusões foram obtidas considerando as condições nos locais de amostragem:

As técnicas de amostragem foram adequadas para a determinação de endotoxinas associadas às distintas frações do MP. As frações foram consideradas como grossa, fina e quase ultrafina.

No ar interior da lavanderia do hospital a concentração de MP grosso foi maior que a fração fina. Como o local é higienizado diariamente, atribui-se ao processo de separação do vestuário como principal fonte do MP grosso. O MP fino representou 47% da fração grossa do MP no ar interior da lavanderia. Conforme recomendação da OMS todas as concentrações estiveram acima do valor limite recomendado.

As concentrações de endotoxina associada às frações do MP grosso e fino foram encontrados na ordem de  $\mu\text{g m}^{-3}$  (3.522 a 6.624  $\text{ng m}^{-3}$ ) considerados muito elevados quando comparados com valor máximo recomendado pela DECOS de 9  $\text{ng m}^{-3}$  para exposição ocupacional.

No ar interior do galpão da granja de aves o perfil de concentração do MP grosso foi relativamente constante mostrando influência de fontes externas na origem do MP. O MP fino apresentou o perfil de concentração crescente mostrando a influência do crescimento das aves ao longo do período de amostragem. As concentrações de MP grosso e fino estiveram na ordem de 446  $\mu\text{g m}^{-3}$  e 125  $\mu\text{g m}^{-3}$ , respectivamente. Estes valores excedem valores recomendados pela OMS.

Endotoxina foi encontrada em todas as frações do MP nas amostras obtidas nos dois locais de amostragem em concentrações relativamente altas. As concentrações de endotoxinas associadas às frações do MP grosso e fino foram

encontrados na ordem de  $\mu\text{g m}^{-3}$  (5,8 a  $3,1 \mu\text{g m}^{-3}$ , respectivamente) considerados muito elevados quando comparados com valor máximo recomendado pela DECOS de  $9 \text{ ng m}^{-3}$  para exposição ocupacional.

A distribuição por tamanho do MP foi obtida em 5 faixas de tamanho aerodinâmico utilizando o impactador *Sioutas* nos dois locais de amostragem. O perfil obtido foi de distribuição bimodal com maior concentração de MP na fração grossa e a seguir na fração de partículas consideradas quase ultrafinas. Endotoxina foi encontrada em todas as frações com concentrações bem elevadas na fração grossa. Mesmo havendo decréscimo na concentração de LPS nas faixas de tamanho classificadas como finas e quase ultrafinas, a concentração de endotoxinas foi bastante elevado. O perfil obtido nesta técnica de amostragem mostrou a distribuição do LPS associado ao MP simulando a penetração de partículas tóxicas no trato respiratório.

Foi proposto cálculo da taxa percentual LPS/MP. Os valores encontrados mostraram que focando a massa de endotoxina, sua maior concentração esteve sempre associada à fração fina e mais prejudicial do material particulado atmosférico.

Finalmente, neste trabalho pode ser observado que a poluição por endotoxina está relacionada à presença de material particulado atmosférico nas frações respiráveis e inaláveis. O estudo sobre a presença de material biológico associado ao material particulado em suspensão no ar interior e exterior tem que ser levado em consideração devido à contaminação ambiental na perspectiva de toxicidade e infectividade.

## REFERÊNCIAS

ABDULRAHEEM, A.; MUSTAFA, S.; AI-SAFFAR, N.; SHAHJAHAN, M. Retracted Article: Detection of bacterial endotoxin in drinking tap and bottled water in Kuwait. **Environ. Monit. assess.** v. 184, n. 12, p. 7323-7328, jan. 2012.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução RDC nº 166, de 3 fevereiro de 2016. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília**, nº 25, de 05 de fev. de 2016. Disponível em <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC\\_116\\_2016\\_.pdf/8ed910b8-7fe3-478f-837c-208f15d5620a](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_116_2016_.pdf/8ed910b8-7fe3-478f-837c-208f15d5620a)>. Acessado em: 15 maio 2016.

ALFARO-MORENO, E.; LÓPEZ-MARURE; R., MONTIEL-DÁVALOS, A.; SYMONDS, P.; OSORNIO-VARGAS, A. R.; ROSAS, I. and MURRAY, J. C. E-Selectin expression in human endothelial cells exposed to PM 10: the role of endotoxin and insoluble fraction. **Environmental research**, n. 103, v. 2, p. 221-228, 2007.

ATKINSON, R. W.; ROSS ANDERSON, H.; SUNYER, J.; AYRES, J. O. N.; BACCINI, M., VONK, J. M.; BOUMGHAR, A., FORASTIERE, F., FORSBERG, B., TOULOUMI, G. e SCHWARTZ, J. Acute effects of particulate air pollution on respiratory admissions: results from APHEA 2 project. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 164, n. 10, p. 186-1866, 2001.

Baird, Colin. **Química Ambiental**. 2ª ed. Porto Alegre: Bookman, 2012. 662 p.

BINDING, N.; JASCHINSKI, S.; WERLICH, S.; BLETZ, S.; WITTING, U. Quantification of bacterial lipopolysaccharides (Endotoxin) by GC-MS determination of 3-hydroxy fatty acids. **J. environ. Monit.** v. 6, n. 1, p. 65-70, dez.2004.

Brooks, G. F.; Carroll, K. C.; Butel, S. J.; Morse, S. A. e Mietzner, T. A.. **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. 25ª ed. AMGH, 2012.

BRUNSHIDLE, T. P.; KONOWALCHUK, B.; NABEEL, I.; SULLIVAN, J. E. **A review of the measurement, emission, particle characteristics and potential human**

**health impacts of ultrafine particles: Characterization of ultrafine particles.** 2003. Disponível em: <<http://enhs.umn.edu/current/5103/particles/intro.html>>. Acesso em: 12 dez. 2015.

CAROFF, M.; KARIBIAN, D.; CAVAILLON, J. M.; HAEFFNER-CAVAILLON, N. Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides. **Microbes and infection**, v. 4, n. 9, p. 915-926, jul. 2002.

CETESB-Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. **Decreto Nº 60.342, de 4 de Abril de 2014.** 2014. Disponível em: <<http://www.ambiente.sp.gov.br/legislacao/category/decreto-sma/>>. Acesso em: out. 2015.

Chatterjee, S. N.; Chaudhuri, Keya. **Outer membrane vesicles of bacteria.** Springer Science & Business Media, 2012.

COGGINS, M. A.; HOGAN, V. J.; KELLY, M.; FLEMING, G. T.; ROBERTS, N.; TYNAN, T.; THORNE, P. S. Workplace exposure to bioaerosols in Podiatry clinics. **Ann. Occup. Hyg.**, v. 56, n. 6, p. 746-753, jan. 2012.

CONAMA-Conselho Nacional do Meio Ambiente. **RESOLUÇÃO CONAMA nº 3, de 28 de junho de 1990.** 1990. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=100>>. Acessada em: nov. 2015

CONCELLÍN, J. M.; CONCELLÓN, C. Aldol-type reactions of unmasked iodoacetic acid with carbonyl compounds promoted by samarium diiodide: Efficient synthesis of carboxylic 3-hydroxyacids and their derivatives. **J. Org. Chem.** v. 71, n. 12, p. 4428-4432, maio 2006.

COSTERTON, J. W.; INGRAM, J. M. and CHENG, K. J. Structure and function of the cell envelope of gram-negative bacteria. **Bacteriological reviews**, v. 38, n. 1, p. 87, 1974.

COX, A. D., BRISSON, J. R., VARMA, V., and PERRY, M. B. Structural analysis of the lipopolysaccharide from *Vibrio cholerae* O139. **Carbohydrate research**, v. 290, n. 1, p. 43-58, 1996.

CROWDER, T. M.; ROSATI, J. A.; SCHROETER, J. D.; HICKEY, A. J.; MARTONEN, T. B. Fundamental effects of particle morphology on lung delivery: predictions of Stokes' law and the particular relevance to dry powder inhaler formulation and development. **Pharmaceutical research**, v. 19, n. 3, p. 239-245, março 2002.

DE VIZCAYA-RUIZ, A.; GUTIÉRREZ-CASTILLO, M. E.; URIBE-RAMIREZ, M.; CEBRIÁN, M. E.; MUGICA-ALVAREZ, V.; SEPÚLVEDA, J.; ROSAS, I.; SALINAS, E.; GARCIA-CUÉLLAR, C.; MARTÍNEZ, F.; ALFARO-MORENO, E.; TORRES-LORES, V.; OSORNIO-VARGAS, A.; SIOUTAS, C.; FINE, P. M.; SINGH, M.; GELLER, M. D.; KUHN, T.; MIGUEL, A. H.; EIGUREN-FERNANDEZ, A.; SCHIESTL, R. H.; RELIENE, R.; FROINE, J. Characterization and in vitro biological effects of concentrated particulate matter from Mexico City. **Atmos. Environ.**, v. 40, p. 583-592, ago. 2006.

DEGOBBI, C.; LOPES, F. D.; CARVALHO-OLIVEIRA, R.; MUNOZ, J. E.; SALDIVA, P. H. Correlation of fungi and endotoxin with PM<sub>2.5</sub> and meteorological parameters in atmosphere of Sao Paulo, Brazil. **Atmos. Environ.** v. 45, n. 13, p. 2277-2283, abr. 2011.

DUQUENNE, P.; MARCHAND, G.; DUCHAINE, C. Measurement of endotoxins in bioaerosols at workplace: a critical review of literature and a standardization issue. **Ann. Occup. Hyg.** v. 57, n. 2, p. 137-172, set. 2013.

ELIN, R. J. e WOLFF, S. M.. Biology of Endotoxin. **Annu. Rev. Med.** v. 27, p. 127-141, 1976.

ERRIDGE, C.; BENNETT-GUERRERO, E. and POXTON, I. R. Structure and function of lipopolysaccharides. **Microbes and infection**, v. 4, n. 8, p. 837-851, 2002.

FAJERSZTAJN, L.; VERAS, M.; BARROZO, L. V.; SALDIVA, P. Air pollution: a potentially modifiable risk factor for lung cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 13, n. 9, p. 674-678, ago. 2013.

FIERRO, Marian. **Particulate Matter**. Disponível em <[http://www.pima.gov/airinfnow/pdf/Particulate\\_Matter.pdf](http://www.pima.gov/airinfnow/pdf/Particulate_Matter.pdf)>. Acesso em: set. 2014.

FREITAS, A. de M.; SOLCI, M. C. Caracterização do MP<sub>10</sub> e MP<sub>2,5</sub> e distribuição por tamanho de cloreto, nitrato e sulfato em atmosfera urbana e rural de londrina. **Quim. Nova**, v. 32, n. 7, p. 1750-1754, ago. 2009.

FUKUZAWA, S.-I.; MATSUZAWA, H.; YOSHIMITSU, S.-I.. Asymmetric samarium-reformatsky reaction of chiral  $\alpha$ -bromoacetyl-2-oxazolidinones with aldehydes. **J. Org. Chem.** v. 65, n. 6, p. 1702-1706, fev. 2000.

GALLAGHER, L. G.; RAY, R. M.; LI, W.; PSATY, B. M.; GAO, D. L.; THOMAS, D. B.; CHECKOWAY, H. Occupational exposures and mortality from cardiovascular disease among women textile workers in Shanghai, China., **Am. J. ind. Med.**, v. 55, n. 11, p. 991-999, nov. 2012.

GLAUSER, M. P.; ZANETTI, G.; BAUMGARTNER, J.-D.; COHEN, J. Septic shock: pathogenesis. **The Lancet**. n. 338, p. 732-736, 1991.

GONCALVES, F. L. T.; MASSAMBANI, O.; BEHENG, K. D.; VAUTZ, W.; SCHILLING, M., SOLCI, M. C.; ROCHA, V.; KLOCKOW, D. Modelling and measurements of below cloud scavenging processes in the highly industrialised region of Cubatao-Brazil. **Atmos. Environ.**, v. 34, n. 24, p. 4113-4120, jul. 2000.

GRIFFIN, Robert J. The sources and impacts of tropospheric particulate matter. **Nature Education Knowledge**, v. 4,n. 5, p. 1, 2013.

GUAN, T.; YAO, M.; WANG, J.; FANG, Y.; HU, S.; Wang, Y., DUTTA, A.; YANG, J.; WU, Y.; Hu, M.; ZHU, T. Airborne endotoxin in fine particulate matter in Beijing. **Atmos. Environ.**, v. 97, p. 35-42, nov. 2014

GUARIEIRO, L. L.; VASCONCELLOS, P. C.; SOLCI, M. C. Poluentes atmosféricos provenientes da queima de combustíveis fósseis e biocombustíveis: uma breve revisão. **Rev. Virtual Quím.**, v. 3, n. 5, p. 434-445, nov. 2011.

HARRISON, M. J.; HALLBERG, R. W. Pacific Subtropical Cell Response to Reduced Equatorial Dissipation. **Journal of Physical Oceanography. Manuscript.** v. 38, p. 1894-1912, 2008.

HIME, N.; COWIE, C. e MARKS, G. Review of the health impacts of emission sources, types and levels of particulate matter air pollution in ambient air in NSW, 2015.

HUNEAU-SALAÜN, A.; LE BOUQUIN, S.; BEX-CAPELLE, V.; HUONNIC, D., BALAINE, L.; GUILLAM, M. T.; SQUIZANI, F.; SEGALA, C.; MICHEL, V. Endotoxin concentration in poultry houses for laying hens kept in cages or in alternative housing systems. **British poultry science**, v. 52, n. 5, p. 523-530, out. 2011.

HUNTINGTON, M. K.; WILLIAMS, J. F.; MACKENZIE, C. D. Endotoxin contamination in the dental surgery. **J. med. Microbial.**, v. 56, n. 9, p. 1230-1234, set. 2007.

HURLEY, J. C. Endotoxemia: methods of detection and clinical correlates. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 8, n. 2, p. 268-292, Abril 1995.

HUSSAIN, M.; MADL, P.; KHAN, A. Lung deposition predictions of airborne particles and the emergence of contemporary diseases, Part-I. **The Health**, v. 2, n. 2, p. 51-59, 2011.

INSTITUTO FEDERAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. Vocabulário Internacional de Metrologia: Conceitos fundamentais e gerais e termos associados. Duque de Caxias, RJ: INMETRO, p. 1-94, 2012.

INSTITUTO FEDERAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA. Coordenação Geral de Acreditação. Orientação sobre validação de métodos analíticos: documento de caráter orientativo. DOQ-CGCRE-008. ago 2016. Disponível em: < [http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8\\_04.pdf](http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_04.pdf)>. Acessado em: 15 out 2016.

JIANG, HU; ZHANG, JIAN-MIN; DU, WEI-QIONG; ZHU, SHI-ZHENG. A convenient synthesis of novel Meldrum's acid C<sub>60</sub> fullerene derivatives. **Chinese Journal of Chemistry**. v. 25, n. 1, p 86-89, jan. 2007.

JIN, T.-S.; ZHAO, R.-Q.; LI, M.; ZHAO, Y; LI, T.-S.. A quick and clean procedure for synthesis of 5-arylmethylene-2,2-dimethyl-1,3-dioxane-4,6-diones in aqueous media. **Arkivoc**, v. 2006, p. 53-58, out. 2006.

KANG, M.; EDMUNDSON, P.; ARAUJO-PEREZ, F.; MCCOY, A. N.; GALANKO, J., KEKU, T. O. Association of plasma endotoxin, inflammatory cytokines and risk of colorectal adenomas. **BMC cancer**, v. 13, n. 1, fev. 2013.

KIRYCHUK, S. P.; REYNOLDS, S. J.; KOEHNCKE, N. K.; LAWSON, J.; WILLSON, P.; SENTHILSELVAN, A.; MARCINIUK, D.; CLASSEN, H. L.; CROWE, T.; JUST, N.; SCHNEBERGER, D. e DOSMAN, J. A.. Endotoxin and Dust at Respirable and Nonrespirable Particle Sizes are not Consistent Between Cage- and Floor-Housed Poultry Operations. **Ann. Occup. Hyg.** v. 54, n. 7, p. 824-832, 2010.

KOCIEŃSKI, P. J.; PELOTIER, B.; PONS, J. M.; PRIDEAUX, H. Asymmetric syntheses of panclicins A–E via [2+ 2] cycloaddition of alkyl (trimethylsilyl) ketenes to a  $\beta$ -silyloxyaldehyde. **J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1**, v. 8, p. 1373-1382, 1998.

KROLL, A.; GIETL, J. K.; WIESMÜLLER, G. A.; GÜNSEL, A.; WOHLLEBEN, W.; SCHNEKENBURGER, J.; Klemm, O. In vitro toxicology of ambient particulate matter: Correlation of cellular effects with particle size and components. **Environ. Toxicol.**, v. 28, n. 2, p. 76-86, março 2013.

KRUGLY, E.; MARTUZEVICIUS, D.; SIDARAVICIUTE, R.; CIUZAS, D.; PRASAUSKAS, T.; KAUNELIENE, V.; STASIULAITIENE, I.; KLIUCININKAS, L. Characterization of particulate and vapor phase polycyclic aromatic hydrocarbons in indoor and outdoor air of primary schools. **Atmos. Environ.**, v. 82, p. 298-306, jan. 2014.

KUJUNDZIC, E.; HERNANDEZ, M.; and MILLER, S. L. Particle size distributions and concentrations of airborne endotoxin using novel collection methods in homes during the winter and summer seasons. **Indoor air**, v. 16, n. 3, p. 216-226, 2006.

KULANDER, L.; NISBETH, U.; DANIELSSON, B. G.; ERIKSSON, Ö. Occurrence of endotoxin in dialysis fluid from 39 dialysis units. **J. Hosp. Infect.**, v. 24, n. 1, p. 29-37, fev. 1993.

LAITINEN, S., KANGAS, J., HUSMAN, K., e SUSITAIVAL, P. Evaluation of exposure to airborne bacterial endotoxins and peptidoglycans in selected work environments. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 8, n. 2, p. 213-219, 2001.

LAMBERMONT, B.; KOLH, P.; DETRY, O.; GERARD, P.; MARCELLE, R.; D'ORIO, V.. Analysis of endotoxin effects on the intact pulmonary circulation. **Cardiovascular Research**. v. 41, p. 275–281, 1999.

LAWNICZEK-WALCZYK, A.; GORNY, R. L.; GOLOFIT-SZYM CZAK, M.; NIESLER, A. and WLAZLO, A. Occupational exposure to airborne microorganisms, endotoxins and beta-glucans in poultry houses at different stages of the production cycle. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 20, n. 2, p. 259-268, 2013.

LEE, A. K.; CHAN, C. K.; FANG, M.; LAU, A. P. The 3-hydroxy fatty acids as biomarkers for quantification and characterization of endotoxins and Gram-negative bacteria in atmospheric aerosols in Hong Kong. **Atmos. Environ.**, v. 38, n. 37, p. 6307-6317, dez. 2004.

LIN, E. e LOWRY, S. F. The Human Response to Endotoxin. **Sepsis**. v. 2, p. 255–262, 1998.

LIPPMANN, Morton. Toxicological and epidemiological studies of cardiovascular effects of ambient air fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) and its chemical components: coherence and public health implications. **Critical reviews in toxicology**, v. 44, n. 4, p. 299-347, 2014.

LOMBOY, M. F. T. C.; QUIRIT, L. L.; MOLINA, V. B.; DALMACION, G. V.; SCHWARTZ, J. D.; SUH, H. H. and Baja, E. S. Characterization of particulate matter 2.5 in an urban tertiary care hospital in the Philippines. **Building and environment**, n. 92, p. 432-439, 2015.

MADSEN, A. M.; HANSEN, V. M.; NIELSEN, S. H.; OLSEN, T. T. Exposure to dust and endotoxin of employees in cucumber and tomato nurseries. **Ann. Occup. Hyg.**, 53(2), 129-138, nov. 2009.

MEHTA, A. J.; WANG, X. R.; EISEN, E. A.; DAI, H. L.; ASTRAKIANAKIS, G.; SEIXAS, N.; CAMP, J.; CHECKOWAY, H.; CHRISTIANI, D. C.. Work Area Measurements as Predictors of Personal Exposure to Endotoxin and Cotton Dust in the Cotton Textile Industry. **Ann. Occup. Hyg.** v. 52, n. 1, p. 45–54, 2008.

MENETREZ, M. Y., FOARDE, K. K., ENSOR, D. S. An analytical method for the measurement of nonviable bioaerosols. **Journal of the Air and Waste Management Association**. n. 51, p. 1436-1442, 2001.

MENETREZ, M. Y., FOARDE, K. K. and ENSOR, D. S. **Fine biological PM: Understanding size fraction transport and exposure potential**. Disponível em <[http://hero.epa.gov/index.cfm?action=reference.details&reference\\_id=1827](http://hero.epa.gov/index.cfm?action=reference.details&reference_id=1827)>.

Acessado em: nov. de 2012/ 2000.

MENETREZ, M. Y.; FOARDE, K. K.; ESCH, R. K.; SCHWARTZ, T. D.; DEAN, T. R.; HAYS, M. D.; CHO, S. H.; BETANCOURT, D. A. and MOORE, S. A. An evaluation of

indoor and outdoor biological particulate matter. **Atmos. Environ.**, v. 43, n. 34, p. 5476-5483, nov. 2009.

MIMS, C.; DOCKRELL, H. M.; GEORING, R. V.; ROITT, I.; WAKELIN, D. e ZUCKERMAN, M.. **Microbiologia Médica**. 3ª ed. Elsevier, 2005.

MIMS, Cedrac; PLAYFAIR, Jonh; ROITT, Ivan; WAKELIN, Derek e WILLIAMS, Rosamund. **Microbiologia Médica**. 2ª ed. Malone, 1999.

MINGUILLÓN, M. C.; ARHAMI, M., SCHAUER, J. J.; SIOUTAS, C. Seasonal and spatial variations of sources of fine and quasi-ultrafine particulate matter in neighborhoods near the Los Angeles–Long Beach harbor. **Atmos. Environ.**, v. 42, 32, p. 7317-7328, out. 2008.

MISRA, C.; SINGH, M.; SHEN, S.; SIOUTAS, C. and HALL, P. M. Development and evaluation of a personal cascade impactor sampler (PCIS). **Journal of Aerosol Science**, v. 33, n. 7, p. 1027-1047, 2002.

MITRA, A.; JOSHI, S.; ARJUN, C.; KULKARNI, S.; RAJAN, R. Limulus amebocyte lysate testing: adapting it for determination of bacterial endotoxin in 99mTc-labeled radiopharmaceuticals at a hospital radiopharmacy. **Journal of nuclear medicine technology**, v. 42, n. 4, p. 278-282, nov. 2014.

MOHIUDDIN, K.; STREZOV, V.; NELSON, P. F.; STELCER, E. Characterisation of trace metals in atmospheric particles in the vicinity of iron and steelmaking industries in Australia. **Atmos. Environ.**, v. 83, p. 72-79, fev. 2014.

MORDANT, C.; DÜNKELMANN, P.; RATOVELOMANANA-VIDAL, V.; GENET, J.-P.. Dynamic kinetic resolution: an efficient route to anti  $\alpha$ -amino- $\beta$ -hydroxy esters via Ru-SYNPHOS® catalyzed hydrogenation. **Chem. Commun.** n. 11, maio 2004.

MORGENSTERN, V.; CARTY, C. L.; GEHRING, U.; CYRYS, J.; BISCHOF, W.; HEINRICH, J. Lack of spatial variation of endotoxin in ambient particulate matter

across a German metropolitan area. **Atmos. Environ.**, v. 39, n. 36, p. 6931-6941, nov. 2005.

MUELLER-ANNEILING, L.; AVOL, E.; J. M. P. and THORNE, P. S. Ambient endotoxin concentrations in PM<sub>10</sub> from Southern California. **Environmental health perspectives**, v. 112, n. 5, p. 583, 2004.

NILSSON, S.; MERRITT, A. S.; BELLANDER, T. Endotoxins in urban air in Stockholm, Sweden. **Atmos. Environ.**, v. 45, n. 1, p. 266-270, jan. 2011.

O'SHAUGHNESSY, P.; PETERS, T.; DONHAM, K.; TAYLOR, C.; ALTMAIER, R.; KELLY, K. Assessment of swine worker exposures to dust and endotoxin during hog load-out and power washing. **Ann. Occup. Hyg.**, p. 1-9, março 2012.

OSHA- Occupational Safety & Health Administration. **Particulates Not Otherwise Regulated (Total Dust)**. 2015. Disponível em: <[https://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH\\_259640.html](https://www.osha.gov/dts/chemicalsampling/data/CH_259640.html)> Acesso em: dez. 2015.

OIKAWA, Yuji; SUGANO, Kiyoshi; YONEMITSU, Osamu. A. Meldrum's acid in organic synthesis. 2. A general and versatile synthesis of  $\beta$ -keto esters. **J. Org. Chem.** v. 43, n. 10, p. 2087-2088, maio 1978.

OSORNIO-VARGAS, Á. R.; BONNER, J. C.; ALFARO-MORENO, E.; MARTÍNEZ, L.; GARCÍA-CUELLAR, C.; ROSALES, S. P. D. L.; MIRANDA, J.; ROSAS, I. Proinflammatory and cytotoxic effects of Mexico City air pollution particulate matter in vitro are dependent on particle size and composition. **Environ. Health Perspect.**, v. 111, n. 10, p. 1289-1293, ago. 2003.

PAVILONIS, B. T.; ANTHONY, T. R.; O'SHAUGHNESSY, P.; HUMANN, M. J.; MERCHANT, J. A.; MOORE, G.; THORNE, P. S.; WEISEL, C. P.; SANDERSON, W. T. Indoor and outdoor particulate matter and endotoxin concentrations in an intensely

agricultural county. **Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology**, v. 23, n. 3, p. 299-305, jan. 2013.

PELICHIO, A. F.; MARTINS, L. D.; NOMI, S. N.; SOLCI, M. C. Integrated and sequential bulk and wet-only samplings of atmospheric precipitation in Londrina, South Brazil (1998–2002). **Atmos. environ.**, v. 40, n. 35, p. 6827-6835, nov. 2006.

PERSPECTIVES, HEI. **Understanding the health effects of components of the particulate matter mix: progress and next steps. Cambridge, MA: Health Effects Institute**. 2002. Disponível em: <<http://pubs.healtheffects.org/getfile.php?u=244>>. Acesso em: 20 set. 2014.

PETERS, M.; FRITZ, P.; BUFE, A. A bioassay for determination of lipopolysaccharide in environmental samples. **Innate immunity**, v. 18, n. 5, p. 694-699, fev. 2012.

PINTO, J. P.; MARTINS, L. D.; DA SILVA JUNIOR, C. R.; SABINO, F. C.; AMADOR, I. R.; SOLCI, M. C. Carbonyl concentrations from sites affected by emission from different fuels and vehicles. **Atmospheric Pollution Research**, v. 5, n. 3, p. 404-410, fev. 2014b.

PINTO, J. P.; MARTINS, L. D.; SABINO, F. C.; AMADO, I. R.; SOLCI, M. C. Caracterização de MP2, 5 e MP10 em Ar Ambiente de Estacionamento Fechado de Estabelecimento Comercial em Londrina-Paraná. **Orbital-The Electronic Journal of Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 75-81, abril 2014a.

PLAZA, J.; PUJADAS, M.; GÓMEZ-MORENO, F. J.; SÁNCHEZ, M.; ARTÍÑANO, B. Mass size distributions of soluble sulfate, nitrate and ammonium in the Madrid urban aerosol. **Atmos. Environ.**, v. 45, n. 28, p. 4966-4976, set. 2011.

POPE, C. A.; DOCKERY, D. W. Health Effects of Fine Particulate Air Pollution: Lines that Connect. **Journal of the Air & Waste Management Association**. v. 56, p.709-742, 2006.

RADON, K.; DANUSER, B.; IVERSEN, M.; MONSO, E.; WEBER, C.; HARTUNG, J.; DONHAM, K. J.; PALMGREN, U. and NOWAK, D. Air contaminants in different European farming environments. **Ann. Agric. Environ. Med.**, v. 9, n. 1, p. 41-48, março 2002.

RATOVELOMANANA-VIDAL, V.; GIRARD, C.; TOUATI, R.; TRANCHIER, J. P.; HASSINE, B. Ben; GENÊT, J. P. Enantioselective hydrogenation of  $\beta$ -keto esters using chiral diphosphine-ruthenium complexes: optimization for academic and industrial purposes and synthetic application. **Ad. Synth. Catal.** v. 345, n. 1-2, p. 261-274, jan. 2003.

RIETSCHEL, E. T. Absolute configuration of 3-hydroxy fatty acids present in lipopolysaccharides from various bacterial groups. **European Journal of Biochemistry**, v. 64, n. 2, p. 423-428, maio 1976.

MASAKANE, I.; KAWANISHI, H.; MINESHIMA, M.; TAKEMOTO, Y.; UCHINO, J.; HOSHINO, T.; IGOSHI, T.; HIRAKATA, H.; AKIZAWA, T. 2011 JSOT Standard on the Management of Endotoxin Retentive Filter for Dialysis and Related Therapies. **Therapeutic Apheresis and Dialysis**, v. 17, n. 2, p. 229-240, abril 2013.

RUDOLF, P.; BUBACK, J.; AULBACH, J.; NUERNBERGER, P.; BRIXNER, T. Ultrafast multisequential photochemistry of 5-diazo, Meldrum's acid. **J. Am. Chem. Soc.** v. 132, n. 43, p. 15213-15222, 2010.

RYLANDER, RAGNAR. Endotoxin in the environment - exposure and effects. **Journal of Endotoxin Research**, n. 8, v. 4, p. 241-252, 2002.

SAMADI, S.; HEEDERIK, D. J.; KROP, E. J.; JAMSHIDIFARD, A. R.; WILLEMSE, T.; WOUTERS, I. M. Allergen and endotoxin exposure in a companion animal hospital. **Occup. Environ. Med.**, v. 67, n. 7, p. 486-492, jun. 2010.

SARAF, A.; LARSSON, L.; BURGE, H.; MILTON, D. Quantification of ergosterol and 3-hydroxy fatty acids in settled house dust by gas chromatography-mass spectrometry:

comparison with fungal culture and determination of endotoxin by a *Limulus* amoebocyte lysate assay. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 63, n. 7, p. 2554-2559, jul. 1997.

SCHINS, R. P.; LIGHTBODY, J. H.; BORM, P. J.; SHI, T.; DONALDSON, K.; STONE, V. Inflammatory effects of coarse and fine particulate matter in relation to chemical and biological constituents. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 195, n. 1, p. 1-11, fev. 2004.

SINGH, T. S.; BELLO, B.; MABE, O. D.; RENTON, K.; JEEBHAY, M. F. Workplace determinants of endotoxin exposure in dental healthcare facilities in South Africa. **Ann. occup. hyg.**, v. 54, n. 3, p. 299-308, dez. 2010.

SIMPSON, J. C. G., NIVEN, R. M., PICKERING, C. A. C., OLDHAM, L. A., FLETCHER, A. M. and FRANCIS, H. C. Comparative personal exposures to organic dusts and endotoxin. **The Annals of occupational hygiene**, v. 43, n. 2, p. 107-115, 1999.

SIOUTAS, C.; DELFINO, R. J. SINGH, M. Exposure assessment for atmospheric ultrafine particles (UFPs) and implications in epidemiologic research. **Environ. health perspect.**, v. 113, n. 8, p. 947-955, ago. 2005.

SMITH, S. M.; LIYEV, M.; TAKACS, J. M. Catalytic asymmetric hydroboration of  $\beta,\gamma$ -unsaturated Weinreb amides: striking influence of the borane. **Chem. Commun.** n. 47, p. 7812-7814, jun. 2011.

SPAAN, S.; WOUTERS, I. M.; OOSTING, I.; DOEKES, G.; HEEDERIK, D. Exposure to inhalable dust and endotoxins in agricultural industries. **J. environ. Monit.**, v. 8, n. 1, p. 63-72, out. 2006.

STRAK, M., STEENHOF, M., GODRI, K. J., GOSENS, I., MUDWAY, I. S., CASSEE, LEBRET, E. ; BRUNEKREEF, B.; KELLY, F. J.; HARRISON, R. M.; HOEK, G.; JANSSEN, N. A. H. Variation in characteristics of ambient particulate matter at eight

locations in the Netherlands–The RAPTES project. **Atmos. Environ.**, v. 45, n. 26, p. 4442-4453, ago. 2011.

SU, W.; LIN, M.; LEE, H.; CHO, M.; CHOE, W. S.; LEE, Y. Determination of endotoxin through an aptamer-based impedance biosensor. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 32, n. 1, p. 32-36, fev. 2012.

SUN, J.; GE, J.; LIU, W.; WANG, X.; FAN, Z.; ZHAO, W.; ZHANG, H.; WANG, P.; LEE, S. T. A facile assay for direct colorimetric visualization of lipopolysaccharides at low nanomolar level. **Nano Research**, v. 5, n. 7, p. 486-493, jul. 2012.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R. e WOOD, R. Harmonized guidelines for singlelaboratory validation of methods of analysis. International Union of Pure and Applied Chemistry. **Pure Appl. Chem.**, v. 74, n. 5, p. 835–855, 2002.

TRAVERSI, D.; ALESSANDRIA, L.; SCHILIRO, T., and GILLI, G. Size-fractionated PM10 monitoring in relation to the contribution of endotoxins in different polluted areas. **Atmospheric environment**, n. 45, v. 21, p. 3515-3521, 2011.

US-EPA – United States Environmental Protection Agency. **Basic Information**. 2016. Disponível em: <<https://www3.epa.gov/airquality/particlepollution/basic.html>>. Acesso em: 5 maio 2016.

US-EPA – United States Environmental Protection Agency. **Integrated Review Plan for the National Ambient Air Quality Standards for Particulate Matter**. 2008. Disponível em: <[https://www3.epa.gov/ttn/naaqs/standards/pm/data/2008\\_03\\_final\\_integrated\\_review\\_plan.pdf](https://www3.epa.gov/ttn/naaqs/standards/pm/data/2008_03_final_integrated_review_plan.pdf)>. Acesso em: 16 set. 2015.

US-EPA – United States Environmental Protection Agency. Particulate Matter (PM) Standards - **Documents from Review Completed in 2012**. 2012. Disponível em: <[https://www3.epa.gov/ttn/naaqs/standards/pm/s\\_pm\\_2007.html](https://www3.epa.gov/ttn/naaqs/standards/pm/s_pm_2007.html)>. Acesso em: out. 2013.

WHO – World Health Organization. **7 million premature deaths annually linked to air pollution.** 2014. <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/air-pollution/en/>>. Acessado em: 25 junh. 2015.

WHO – World Health Organization. **Air pollution levels rising in many of the world's poorest cities.** 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2016/air-pollution-rising/en/>>. Acesso em: 12 abril 2016.

WHO – World Health Organization. **Ambient (outdoor) air quality and health.** 2014. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs313/en/>>. Acesso em: 16 maio. 2015.

WHO – World Health Organization. **WHO Air quality guidelines for particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide.** 2005. < [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69477/1/WHO\\_SDE\\_PHE\\_OEH\\_06.02\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/69477/1/WHO_SDE_PHE_OEH_06.02_eng.pdf)> Acesso em: fev. 2015.

WOLLENWEBER, H. W.; RIETSCHER, E. T.; HOFSTAD, T.; WEINTRAUB, A.; LINDBERG, A. A. Nature, type of linkage, quantity, and absolute configuration of (3-hydroxy) fatty acids in lipopolysaccharides from *Bacteroides fragilis* NCTC 9343 and related strains. **Journal of bacteriology**, v. 144, n. 3, p. 898-903, dez. 1980.

WU, C.; MILLER, P. A.; MILLER, M. J. Syntheses and studies of amamistatin B analogs reveals that anticancer activity is relatively independent of stereochemistry, ester or amide linkage and select replacement of one of the metal chelating groups. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v. 21, n. 9, p. 2611-2615, maio 2011.

YANG, D.; GAO, Q.; ZHENG, B. F.; ZHU, N. Y. Et<sub>2</sub>AlCl-promoted asymmetric phenylseleno group transfer radical cyclization reactions of unsaturated  $\beta$ -hydroxy esters. **J. org. chem.**, v, 69, n. 25, p. 8821-8828, nov. 2004.

YANG, X.; WANG, X.; ZHANG, Y. Assessment of Airborne Endotoxin at the Air Exhaust of Swine and Poultry Confinement Buildings. **ASHRAE Transactions**, v. 120, p. 316-325, 2014.

ZUZUARREGUI, A.; MORANT-MINANA, M. C.; PEREZ-LORENZO, E.; MARTINEZ DE TEJADA, G.; ARANA, S.; MUJICA, M. Implementation and characterization of a fully miniaturized biosensor for endotoxin detection based on electrochemical techniques. **Sensors Journal, IEEE**, v. 14, n. 1, p. 270-277, set. 2014.

## **ANEXOS**





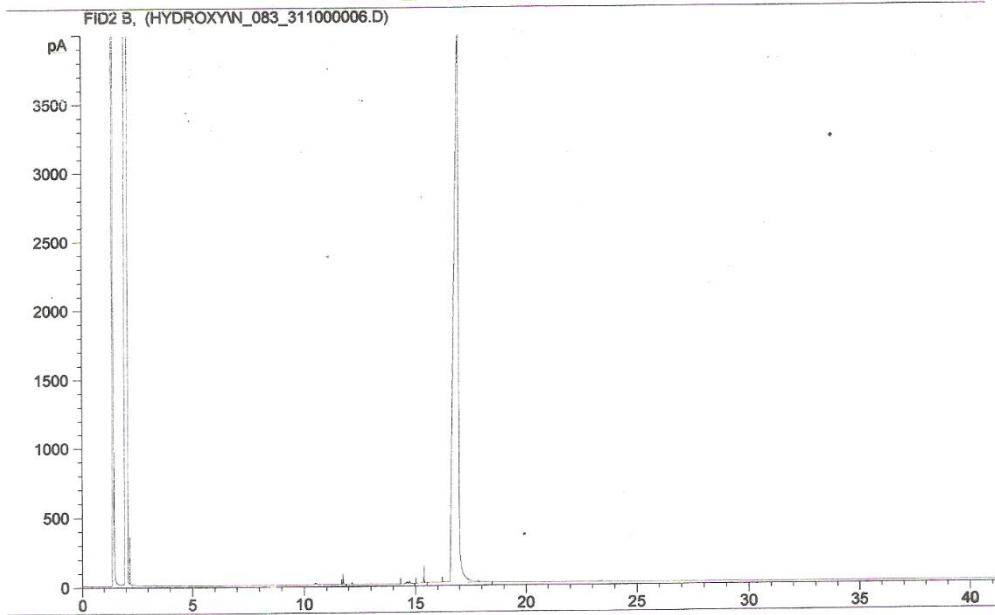
*1 flask 50mg*

14-1203 3-Hydroxydodecanoic Acid  
GC Methylated sample

Lot no: N 083:3  
Purity: 98+ %

**GC:** Injection : On column  
Detector : FID  
Column : HP-5 30m x 0.32mm  
film 0.25um  
Carrier : Helium 14psi

Temperature  
Column  
Initial : 50°C 3 min  
Final : 260°C  
Rate : 10°C/min.  
Injector : 240°C  
Detector : 270°C



Larodan Fine Chemicals AB

Address  
Limhammsgårdens allé 9  
S-216 16 Malmö  
Sweden

Telephone  
+46-40 16 41 55

Telefax  
+46-40 15 54 98

EU Vat no  
SE556085954701

E-mail address  
Info@larodan.se  
Internet  
<http://www.larodan.se>





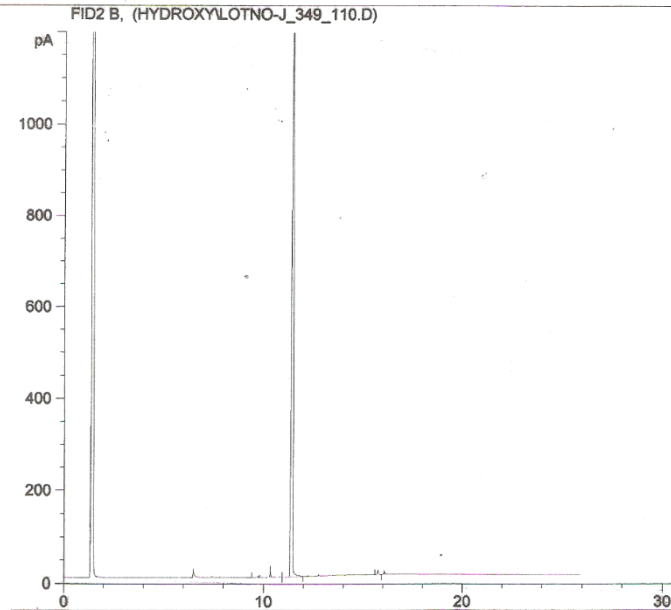
1 frasco  
50 mg

14-1603 3-Hydroxyhexadecanoic Acid  
GC Methylated sample

Lot no: J 349:12  
Purity: 98+ %

**GC:** Injection : On column  
Detector : FID  
Column : HP-5 30m x 0.32mm  
film 0.25um  
Carrier : Helium 14 psi

Temperature  
Column  
Initial : 120°C 3 min  
Final : 260°C  
Rate : 10°C/min.  
Injector : 240°C  
Detector : 270°C



Larodan Fine Chemicals AB

Address  
Limhamnsgårdens allé 9  
S-216 16 Malmö  
Sweden

Telephone  
+46-40 16 41 55

Telefax  
+46-40 15 54 98

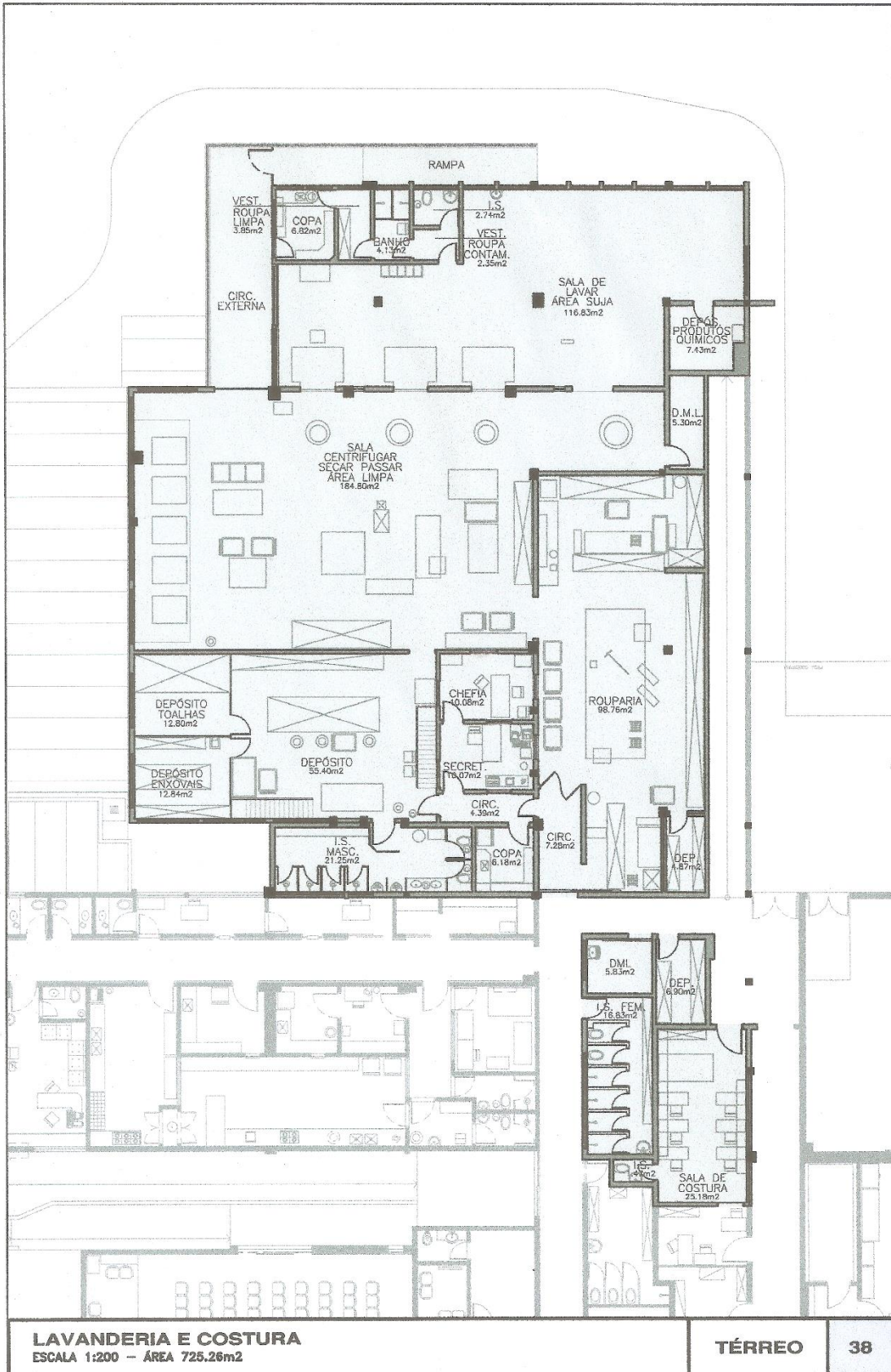
EU Vat no  
SE556085954701

E-mail address  
Info@larodan.se  
Internet  
<http://www.larodan.se>



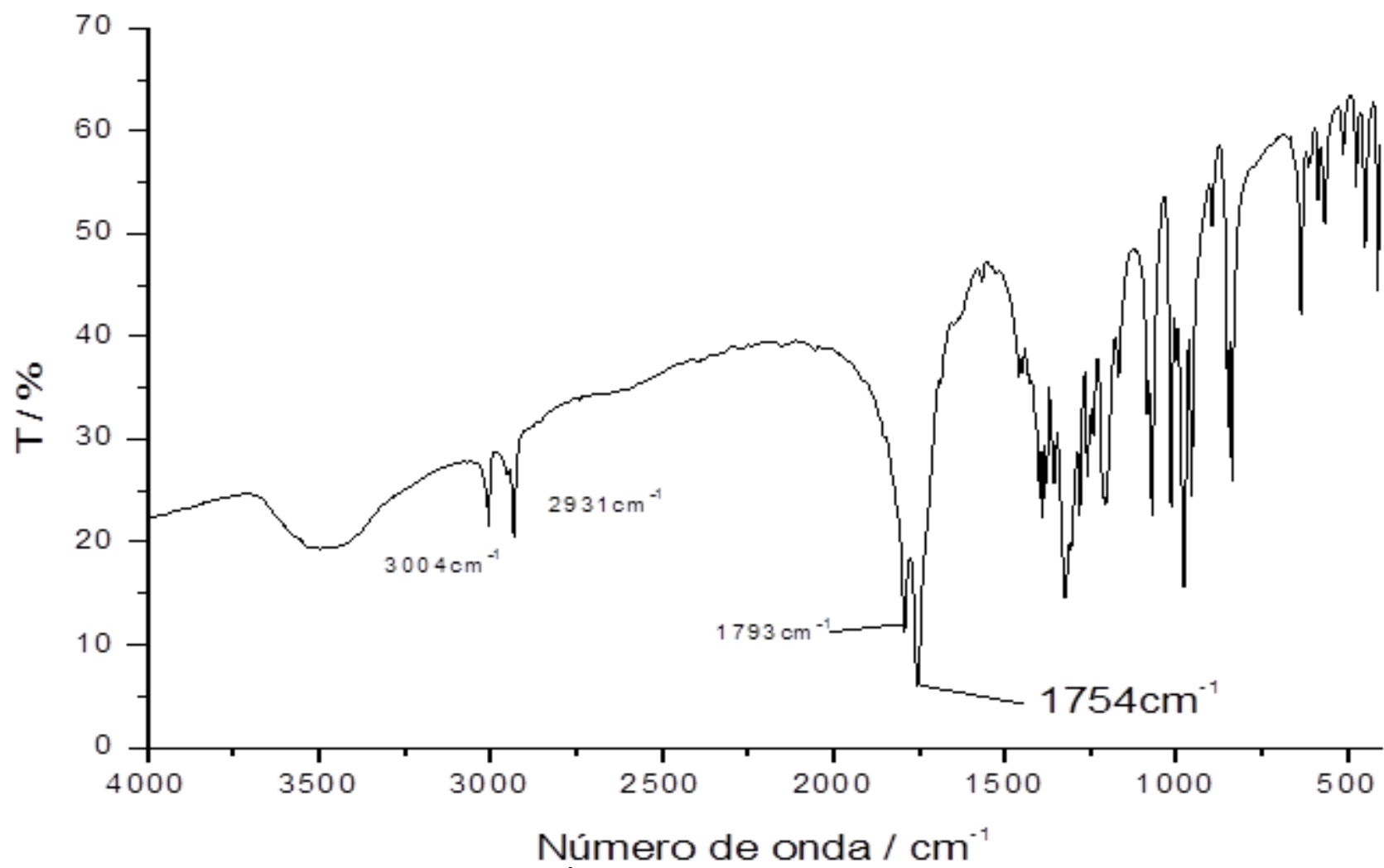
ANEXO B

Planta da lavanderia do HU, compreendendo todas as áreas

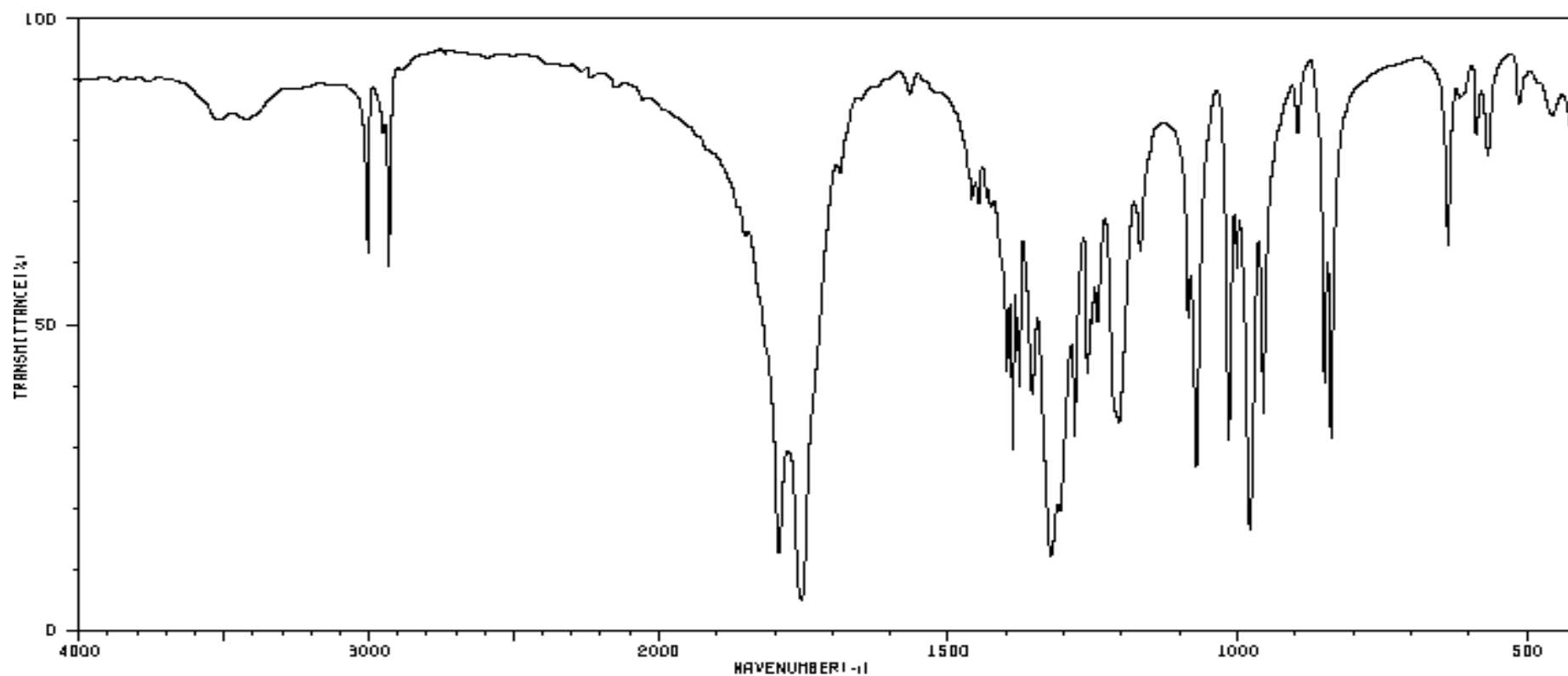


## ANEXO C

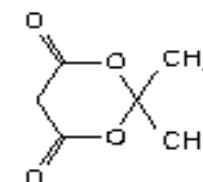
Espectro no infravermelho do intermediário a2 (Ácido de Meldrum) e do obtido no Spectral Database for Organic Compounds (SDBS)



Espectro no infravermelho (KBr) do intermediário **A2** (Ácido de Meldrum)



3004	66	1447	66	1307	18	1168	60	896	79
2950	79	1434	68	1282	30	1085	49	850	38
2931	57	1399	41	1260	41	1071	26	839	30
1792	12	1389	28	1252	47	1016	30	637	60
1754	4	1377	38	1243	49	1002	57	589	79
1686	72	1355	37	1211	34	979	15	568	74
1460	68	1323	11	1206	32	966	34	616	81

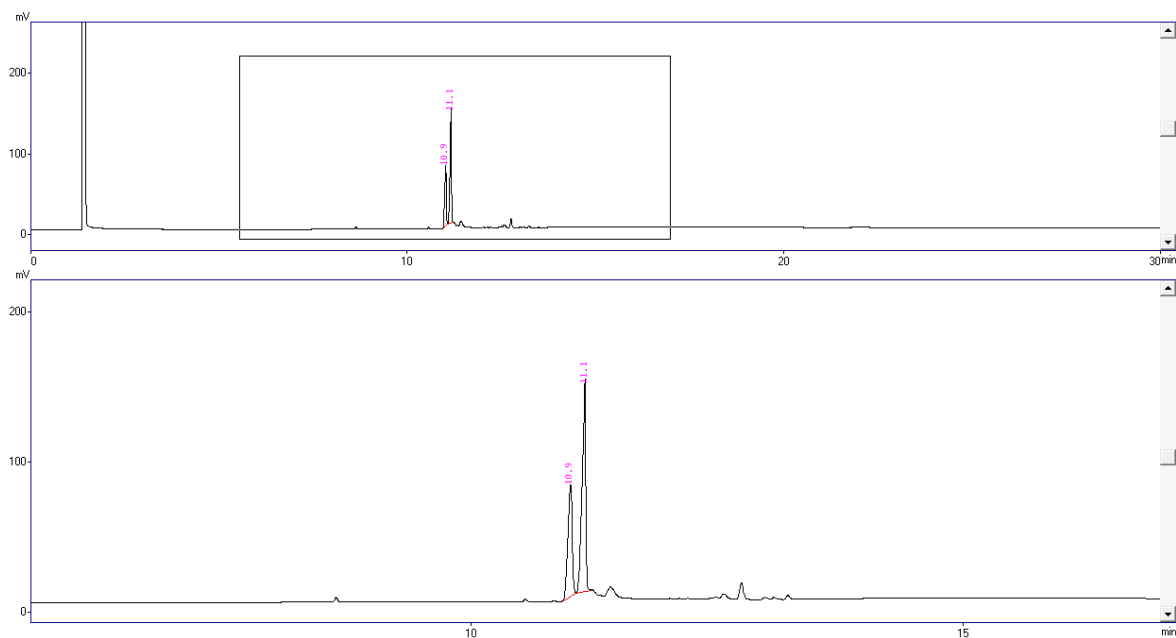


Espectro no infravermelho do 2,2-dimetil-1,3-dionano-4,6-diona (Ácido de Meldrum)

Fonte: Spectral Database for Organic Compounds (SDBS)

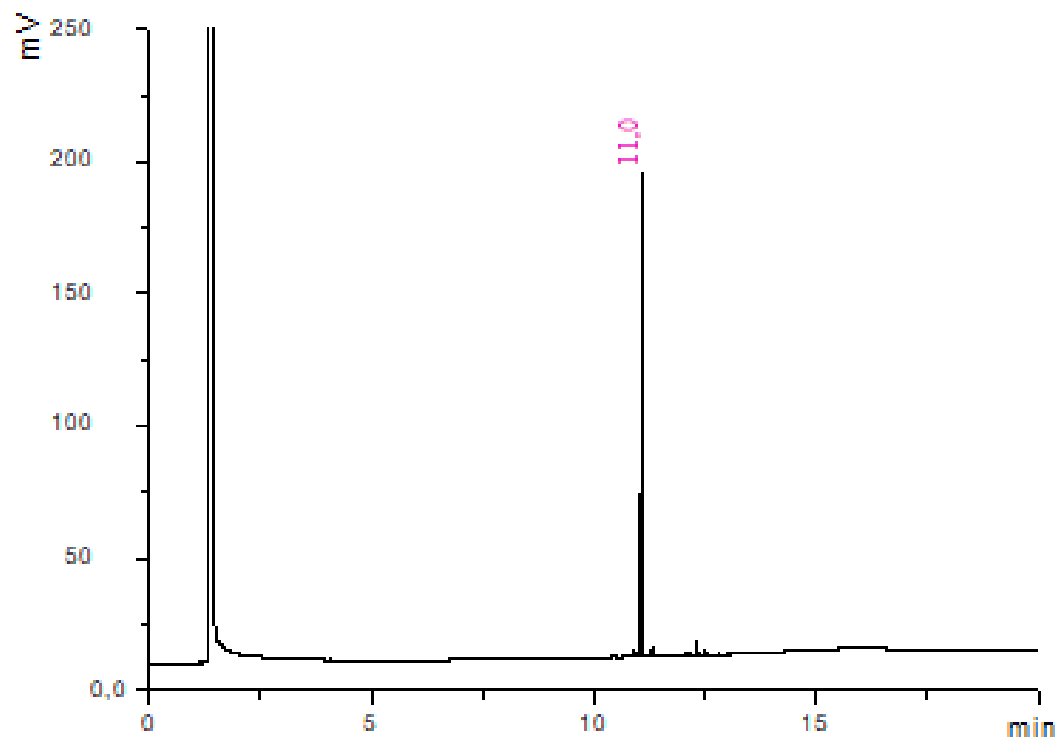
## ANEXO D

Cromatograma (CG-DIC) do intermediário A6 (10,9 min) e subproduto (11,1 min)  
formados na quarta etapa



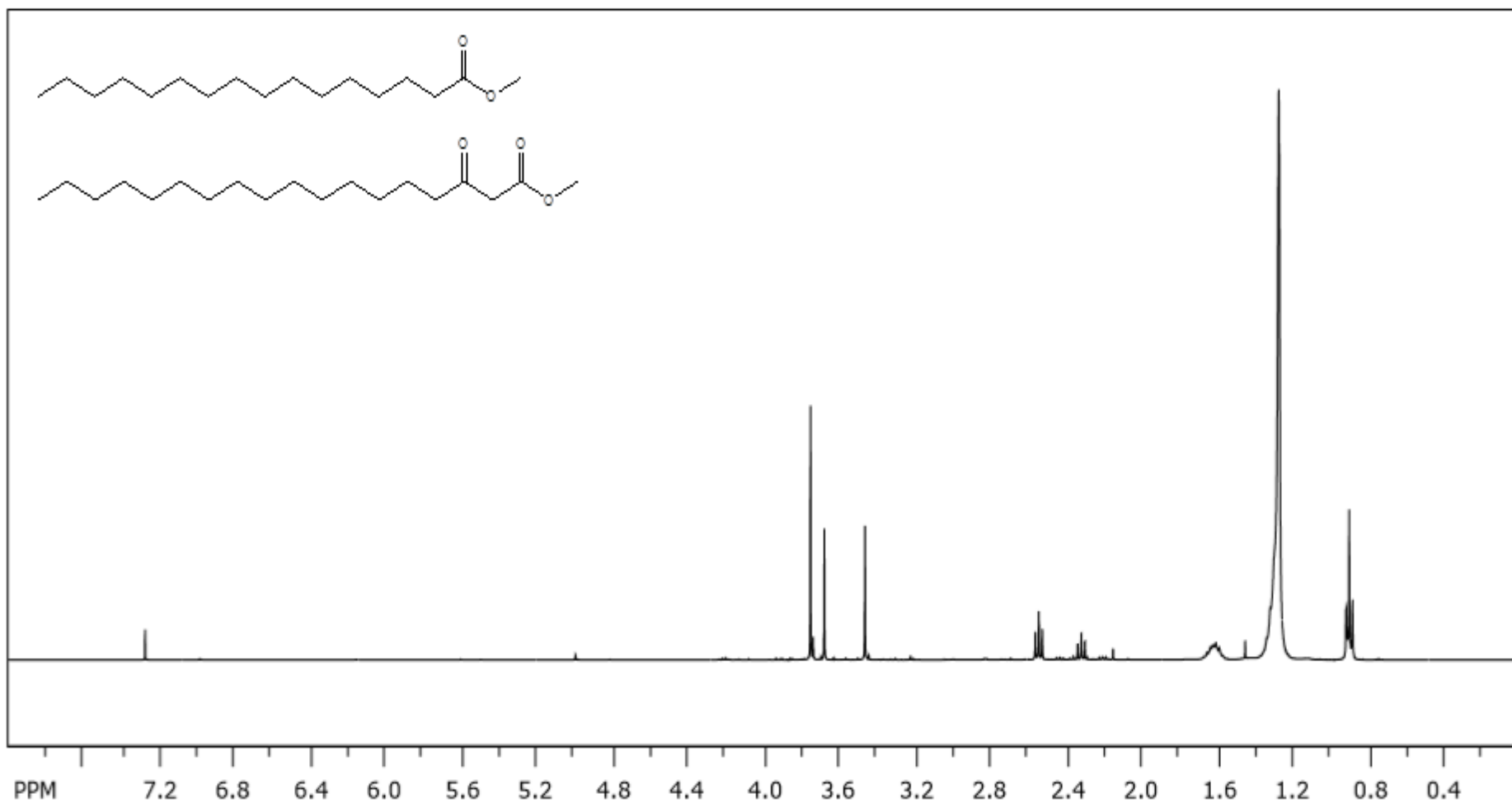
## ANEXO E

Cromatograma (CG-DIC) do padrão de palmitato de metila com tempo de retenção em 11,0 min

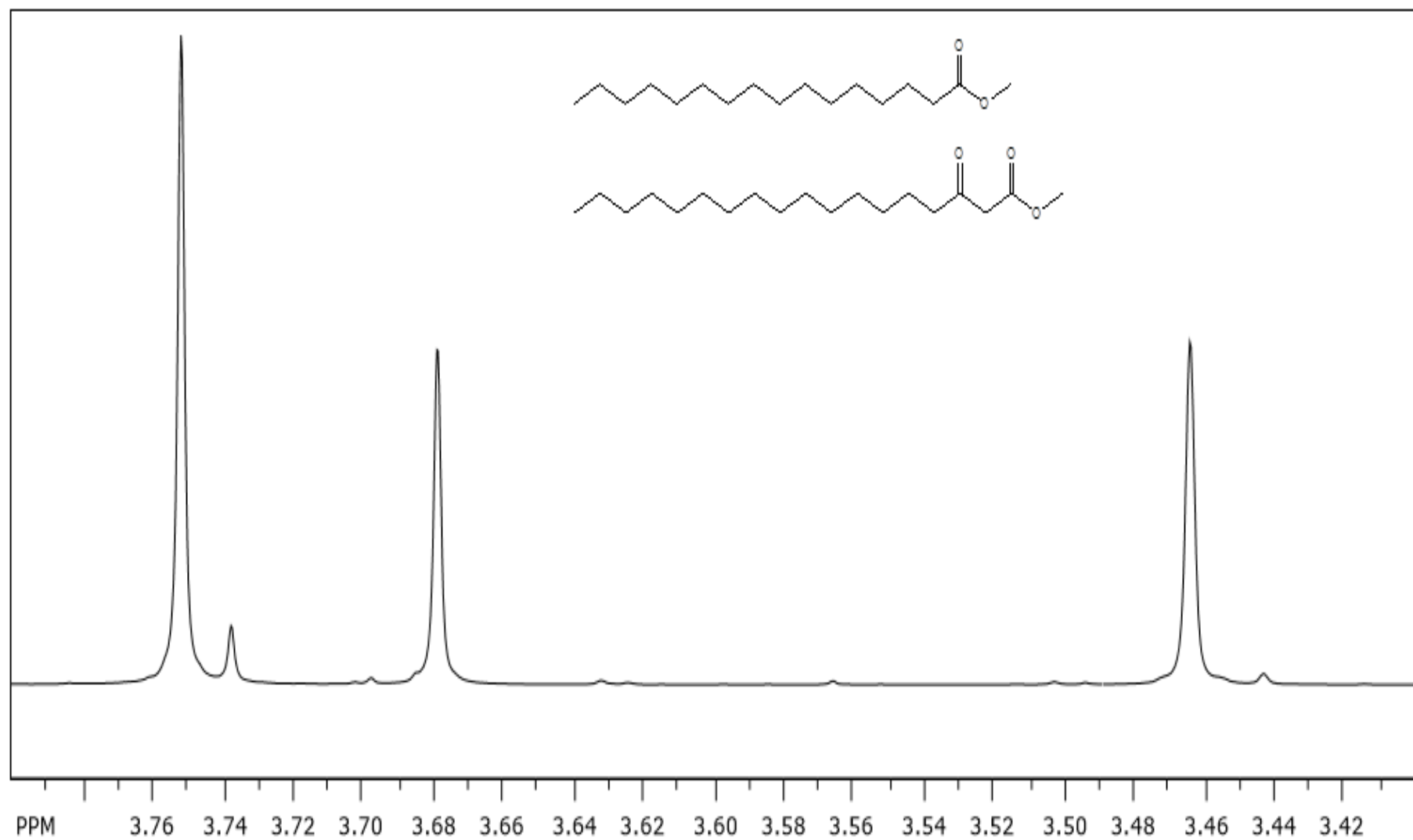


## ANEXO F

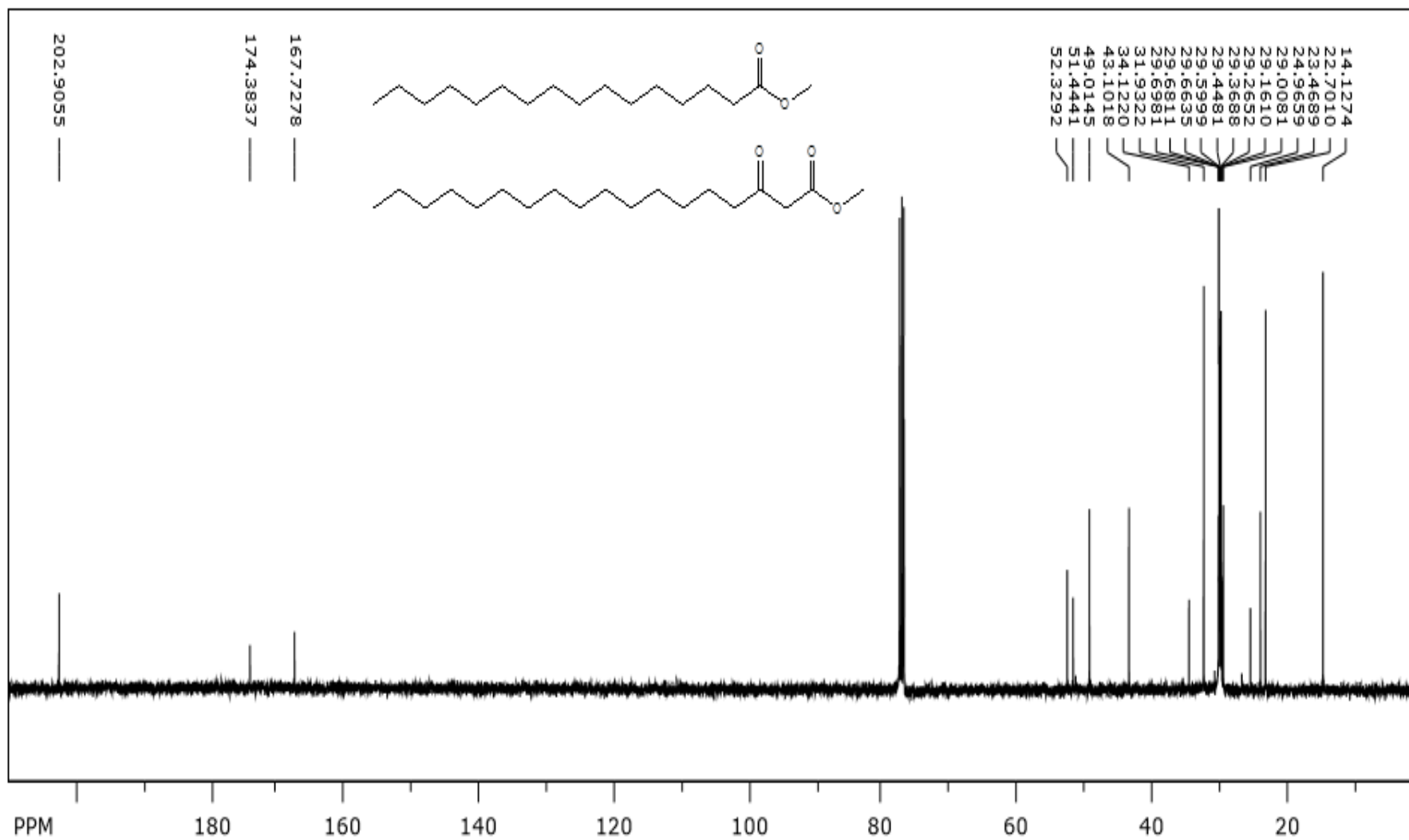
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  do intermediário a6



Espectro de RNM de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz) do intermediário **A6** formado na etapa 4 da reação



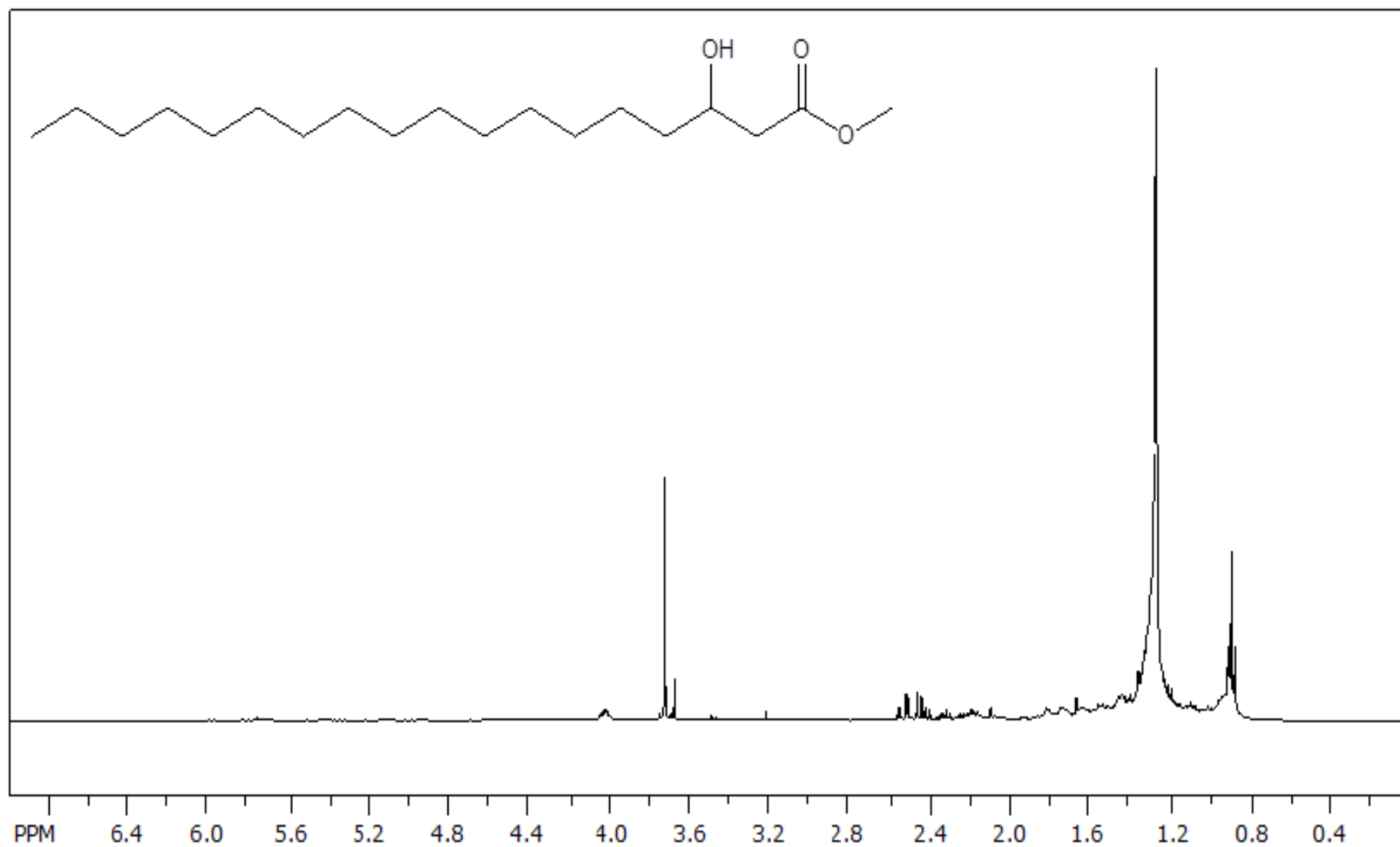
Ampliação na região de 3,40 a 3,8 ppm do espectro de RNM de  $^1\text{H}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz) do intermediário **A6**, formado na etapa 4 da reação

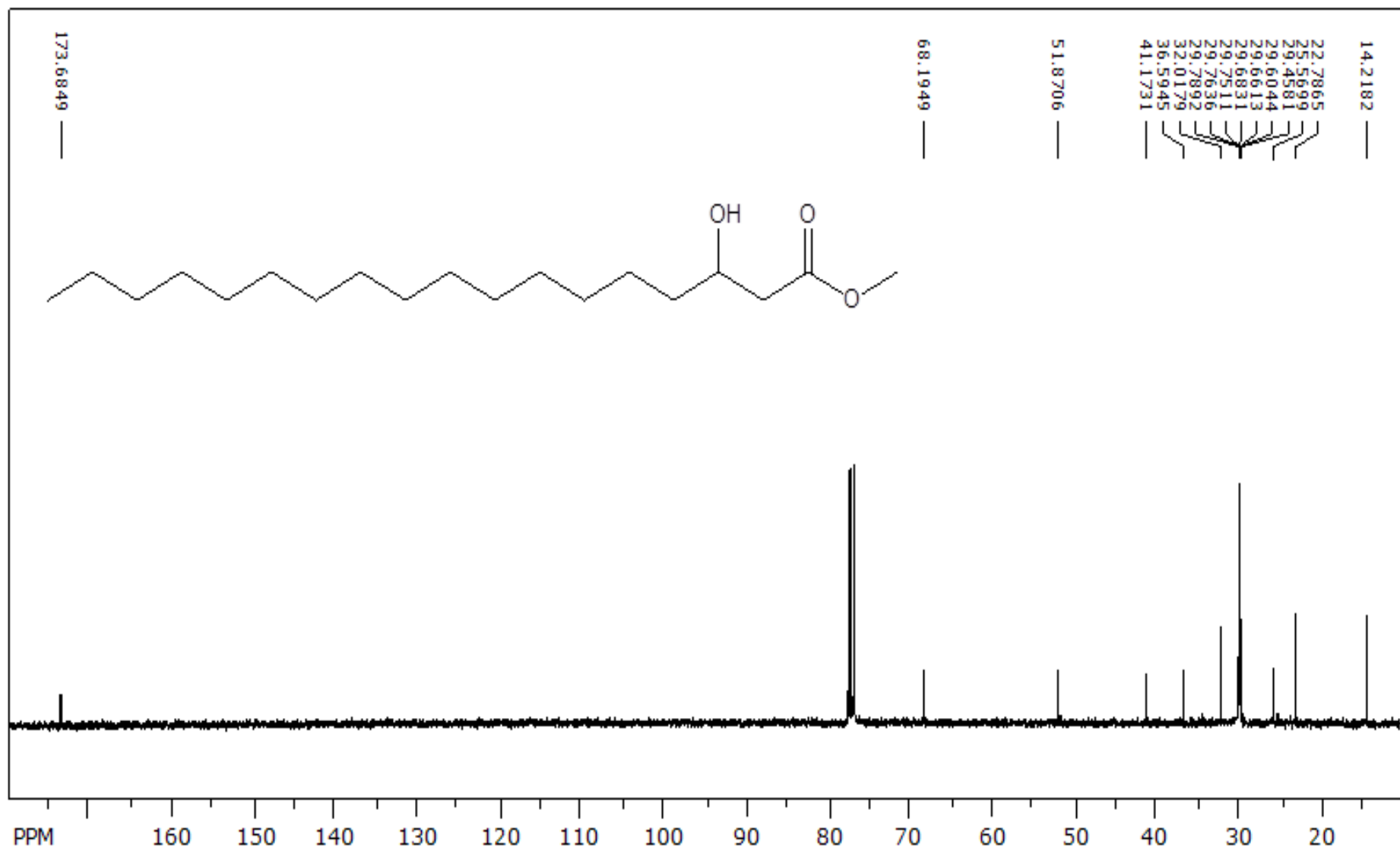


Espectro de RNM de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 75 MHz) do intermediário **A6** formado na etapa 4 da reação

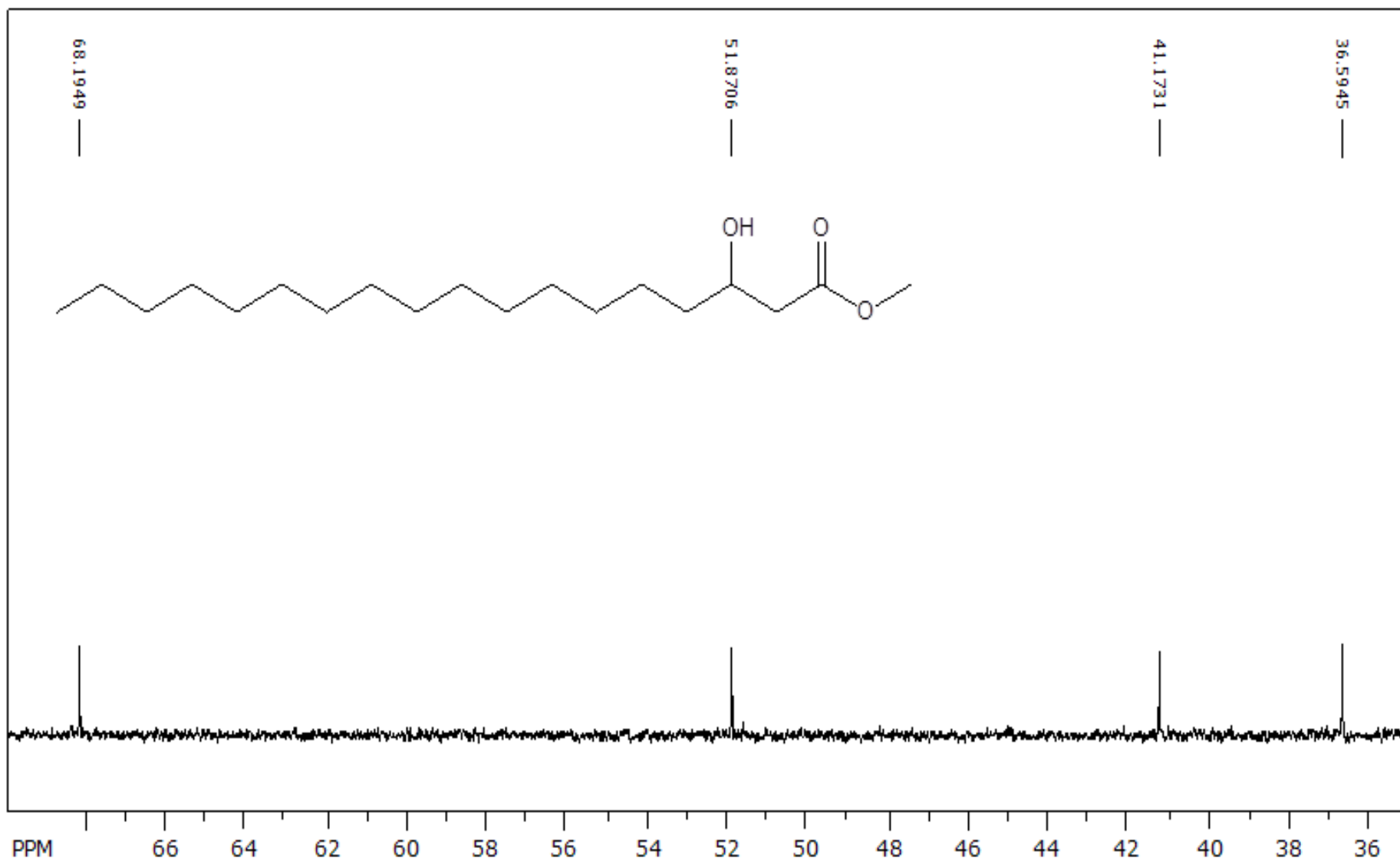
## ANEXO G

Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  do produto a7 purificado por CC





Espectro de RNM de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 75 MHz) do produto **A7** purificado por CC



Ampliação (35 a 70 ppm) do espectro de RNM de  $^{13}\text{C}$  ( $\text{CDCl}_3$ ; 75 MHz) do produto **A7** purificado por CC

## ANEXO H

Perfil agrupado das concentrações de micotoxinas associadas aos três tamanhos de material particulado (MP<sub>10</sub>, MP<sub>2,5</sub>, MP<sub>1,0</sub>)

