



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA



VITÓRIA ROVINA

Avaliação dos efeitos citotóxicos do surfactante ácido linear alquilbenzeno sulfônico por meio do teste de fragilidade osmótica em eritrócitos humanos

LORENA
2019

VITÓRIA ROVINA

Avaliação dos efeitos citotóxicos do surfactante ácido linear alquilbenzeno sulfônico por meio do teste de fragilidade osmótica em eritrócitos humanos

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Escola de Engenharia de Lorena – Universidade de São Paulo como requisito parcial para conclusão da graduação no curso de Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Morun Bernardino Neto

Versão Original

LORENA

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Rovina, Vitória

Avaliação dos efeitos citotóxicos do surfactante ácido linear alquilbenzeno sulfônico por meio do teste de fragilidade osmótica em eritrócitos humanos / Vitória Rovina; orientador Morun Bernardino Neto. - Lorena, 2019.
64 p.

Monografia apresentada como requisito parcial para a conclusão de Graduação do Curso de Engenharia Química - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2019

1. Las. 2. Agrotóxicos. 3. Toxicidade. 4. Tensoativo. 5. Surfactante. I. Título. II. Neto, Morun Bernardino, orient.

“São as nossas escolhas que revelam o que realmente somos, muito mais do que as nossas qualidades.”

“Haverá um momento em que teremos que escolher entre o que é fácil e o que é certo.”

“A felicidade pode ser encontrada mesmo nas horas mais difíceis, se você lembrar de acender a luz.”

ROWLING, J.k.. **Harry Potter**. Reino Unido: Rocco, 2002

Dedicatória

Dedico este trabalho de conclusão de curso aos meus pais, avós, irmãos, tios e ao meu namorado. Tudo o que eu tenho e conquistei até hoje foi graças à minha família, que sempre foi minha base e me suportou em todos os momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, primeiramente, por ter me dado forças e saúde para superar os desafios e as dificuldades.

À toda a minha família e especialmente aos meus pais pelo amor, apoio e confiança incondicional durante toda a minha trajetória até aqui, sempre estando ao meu lado, me motivando a buscar o melhor para o meu futuro. Por abrir mão do convívio diário para que eu tivesse a chance de estudar e me preparar para todas as etapas da vida.

Ao meu namorado, Ramon, pelo companheirismo, apoio e compreensão nos momentos mais difíceis, fazendo eu me reerguer todas as vezes.

A todos os professores da EEL-USP que demonstraram paixão pelo ensino e empatia com seus alunos, por entenderem nossas dificuldades e nos suportarem frente aos desafios da Engenharia. Em especial ao meu excepcional orientador Prof. Dr. Morun Bernardino Neto, por ter me acolhido tão bem e sempre se dispor a me ajudar, pelo excelente trabalho e paciência com relação ao desenvolvimento desta monografia.

Aos meus amigos de Lorena, que me acompanharam durante toda a minha trajetória na graduação, e às minhas amigas da República Dirce, que dividiram um lar comigo e se tornaram minha família Lorenense. O companheirismo, suporte, carinho e empatia de vocês foi essencial para eu conseguir chegar até aqui, e continuará sendo ao longo das próximas etapas de nossas vidas.

Agradeço especialmente à Secretaria Municipal de Saúde da Prefeitura de Lorena por ceder as amostras de sangue e ao Laboratório de Polímeros da EEL-USP por ceder o surfactante DBSNa para a realização deste trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram com a minha formação, o meu muito obrigado.

RESUMO

ROVINA, Vitória. **Avaliação dos efeitos citotóxicos do surfactante ácido linear alquilbenzeno sulfônico por meio do teste de fragilidade osmótica em eritrócitos humanos**. 2019. Monografia (TCC) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

Tensoativos ou surfactantes são componentes dos agrotóxicos, de produtos de limpeza doméstica e cosméticos. Eles atuam como emulsionantes, dispersantes e adjuvantes no agroquímico, podendo aumentar a eficiência do produto ativo ou modificar propriedades da solução, visando facilitar a aplicação ou minimizar possíveis problemas na lavoura. Entre os surfactantes mais utilizados para a produção de agrotóxicos e produtos de limpeza e cuidados pessoais está o ácido linear alquilbenzeno sulfônico (LAS). Sua grande empregabilidade pode ser explicada por ser um eficiente removedor de sujeira, possuir alta solubilidade a baixas temperaturas, elevado poder de espuma e biodegradabilidade. Tendo em vista seu intenso uso e extensa aplicação, torna-se necessário conhecer os efeitos toxicológicos que o caotrópico (LAS) pode exercer nos humanos, assim como o comportamento da membrana eritrocitária em presença deste composto químico. Com essa finalidade, o teste de fragilidade osmótica dos eritrócitos (FOE) nos permite identificar qual a concentração de LAS na corrente sanguínea suficiente para que 50% das hemácias sofram lise, parâmetro que demonstra o grau de citotoxicidade dos LAS aos humanos. Foram feitas as curvas da dependência de lise celular, seguidas das análises descritiva exploratória e teste de normalidade, assim como a busca por correlações entre as variáveis do eritrograma, série branca, lipidograma, idade e os parâmetros de estabilidade celular, dX e H_{50} . O teste FOE mostrou que em maiores concentrações de caotrópico as hemácias sofrem maior lise. Com a determinação das concentrações de tensoativo que causam o início da hemólise, H_{50} (50%) e 100% de hemólise, verificou-se que os valores de H_{50} para cobaias são da ordem de 5,3 a 13,8 vezes maiores do que o encontrado experimentalmente para humanos. Portanto, os resultados encontrados sugerem que os prejuízos à saúde humana não são bem avaliados por meio de experimentos feitos com cobaias visto que eritrócitos humanos parecem ser bem mais sensíveis.

Palavras-chave: LAS, agrotóxicos, toxicidade, tensoativo, surfactante.

ABSTRACT

ROVINA, Vitória. **Evaluation of cytotoxic effects of linear alkylbenzene sulfonic acid surfactant by osmotic fragility testing in human erythrocytes.** 2019. Monograph (TCC) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

Surfactants are components of pesticides, household cleaners and cosmetics. They act as emulsifiers, dispersants, humectants and adjuvants in the agrochemical, being able to increase the efficiency of the active product or modify certain properties of the solution, in order to facilitate application or minimize possible problems in the crop. Among the most commonly used surfactants to produce pesticide dispersants and cleaning and personal care products is linear alkylbenzene sulfonic acid (LAS). Its great usage can be explained by being an efficient dirt remover, high solubility at low temperatures, high foaming power and biodegradability. Given its intense use and extensive application, it is necessary to know the toxicological effects that LAS can exert on humans, as well as the behaviour of the erythrocyte membrane in the presence of this chemical compound. For this purpose, the erythrocyte osmotic fragility (FOE) test allows us to identify which concentration of LAS in the bloodstream is sufficient for 50% of red blood cells to undergo lysis, a parameter that demonstrates the degree of cytotoxicity of LAS to humans. Cell lysis dependence curves were made, followed by exploratory descriptive analysis and normality test, as well as the search for correlations between the erythrogram, white series, lipidogram and individual variables and the cell stability parameters, dX and H_{50} . The FOE test showed that in higher concentrations of chaotropic red blood cells undergo greater lysis. With the determination of the surfactant concentrations that cause the beginning of haemolysis, H_{50} (50%) and 100% haemolysis, it was found that the values of H_{50} for guinea pigs are of the order 5.3 to 13.8 greater than that found experimentally for humans. Therefore, the results found suggest that damage to human health is not well evaluated through experiments with guinea pigs since human erythrocytes appear to be much more sensitive.

Key words: LAS, pesticides, toxicity, surfactant.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo geral	23
2.2. Objetivos específicos	23
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1. Surfactantes (tensoativos)	24
3.2. Ácido linear alquilbenzeno sulfônico (LAS)	26
3.3. Toxicologia: estabilidade das membranas eritrocitárias	31
3.4. Fragilidade osmótica dos eritrócitos (FOE)	32
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1. Considerações éticas.....	35
4.2. Amostras de material biológico	35
4.3. Reagentes.....	36
4.4. Teste de FOE na presença do surfactante	37
4.5. Determinação das curvas de transição de hemólise	39
4.6. Concentração de DBSNa investigada.....	41
4.7. Determinação de variáveis bioquímicas e hematológicas.....	41
4.8. Análise estatística dos dados experimentais	42
5. RESULTADOS	43
5.1. Avaliação da citotoxicidade do LAS	43
5.2. Análise descritiva exploratória	47
5.3. Teste de normalidade exploratória Shapiro-Wilk	50
5.4. Matriz de correlações de Spearman	51
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÃO.....	58
8. REFERÊNCIAS	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Descrição e caracterização resumida do mercado de tensoativos no Brasil	18
Figura 2 - Mercado Brasileiro de Tensoativos por subsegmento	18
Figura 3 - Principais produtos por subsegmento de tensoativos (produção em kton)	19
Figura 4 - Fluxograma que ilustra as possíveis interações de humanos com o LAS	21
Figura 5 - Exemplo da estrutura de um tensoativo	25
Figura 6 - Estrutura molecular da cadeia do ácido linear alquilbenzeno sulfônico (LAS)	27
Figura 7 - Ilustração da hemácia e o transporte de oxigênio no interior dela..	33
Figura 8 - Ilustração do teste de fragilidade osmótica em eritrócitos humanos	34
Figura 9 - Amostras de material biológico.....	36
Figura 10 - Fórmula estrutural do DBSNa.....	37
Figura 11 - DBSNa utilizado nos experimentos	37
Figura 12 - Banho termostatizado a 37,5 °C	38
Figura 13 - Tubos eppendorfs com adição de sangue: (a) antes do banho termostatizado; (b) após o banho termostatizado	38
Figura 14 - Centrífuga com capacidade máxima de 16 tubos.....	39
Figura 15 - curva típica de dependência entre a absorbância a 540 nm e a concentração de agente químico tóxico em um teste de fragilidade osmótica. Amín representa a absorbância mínima média e está associada à hemólise na ausência do toxicante ou a concentrações abaixo daquela que gera efeitos observáveis. Amáx representa a absorbância média máxima e está associada à hemólise total. H50 representa a concentração de toxicante necessária para promover 50% de hemólise e dX representa a alteração na concentração de agente tóxico associada à transição dos estados de estabilidade e hemólise total	40
Figura 16 - Curva de fragilidade eritrocitária induzida pela variação da concentração de SDS e concentração de NaCl constante em 0,9 g/dL	41
Figura 17 - Curva de hemólise das quatro amostras analisadas com concentração constante [NaCl]=0,9 g/dL	44

Figura 18 - Curva de hemólise do indivíduo 1 (55 anos) analisada com concentração constante [NaCl]=0,9 g/dL	45
Figura 19 - Curva de hemólise do indivíduo 2 (19 anos) analisada com concentração constante [NaCl]=0,9 g/dL	45
Figura 20 - Curva de hemólise do indivíduo 3 (45 anos) analisada com concentração constante [NaCl]=0,9 g/dL	46
Figura 21 - Curva de hemólise do indivíduo 4 (38 anos) analisada com concentração constante [NaCl]=0,9 g/dL	46
Figura 22 - Imagens dos tubos eppendorfs com concentrações crescentes de DBSNa (da esquerda para a direita) após serem centrifugados	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de estabilidade dX, H50 e valores mínimo ($A_{\min}$) e máximo ($A_{\max}$) de absorbância encontrados experimentalmente para cada indivíduo	47
Tabela 2 - Análise descritiva exploratória dos parâmetros de estabilidade dX, H50, $A_{\min}$, $A_{\max}$, das variáveis do eritrograma, série branca e lipidograma da população (n=4)	49
Tabela 3 - Teste de normalidade Shapiro Wilk dos parâmetros de estabilidade dX, H50, $A_{\min}$, $A_{\max}$, das variáveis do eritrograma, série branca e lipidograma da população (n=4)	50
Tabela 4 – Matriz de correlações de Spearman entre os parâmetros de estabilidade dX, H50, $A_{\min}$ e $A_{\max}$ com as variáveis do eritrograma, série branca, lipidograma e idade	52
Tabela 5 - Análise do índice de correlação de Spearman ρ das variáveis em relação aos parâmetros de estabilidade dx e H50	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
$A_{\min}$	Absorbância mínima
$A_{\max}$	Absorbância máxima
ABS	Alquil Benzeno Sulfonatos
ACS	Sociedade Química Americana
BNDES	Banco Nacional do Desenvolvimento
BT	Biotechnica Instruments
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos
CHCM	Concentração De Hemoglobina Corpuscular Média
DBSNa	Dodecilbenzeno Sulfonato de Sódio
DL50	Dose letal 50%
dX	Amplitude da transição sigmoidal entre $A_{\min}$ e $A_{\max}$
ERO	Espécies Reativas De Oxigênio
ETE	Estação de Tratamento de Água e Esgoto
FOE	Fragilidade Osmótica Eritrocitária
FISPQ	Ficha de informações de segurança de produtos químicos
Hb	Hemoglobina
HCM	Quantidade De Hemoglobina Corpuscular Média
HDL	Lipoproteínas de Alta Densidade
HERA	<i>Human and Environmental Risk Assessment on ingredients of household cleaning products</i> - Avaliação de Risco Humano e Ambiental em ingredientes de produtos de limpeza domésticos
H_{50}	Concentração de toxicante necessária para promover 50% de hemólise das hemácias
LDL	Lipoproteínas de Baixa Densidade
LMR	Limite Máximo de Resíduos
LAS	Ácido Linear Alquilbenzeno Sulfônico
NOAEL	<i>No Observed Adverse Effect Level</i> - Nível de efeitos adversos não observados
RDW	Variação Dos Tamanhos Celulares
SDA	Associação de Sabão e Detergente
TS	Tensão Superficial

VCM	Volume Corpuscular Médio
$X_{\min}$	Concentração de toxicante necessária para iniciar a hemólise
$X_{\max}$	Concentração de toxicante necessária para promover a lise total dos glóbulos vermelhos

1. INTRODUÇÃO

A interação dos sistemas biológicos com os compostos químicos sempre esteve presente no processo evolutivo humano. Desde os primórdios da civilização o homem faz usos de compostos químicos, seja na fabricação de armas e objetos metálicos rudimentares, como nas tintas utilizadas na arte rupestre nas cavernas pré-históricas. O ambiente de desenvolvimento fabril, iniciado com a revolução industrial no século XIX e o intenso desenvolvimento tecnológico do século XX, ampliaram imensamente a quantidade de compostos químicos disponíveis. Com o aumento da disponibilidade de substâncias químicas, propiciado pelo avanço tecnológico, a toxicologia ganhou maior importância dado seu objetivo de proteger a sociedade dos efeitos tóxicos (RUPPENTHAL, 2013).

Os surfactantes (agentes de ação superficial) fazem parte de um grupo diverso de produtos químicos que são conhecidos por suas propriedades de solubilidade e limpeza, o que lhes garante um espaço especial entre os detergentes e outros produtos de limpeza. Quantidades massivas de surfactantes estão sendo usadas em ambientes domésticos e na indústria diariamente, sendo que, em sua maioria acabam sendo dispersas e descartadas no meio ambiente (solo, água, água residual e outros tipos de águas de descarte). Mais de 4,2 milhões de toneladas de produtos detergentes foram usadas anualmente na Europa Ocidental nos últimos dez anos. No mesmo período, a produção mundial de surfactantes sintéticos foi de 7,2 milhões de toneladas (DONNACHIE, 2016). Sem dúvida, esses números vão crescer ainda mais com a ascendente indústria de detergentes e cosméticos e com o uso contínuo e diário destes produtos pela população mundial.

Entre os variados tipos de substâncias e composições de produtos químicos disponíveis hoje no mercado, os agrotóxicos, mais conhecidos como pesticidas, defensivos agrícolas ou defensivos fitossanitários, têm como objetivo eliminar, prevenir ou combater pragas por meio de seus componentes ativos. Entretanto, as substâncias consideradas inertes e que fazem parte de sua formulação como estabilizantes, dispersantes e conservantes não são totalmente livres de ação tóxica e chamam a atenção quanto à toxicidade dos seus componentes ao meio ambiente e à saúde humana. A determinação dos limites de segurança para uso dos agrotóxicos deve considerar os efeitos negativos à saúde humana não apenas dos componentes ativos, mas também dos demais componentes das fórmulas comercializadas.

Atualmente, a liberação de agrotóxicos no Brasil é a maior em 14 anos. Já foram liberados pelo governo Bolsonaro para uso no campo 290 pesticidas no período de 1 de janeiro de 2019 e 22 de julho de 2019, 41% deles de extrema ou alta toxicidade e 32% banidos na União Europeia. Este ritmo de registros é o maior na última década, nunca tantos agrotóxicos foram liberados num intervalo de tempo tão curto no Brasil. O último levantamento da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação mostra que o Brasil foi o país que mais despendeu gastos com agrotóxicos no mundo, à frente de Estados Unidos, China, Japão e França (DAMASIO, KERVALT, 2019).

Diversos pesticidas já proibidos em outros países por causarem significativos danos ao meio ambiente e aos seres humanos, continuam liberados para uso no Brasil. Empresas multinacionais produtoras de agrotóxicos que não têm permissão para vender tais produtos nos seus países de origem, os comercializam no Brasil por serem liberados. A Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) publicou em 1 de agosto de 2019, no Diário Oficial da União, a reclassificação toxicológica dos agrotóxicos já registrados no Brasil. No total, 1.942 produtos foram avaliados pela Agência, sendo que 1.924 foram reclassificados. De acordo com a reclassificação, 43 produtos foram enquadrados na categoria de produtos extremamente tóxicos, 79 na de altamente tóxicos, 136 na categoria de moderadamente tóxicos, 599 na de pouco tóxicos e outros 899 foram classificados como produtos improváveis de causar dano agudo. Outros 168 produtos, ainda, foram categorizados como “não classificados” (ASCOM/ANVISA, 2019). Além disso, para se obter o registro de um pesticida, somente os efeitos tóxicos do ingrediente ativo isolado são considerados, o que não é exato ou real pois a formulação comercial apresenta diversos outros componentes que, agindo simultaneamente, podem produzir danos sinérgicos, aditivos ou antagônicos à saúde. Devemos considerar também que são utilizados mais de um tipo de produto agrícola na mesma cultura, dessa forma, esses efeitos de interação entre as formulações são potencializados.

No período de 2007 a 2017, data do último levantamento oficial, foram contabilizados no Ministério da Saúde cerca de 40 mil casos de intoxicação aguda por agrotóxicos, ademais, segundo a Organização Mundial de Saúde, é estimado que para cada caso de intoxicação notificado existem outros 50 que não são notificados. Destes casos, quase 1900 pessoas morreram (GLOBO RURAL, JORNAL NACIONAL, 2019).

Um conceito importante a se considerar quando se trata de toxicologia dos pesticidas é o LMR (Limite Máximo de Resíduos), definido como a quantidade máxima de resíduo de agrotóxico permitida em alimentos. Os LMRs brasileiros, estabelecidos pela Anvisa, são bem maiores que os da União Europeia. Na plantação de soja, por exemplo, o LMR brasileiro é duzentas vezes maior que o limite europeu, assim como o feijão, em que seu LMR no Brasil é quatrocentas vezes maior que na União Europeia (ANVISA, 2019).

Dentre os componentes usados na formulação de agrotóxicos, os grandes responsáveis pela dispersão e absorção do produto nas plantações são os tensoativos ou surfactantes. Estes têm como função facilitar a aplicação dos pesticidas, dando estabilidade ao componente ativo e garantindo o espalhamento destes nas plantas.

Além da utilização na indústria de agrotóxicos, os tensoativos são os principais componentes dos produtos de cuidados pessoais (por exemplo, xampus, sabonetes líquidos) e produtos de limpeza doméstica (por exemplo, detergentes para lavar louça, detergentes para lavar roupas, limpadores de superfícies e pisos) (FOGAÇA, 2019).

Segundo APARICIO et. al. (2017) e BJERREGAARD et al. (2001), o surfactante mais utilizado para a produção de agrotóxicos e produtos de limpeza doméstica é o ácido linear alquilbenzeno sulfônico (LAS), devido a sua extensa empregabilidade.

No último relatório publicado em novembro de 2014 pela empresa Bain & Company, financiado pelo Banco Nacional do Desenvolvimento (BNDES), intitulado “Potencial de diversificação da indústria química Brasileira”, evidencia-se que os tensoativos aniônicos representam o subsegmento de tensoativos mais utilizado no Brasil devido ao custo relativamente mais baixo que os demais tipos de tensoativos, cenário em que destaca-se o LAS como principal produto deste subsegmento. Na figura 1 está representada a divisão dos segmentos do mercado de tensoativos no Brasil. Os dados atuais e as projeções na indústria brasileira também indicam que os tensoativos aniônicos possuem a maior participação no mercado, como representado na figura 2. Extraído destes dados, a produção de surfactantes em 2012 em kton, o LAS foi responsável por 84% da produção de tensoativos aniônicos, correspondente a aproximadamente 246.1 kton (dados extraídos da figura 3).

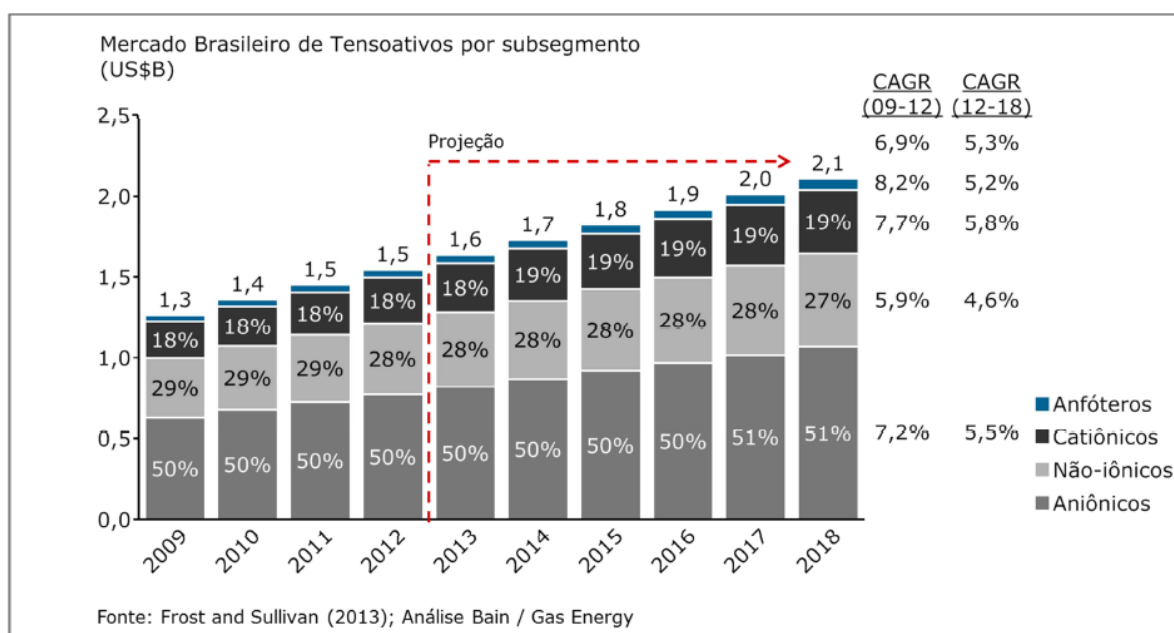
Figura 1 - Descrição e caracterização resumida do mercado de tensoativos no Brasil

	1 TENSIOATIVOS ANIÔNICOS	2 TENSIOATIVOS NÃO-IÔNICOS	3 TENSIOATIVOS CATIÔNICOS	4 TENSIOATIVOS ANFÓTEROS
Características	Região polar apresenta carga negativa	Não apresentam cargas verdadeiras	Região polar apresenta carga positiva	Dependendo do pH da solução, se comportam como aniônicos ou catiônicos
Mercado brasileiro	Subsegmento de tensoativos mais utilizado (volume e vendas)	Segundo subsegmento mais utilizado (volume e vendas) e com maior variedade em número de moléculas	Obteve o maior crescimento (volume e vendas) em 2012. Possui maior projeção de crescimento até 2018	Subsegmento menos representativo no mercado nacional e mundial
Principais produtos	LAS (Alquilbenzeno sulfonato linear) LESS (Lauril éter sulfato de sódio)	Polietilenoglicóis Álcoois, alquilfenóis e aminas etoxiladas	Sais quaternários de amônio	Betaínas
Principais produtos consumidores	Sabões em pó para roupas, detergentes para louça e xampus	Detergentes, produtos de limpeza industrial, outras aplicações industriais e emolientes e umectantes para cosméticos	Limpeza industrial e institucional, amaciantes e detergentes	Xampus, sabões líquidos e detergentes para louça

Fonte: Frost and Sullivan (2013); Análise Bain / Gas Energy

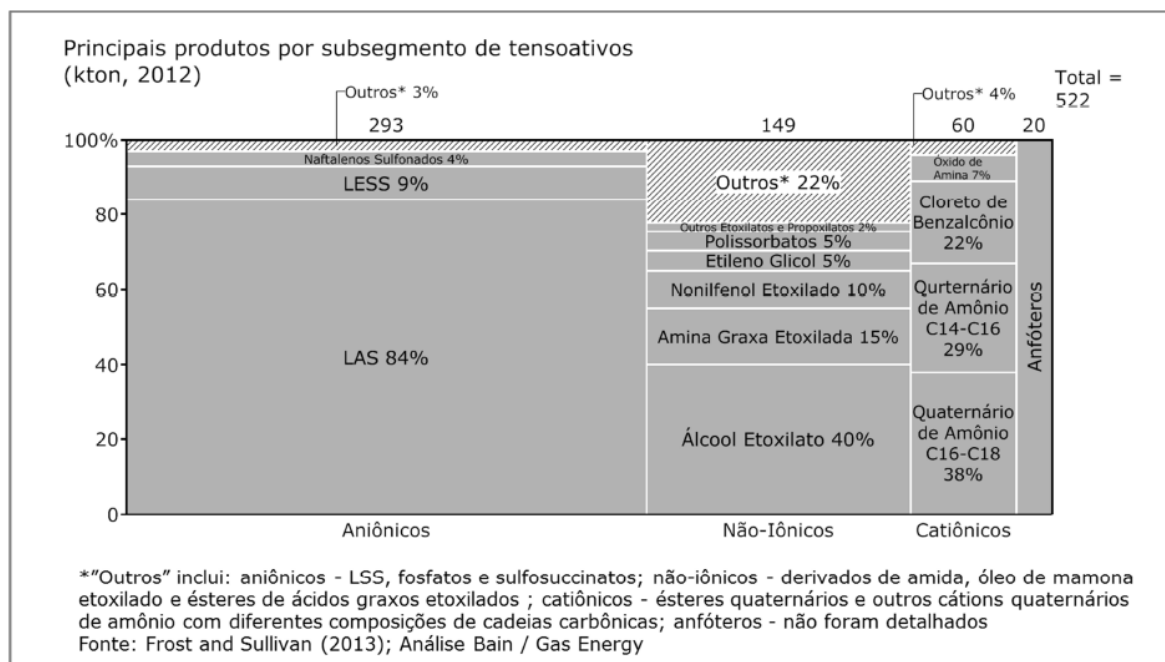
Fonte: BAIN & COMPANY, 2014.

Figura 2 - Mercado Brasileiro de Tensoativos por subsegmento



Fonte: BAIN & COMPANY, 2014.

Figura 3 - Principais produtos por subsegmento de tensoativos (produção em kton)



Fonte: BAIN & COMPANY, 2014.

Entre as diversas possibilidades de contato com surfactantes no dia-a-dia, estamos sujeitos à variados tipos de contato com tensoativos residuais, fato não muito conhecido e propagado nas mídias. Vegetais podem ser contaminados com estes surfactantes emergentes através da irrigação do solo com águas residuais recuperadas ou devido à presença de tensoativos como adjuvantes em formulações de pesticidas (ABRIL et al., 2018b). Agrotóxicos são absorvidos por vegetais nos quais são aplicados e, principalmente, ficam retidos em tubérculos, vastamente consumidos pela população em geral. Resíduos de tensoativos utilizados na composição de agrotóxicos, destacando-se o LAS, podem ser encontrados nos alimentos em que estes foram aplicados (APARICIO et. al., 2017). Consequentemente, esses resíduos acabam sendo ingeridos ao alimentarmos de vegetais folhosos e tubérculos sujeitos à irrigação com água residual ou tratados com agrotóxicos que possuem o LAS em sua composição.

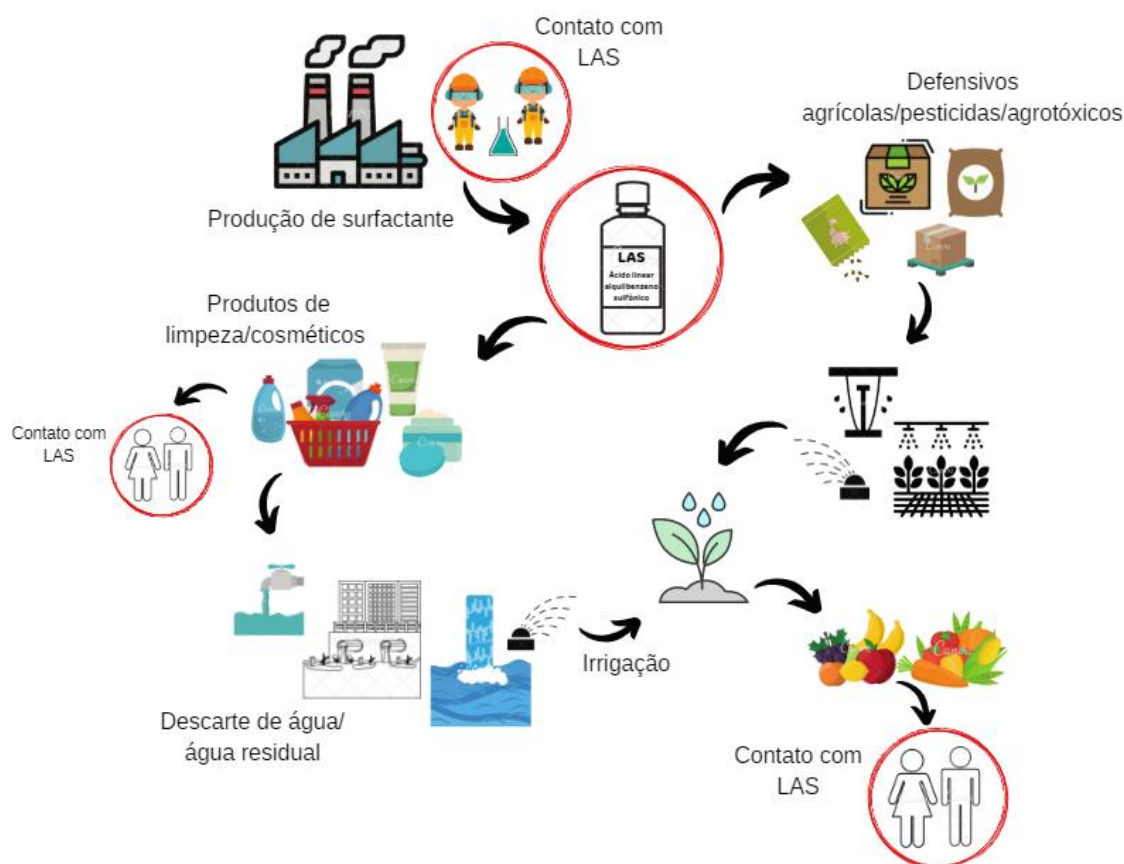
Após o uso, os surfactantes residuais são descartados em sistemas de esgoto ou diretamente nas águas superficiais. Eles também se acumulam em grandes quantidades em águas residuais, que podem ser utilizadas para irrigação de plantações (WU et al., 2015), fato que será abordado mais adiante no presente estudo. As concentrações/frações de massa do ácido linear alquilbenzeno sulfônico (LAS),

atingiram até 1,1 mg/L em efluentes de esgoto e até 30,2 g/kg na massa seca de lodo tratado. Até 0,4 mg/L de LAS foi encontrado em águas superficiais (IVANKOVIĆ; HRENOVIĆ, 2010).

Pesquisa recente determinou a concentração de diferentes tipos de surfactantes aniônicos, compostos perfluoretados, bisfenol A e produtos de cuidados pessoais em amostras de lodo residual de água tratada urbana e em amostras de solo do tipo mediterrâneo, coletados de uma área rural. Os surfactantes aniônicos foram os compostos mais frequentemente detectados (no caso do dodecil benzeno sulfonato de sódio, derivado do LAS, em 100% das amostras ele estava presente), com os maiores níveis de concentração (ABRIL et al., 2018a).

Como ilustrado no fluxograma da figura 4, estamos sujeitos ao contato com o LAS de diversas formas. Além dos riscos inerentes à ingestão do LAS, trabalhadores que operam processos na indústria química que utiliza o LAS como matéria prima, ou mesmo produz este composto como produto final, entram em contato frequente com ele, seja por inalação ou absorção pela pele. Nesse contexto existe também uma importante questão relativa à saúde ocupacional para esta classe de trabalhadores.

Figura 4 - Fluxograma que ilustra as possíveis interações de humanos com o LAS



Fonte: próprio autor.

Nesse cenário de diversas possibilidades de contato com o surfactante objeto do presente estudo (LAS), é de grande interesse o conhecimento dos riscos, do(s) impacto(s) negativo(s) e o nível de toxicidade ao organismo humano que esse componente de agrotóxicos, produtos de limpeza e cosméticos pode causar à população que entra em contato com ele. Porém, pouco se sabe sobre os prejuízos que o LAS pode causar aos humanos. Estão presentes na literatura dados da toxicidade do LAS apenas em animais comumente usados em pesquisas, como coelhos, ratos e peixes além de plantas (DETEN, 2020, BJERREGAARD et al., 2001, SHUKLA e TRIVEDI, 2018). Investigar os efeitos citotóxicos que o LAS pode produzir aos seres humanos, bem como os níveis seguros de exposição a esse toxicante e o perfil individual mais sensível à toxicidade é um estudo de interesse tanto da saúde do trabalhador como da saúde pública.

Para tal, procedimentos experimentais que empregam material biológico humano *in vitro* são usados para se avaliar o nível de agressividade dos toxicantes por meio dos seus efeitos sobre a homeostase das células. O estudo da Fragilidade Osmótica de Eritrócitos humanos (FOE) na presença da substância investigada, é um importante teste. As células do sangue são um bom modelo para estudar a estabilidade de membranas biológicas e a saúde geral do organismo. Atualmente, eritrócitos são considerados o tipo de célula mais conveniente para tais investigações, uma vez que são células simples e de obtenção não invasiva, cuja lise pode ser monitorada espectrofotometricamente na região do espectro visível (540 nm) devido à liberação de hemoglobinas no meio, após sua lise. Além disso, mudanças na composição e comportamento de suas membranas pode refletir a composição e o comportamento de outras células do organismo (PARAISO et al., 2014).

O estudo toxicológico dos surfactantes e outras substâncias químicas caotrópicas nos permite conhecer os efeitos nocivos do contato com eles, possibilitando dimensionar seus benefícios e malefícios aos humanos, além da análise de novos cenários para os usos de composições e produtos contendo o ácido linear alquilbenzeno sulfônico ou substâncias semelhantes.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar os efeitos citotóxicos em humanos do ácido linear alquilbenzeno sulfônico, um dos principais surfactantes utilizados na formulação de agrotóxicos, produtos de limpeza e cuidados pessoais, através do teste de Fragilidade Osmótica dos Eritrócitos (FOE).

2.2. Objetivos específicos

- Determinar os gráficos de fragilidade osmótica eritrocitária (Absorbância a 540nm x [toxicante]) para cada indivíduo em diversas concentrações de ácido linear alquilbenzeno sulfônico em meio de NaCl a 0,9 g/dL;
- Ajustar cada gráfico obtido à uma sigmoide de Boltzmann e obter graficamente os valores do parâmetro de estabilidade celular H_{50} , dX , $A_{máx}$ e $A_{mín}$;
- Analisar os dados de fragilidade celular obtidos na presença do ácido linear alquilbenzeno sulfônico em diversas concentrações e determinar os níveis seguros de exposição a ele por meio da determinação do seu *NOAEL (No Observed Adverse Effect Level)*, DL_{50} e DL_{100} ;
- Avaliar possíveis associações de variáveis moduladoras do eritrograma, lipidograma e variáveis individuais (gênero e idade) com a estabilidade da homeostase celular sob estresse provocado pelo caotrópico objeto desse estudo.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

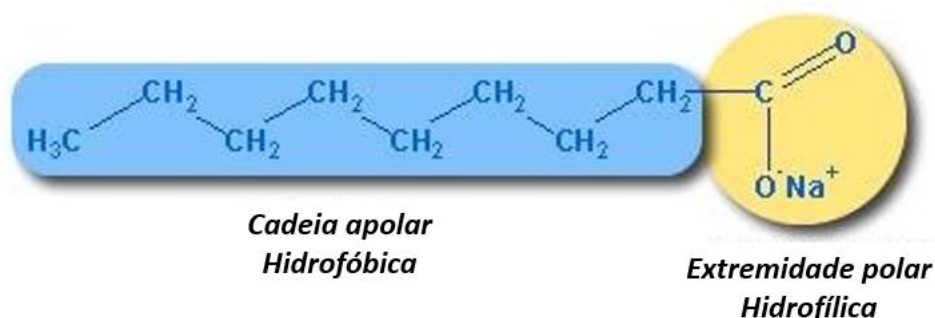
3.1. Surfactantes (tensoativos)

Os surfactantes, ou também chamados tensoativos, constituem uma classe de moléculas importantes e muito estudadas no mundo da Química. São substâncias capazes de diminuir a tensão superficial, ou seja, alteram as propriedades interfaciais e superficiais de um líquido. Tensão superficial é a força necessária para que um líquido se espalhe por um comprimento em uma superfície. Tensoativos possuem essa função devido à sua estrutura, composta por uma parte polar (hidrofílica) e uma parte apolar (hidrofóbica) (MOREIRA, 2014).

A parte apolar de um tensoativo normalmente tem origem em uma cadeia carbônica (linear, ramificada ou com partes cíclicas), pois os carbonos dessa cadeia, apesar de serem mais eletronegativos que os átomos de hidrogênio, não formam polos de concentração de carga eletrostática. A parte polar deve ser formada por alguns átomos que apresentem concentração de carga, com formação de um polo negativo ou positivo. A estrutura de um tensoativo é ilustrado na figura 5.

As características anfífilas e anfipáticas permitem que os tensoativos sejam utilizados como conciliadores de fases imiscíveis, formando emulsões, espumas, suspensões, microemulsões ou propiciando a umectação, formação de filmes líquidos e detergência de superfícies (DALTIM, 2011). Essas propriedades fazem com que os tensoativos sejam utilizados em uma ampla variedade de produtos de consumo, como produtos de cuidados pessoais (xampus, sabonetes líquidos) e em produtos de limpeza doméstica (detergentes para lavar louça, detergentes para lavar roupas, limpadores de superfícies e pisos).

Figura 5 - Exemplo da estrutura de um tensoativo



Fonte: LARA, 2019.

Os tensoativos podem ser classificados de acordo com a carga de seu grupamento na parte hidrofílica (polar) como: catiônicos, aniônicos ou anfóteros. Os surfactantes aniônicos são historicamente os mais antigos e o tipo mais comum de surfactante. Quando pensamos em detergentes ou sabonetes comuns, é o tensoativo aniônico que promove a limpeza. Deles, os surfactantes mais comuns são os aniônicos que apresentam sulfato na estrutura, como o lauril sulfato de sódio, lauril sulfato de amônio ou o LAS (DALTIM, 2011), objeto do presente estudo.

Detergentes que continham esses surfactantes aniônicos aumentaram em popularidade porque forneciam melhor limpeza e mais espuma do que os sabonetes tradicionais a preços mais baixos. Por volta de 1953, na América do Norte, o volume de vendas em peso de produtos detergentes contendo surfactante sintético superou o dos sabões convencionais (que não utilizavam tensoativos sintéticos em sua composição). Esta rápida expansão de detergentes sintéticos levou a desafios ambientais como a água residual que era descarregada em águas superficiais (COWAN-ELLSBERRY et al., 2014).

Os tensoativos estão presentes também na composição dos agrotóxicos: herbicidas, inseticidas, fungicidas, entre outros. Nesses produtos químicos, os tensoativos atuam como emulsionantes, dispersantes, umectantes e adjuvantes do agroquímico, que são substâncias adicionadas à formulação herbicida ou à calda herbicida para aumentar a eficiência do produto ativo ou modificar determinadas propriedades da solução, visando facilitar a aplicação ou minimizar possíveis problemas. Além disso, tensoativos garantem a estabilidade do composto e a data de validade para as formulações agroquímicas, além de auxiliar a aglutinar os grânulos

dos fertilizantes, solubilizar, dispersar e emulsionar os ingredientes ativos, facilitando a aplicação dos produtos e otimizando a eficácia agrônômica, com ótimo controle fitossanitário e rentabilidade ao agricultor. Os adjuvantes são divididos em dois grupos: os modificadores das propriedades de superfície dos líquidos (surfactantes: umectante, detergentes, dispersantes e aderentes, entre outros) e os aditivos (óleo mineral ou vegetal, sulfato de amônio e ureia, entre outros) que afetam a absorção do vegetal devido à sua ação direta sobre a cutícula da planta. Os herbicidas precisam ser absorvidos para exercerem seus efeitos. Existem muitas substâncias que podem ser usadas para promover maior cobertura das folhas e para aumentar a absorção dos herbicidas. A cobertura da folha é importante principalmente para herbicidas com ação localizada. Para este herbicida ser eficiente é necessário cobertura uniforme das partes tratadas, conseguida com uso de um adjuvante (tensoativo) (VARGAS e SCHERER ROMAN, 2006).

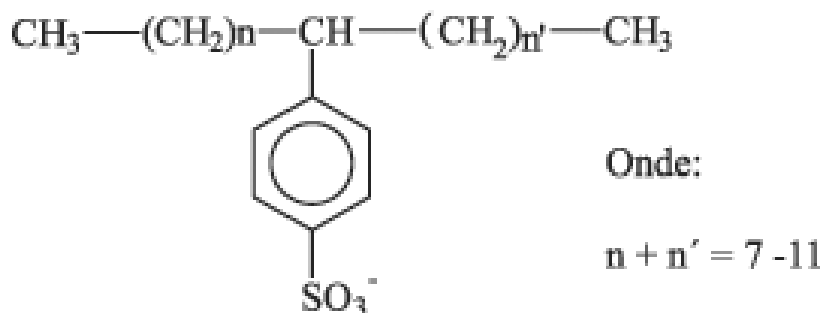
3.2. Ácido linear alquilbenzeno sulfônico (LAS)

O LAS surgiu como uma alternativa ecologicamente favorável ao grupo de tensoativos mais utilizado anteriormente, os alquil benzeno sulfonatos (ABS). No final da década de 1940, a formação de espuma em riachos e em Estações de Tratamento de Água e Esgoto (ETEs) geraram grande preocupação e foram os primeiros indícios de contaminação por resíduos de detergentes e produtos de limpeza e cuidados pessoais a serem reportados. No início dos anos 1950 evidências científicas identificaram a causa sendo a presença de surfactantes sintéticos, especialmente ABS, o surfactante mais utilizado, porque não era facilmente biodegradável. A observação dos impactos ambientais levou a um compromisso em 1951 firmado pela Associação Americana de Produtores de Sabonetes e Glicerina (fundada em 1926), antecessor da Associação de Sabão e Detergente (SDA). A SDA foi formada em 1962 para estudar o destino ambiental e os efeitos do uso de surfactante sintético e para procurar substitutos que não resultariam em impactos irreversíveis nas águas superficiais. Após pesquisas, em 1965, fabricantes norte-americanos de detergentes substituíram voluntariamente o ABS pelo LAS, que garantiu as mesmas características de desempenho de limpeza, mas era comprovadamente mais biodegradável (COWAN-ELLSBERRY et al., 2014).

LAS é uma mistura de compostos isômeros e homólogos estreitamente relacionados. Cada um contém um anel aromático sulfonado na posição ‘-para’ e

ligado a uma cadeia alquílica linear (HERA, 2013). Possui fórmula molecular empírica $(C_nH_{2n+1})-C_6H_4SO_3H$ e peso molecular 318 a 322 g/mol. Sua estrutura está representada na figura 6.

Figura 6 - Estrutura molecular da cadeia do ácido linear alquilbenzeno sulfônico (LAS)



Fonte: PENTEADO et al., 2006.

LAS comerciais estão disponíveis no mercado como uma mistura de homólogos, com um comprimento diferente da cadeia alquílica (de C_{10} a C_{14}). O consumo anual europeu de surfactantes em 2011 foi 2,95 Mton, dos quais 1,22 Mton corresponde aos tensoativos aniônicos. Devido ao extenso uso e produção, eles acabam presentes nas águas residuais nas ETES, onde são removidos principalmente por processos biológicos e físicos. Devido a restritas rotas metabólicas, o LAS não é biodegradável sob condições anaeróbicas, mas são altamente biodegradados sob condições aeróbicas. Não obstante, a principal remoção do LAS de águas residuais ocorre através da retenção em sólidos suspensos. As taxas de remoção de LAS foram superiores a 80% na maioria dos estudos relatados na literatura. No entanto, este tensoativo não é completamente removido em ETES e, conseqüentemente, acabam sendo continuamente introduzidos no ambiente. Foram coletadas amostras de efluentes urbanos e industriais em quatro ETES em Sevilha (Espanha) antes e após estes passarem por pré-tratamento, tratamento primário (sedimentação) e secundário (lodo ativado). Os homólogos de LAS foram encontrados em todas as amostras de águas residuais antes de serem tratadas e em 83% dos efluentes tratados estudados nas ETES. Suas concentrações médias foram de $240 \pm 121 \mu\text{g/L}$ (LAS C_{13}) para $1224 \pm 546 \mu\text{g/L}$ (LAS C_{11}) em águas residuais não tratadas e de $7,94 \pm 14,4 \mu\text{g/L}$ (LAS C_{13}) a $37,0 \pm 51,0 \mu\text{g/L}$ (LAS C_{11}) no efluente das ETES. As concentrações

encontradas entre homólogos de LAS foram próximos das quantidades encontradas em detergentes comerciais de limpeza doméstica e utilizados em lavanderias, detergentes líquidos para lavagem de mãos, xampus e outros de cuidados pessoais. Esta distribuição, bem como as concentrações medidas em águas residuais não tratadas, próximas àquelas medidas em efluentes urbanos, aponta para as águas residuais domésticas como a principal fonte poluente ao meio ambiente. Estes resultados estavam de acordo com os relatados em outras ETes da Espanha, em que as concentrações de águas residuais efluentes de ETes urbanas são superiores às medidas em ETes de áreas industriais (CAMACHO-MUÑOZ et al., 2013).

O consumo europeu de LAS em aplicações de detergentes informado pelo HERA (*Human and Environmental Risk Assessment on ingredients of house hold cleaning products* - Avaliação de Risco Humano e Ambiental em ingredientes de produtos de limpeza domésticos) foi de cerca de 350 kton em 2005. Isto representa mais de 80% do consumo total europeu de LAS, que foi estimada em cerca de 430k ton no ano de 2005 (HERA, 2013).

Dentre os surfactantes aniônicos mais utilizados para a produção de dispersantes de agrotóxicos está o LAS (APARICIO et. al., 2017). Sua grande empregabilidade pode ser explicada por ser um eficiente removedor de sujeira, possuir excelente solubilidade mesmo a baixas temperaturas, elevado poder de espuma e grande biodegradabilidade.

O LAS, como um surfactante, é considerado tóxico. A toxicidade dos surfactantes está relacionada com o tipo de grupamento polar e com o comprimento da cadeia alquila apolar. Cadeias alquílicas maiores podem causar efeitos mais severos provocando destruição da membrana celular e desnaturação de proteínas (DELFORNO, 2011).

Estudos comprovam os efeitos tóxicos do LAS em organismos aquáticos, nos quais foram estudados os efeitos deste no transporte de íons e cálcio intracelular nas células epiteliais distais dos rins de espécies diferentes de peixes. Pesquisas indicam que a homeostase iônica das células epiteliais destes organismos pode ser perturbada pelo LAS, possivelmente devido à solubilização de proteínas e lipídios na membrana plasmática (BJERREGAARD et al., 2001). Pensa-se que o LAS, sendo um detergente, perturba as biomembranas por intercalação na matriz da membrana e aumenta a solubilidade dos componentes lipídicos e das proteínas. Assim, a alteração no transporte de íons da membrana celular deve ser medida porque pode representar

uma fase inicial na evolução da lesão da membrana. Experimentos mostraram que o LAS induziu um aumento no transporte iônico ativo e aumentou a concentração de cálcio intracelular no intervalo de concentração estudado, o que levou a agudas alterações comportamentais em peixes, como secreção excessiva de muco, aumento da frequência de abertura do opérculo, dificuldade respiratória e morte. Estes resultados são apoiados por estudos que mostram que detergentes aniônicos tinham maior afinidade de ligação às proteínas do que detergentes não iônicos.(BJERREGAARD et al., 2001).

Vários estudos documentaram que os produtos metabólicos provenientes do LAS geram espécies reativas de oxigênio (ERO) que impõem estresse oxidativo em vários tecidos de organismos vivos. A alta concentração intracelular de ERO perturba a homeostase redox intracelular e consequentemente danifica as macromoléculas biologicamente importantes como lipídios, ácidos nucleicos, enzimas e proteínas. Isso leva a alterações no sistema homeostático intracelular e inicia a disfunção molecular. Além disso, os surfactantes aniônicos também são conhecidos modificadores da permeabilidade da membrana e, portanto, afetam negativamente a viabilidade celular. Os efeitos tóxicos produzidos pelas EROs podem ser claramente reestabelecidos pelo tratamento de células com N-acetil cisteína (NAC), um potente antioxidante que elimina as EROs para proteger as células contra o dano oxidativo (SHUKLA e TRIVEDI, 2018). Shukla e Trivedi (2018) elucidam que a exposição, mesmo a uma concentração relativamente baixa de LAS (5 mM (1/10 de IC₅₀)) de surfactante, além de conferir alterações morfológicas também leva à citotoxicidade em células de glioma C6 de ratos.

Como mencionado anteriormente, durante a fabricação de agrotóxicos ou mesmo do próprio tensoativo, inúmeras pessoas entram em contato com o LAS, seja por inalação ou mesmo contato com a pele, exposição que pode pôr em risco a saúde do trabalhador ou da população que está sujeita à presença deste composto no meio. Assim como o trabalhador, o consumidor final de produtos contaminados também está sujeito à intoxicação por surfactantes.

Os surfactantes provenientes de atividades urbanas e industriais são descarregados diariamente para o meio ambiente. Este fato está relacionado com o descarte de água não tratada contendo resíduos de produtos de limpeza em rios, lagos e oceanos. Foram realizadas pesquisas no distrito El-Mex, uma zona industrial a oeste da cidade de Alexandria, no Egito, com o objetivo de investigar as condições

hidrográficas da água da baía de El-Mex em relação à variação da concentração de LAS em função das variações regionais e sazonais. Amostras de águas superficiais e de fundo foram coletadas de oito locais diferentes da baía, perto da principal descarga de esgoto de Alexandria, local que recebe enormes quantidades de resíduos industriais não tratados. Foram encontrados concentrações de LAS entre 0.24 mg LAS/L água e 0.06 mg LAS/L água, sendo que as maiores concentrações foram encontradas próximo ao local de descarte de água no mar, na superfície da água e no verão, devido ao fato de que a temperatura exerce um efeito decisivo nos níveis de degradação de tensoativos (OKBAH, 2012).

Quantidades significantes de tensoativos podem penetrar no solo através de adubo aplicado como fertilizante. Atualmente, mais de 8 milhões de toneladas de lodo de esgoto são gerados como resultado de processos de tratamento de águas residuais. Vários estudos foram relatados na literatura sobre a presença e distribuição de compostos orgânicos em fertilizantes. Nestes estudos, o LAS é evidenciado como um dos compostos mais problemáticos na aplicação de lodo de esgoto ao solo de acordo com os níveis de concentração encontrados no lodo. Foi estudada a degradação de surfactantes em solo tratado com lodo de esgoto durante 100 dias sob condições frias (12,7 °C) e quentes (22,4 °C). Para todos os compostos estudados, foi observada a influência da temperatura na degradação durante o experimento, sendo a degradação mais lenta observada na experiência realizada a 12,7 °C. O tempo de meia-vida medido de LAS e seus homólogos foi inferior a 14 dias a 12,7 °C e inferiores a 7 dias a 22,4 °C, e a concentração de LAS (soma de C_{10} , C_{11} , C_{12} e C_{13}) foi reduzida para 5% da concentração inicial após 49 dias a 12,7 °C e 21 dias a 22,4 °C a partir da aplicação do lodo no solo (GONZÁLEZ et al., 2012).

APARICIO et. al. (2017) investigou a presença de diferentes tipos de resíduos em vegetais folhosos e radiculares via extração assistida por ultra-som, limpeza por extração em fase sólida (d-SPE) e análise por Cromatografia líquida associada à espectrometria de massa (LC-MS). Dentre os resíduos investigados estão 3 tensoativos não iônicos (nonilfenol e nonilfenoletoxilatos) e 8 tensoativos aniônicos (4 alquilsulfatos e 4 alquilbenzeno sulfonatos lineares), destacando o LAS entre eles. O método foi aplicado na determinação dos compostos alvo em três tipos de vegetais folhosos (alface, espinafre e acelga) e tubérculos (cenoura, nabo e batata). Quatro amostras de cada tipo de vegetal foram compradas em mercados locais e analisadas. Uma vez no solo, a absorção da planta, o acúmulo em raízes ou a translocação dentro

da planta podem ocorrer dependendo das propriedades físico-químicas dos poluentes e também das características do solo. O acúmulo de poluentes nas raízes e folhas afetam as lavouras e podem constituir um risco potencial à saúde humana quando presentes em plantas comestíveis, especialmente aqueles compostos desreguladores endócrinos que podem causar danos reprodutivos, câncer e distúrbios metabólicos. APARICIO et. al. (2017) em seus resultados finais detectaram que o LAS estava presente em todas as amostras analisadas. As maiores concentrações nos vegetais folhosos corresponderam ao LAS, com valores médios na faixa de 8,4 ng/g a 45,6 ng/g. A Organização Mundial da Saúde recomenda a ingestão diária de cinco porções de frutas e/ou vegetais correspondentes a 400 a 500 g/dia. Assumindo uma ingestão de 300 g/dia de legumes, o pior cenário para ingestão diária de LAS seria 14 µg/dia, para ingestão de vegetais folhosos e 4,7 µg/dia, para ingestão de tubérculos (APARICIO et. al., 2017).

Desta forma, fica evidente o quanto estamos expostos à toxicidade deste tensoativo diariamente. Entretanto, atualmente não existem estudos na literatura abrangendo a citotoxicidade do surfactante LAS aos humanos pelo método proposto nesse trabalho. Assim, é tema de interesse da saúde pública investigar o nível de toxicidade que este composto pode provocar ao organismo humano quando exposto à ele por ingestão, inalação ou absorção pela pele.

3.3. Toxicologia: estabilidade das membranas eritrocitárias

O nível de toxicidade de um composto químico pode ser determinado de diversas formas. Existem diferentes tipos de métodos para se avaliar a toxicidade de compostos químicos, entre eles, o estudo da fragilidade osmótica celular por meio da avaliação da estabilidade da membrana de eritrócitos em presença de um tóxico na corrente sanguínea.

Numerosos processos celulares, como transdução de sinal, transporte de soluto e interações celulares são mediados por membranas. O funcionamento ideal das membranas celulares está estreitamente associado à sua estabilidade e funcionalidade, propriedades que dependem do seu grau de fluidez. A fluidez da membrana é uma importante propriedade físico-química. Nos eritrócitos, em particular, esta propriedade é responsável pela modulação de funções como permeabilidade e transporte de íons e oxigênio, bem como as atividades enzimáticas associadas às membranas. A fluidez excessiva ou insuficiente são características

indesejáveis que afetam a fisiologia celular e podem contribuir para perda de estabilidade e aceleração da destruição da membrana, levando à morte celular. A observação de que a fluidez da membrana deve permanecer dentro de um intervalo crítico, fora do qual a estabilidade e funcionalidade da célula tende a diminuir, mostra que estabilidade, fluidez e função estão relacionadas e que a medida da estabilidade eritrocitária permite inferências sobre a fluidez ou funcionalidade dessas células (BERNARDINO NETO et al., 2013; PARAISO et al., 2014).

Existem muitos agentes que podem afetar a estabilidade e funcionalidade de membranas, como calor, espécies reativas de oxigênio (EROs), solutos que estimulam a auto-organização da membrana (como água e osmólitos) e solutos que podem promover a sua desorganização, como etanol e o dodecil sulfato de sódio (PARAISO et al., 2014).

A investigação da toxicidade de um tensoativo, como aquele a que nos propomos estudar, deve ser processada por análises estatísticas bivariadas e multivariadas das correlações entre estabilidade da membrana de eritrócitos, variáveis do eritrograma, lipidograma e variáveis individuais, uma vez que é importante para sistemas biológicos que o efeito de variáveis externas moduladoras seja avaliado.

3.4. Fragilidade osmótica dos eritrócitos (FOE)

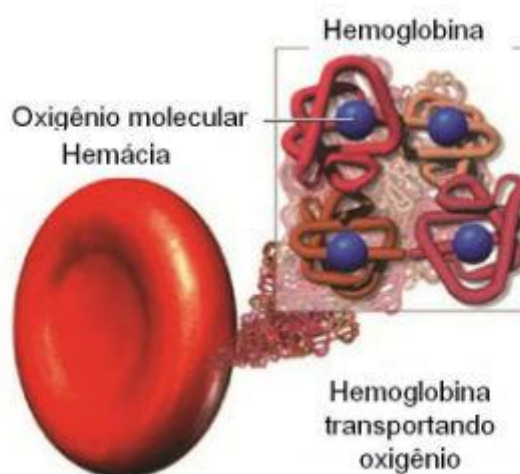
3.4.1. Eritrócitos (Células vermelhas)

Eritrócitos ou hemácias são os elementos celulares mais presentes no sangue, representam 95% do conteúdo total. Eles estão dispostos em forma de discos anucleados contendo Hemoglobina (Hb) carregadoras de Oxigênio (O_2), como ilustrado na figura 8. Os eritrócitos transportam o oxigênio do pulmão para os tecidos periféricos do organismo e realizam o transporte de dióxido de carbono (CO_2) para fora do organismo.

A membrana da hemácia é o modelo primário para estudo de membrana plasmática celular animal, pelo fato de ser desprovida de núcleo e organelas (MURADOR; DEFFUNE, 2007). Entre os diferentes constituintes da membrana apresentam-se receptores envolvidos em funções complexas que permitem a comunicação entre as células, reconhecimento imunológico e fenômenos de adesão celular. A membrana eritrocitária, como os milhares de outras células do organismo humano, é essencialmente constituída de lipídeos e proteínas. A hemácia não é uma simples "bolsa" contendo hemoglobina. Esta membrana consiste em uma bicamada

fosfolipídica, que representa aproximadamente 50% de sua massa total e forma a barreira entre dois compartimentos líquidos, intra e extracelular. As trocas entre estes compartimentos são feitas através de bombas, canais de trocas de íons e transporte molecular como o da glicose. Além disso, a deformabilidade de sua membrana, a fluidez de seu citoplasma e a complexidade de sua superfície membranária, em relação ao seu volume interno, asseguram as funções de transporte de O_2 dos pulmões e remoção do CO_2 dos tecidos para os pulmões.

Figura 7 - Ilustração da hemácia e o transporte de oxigênio no interior dela



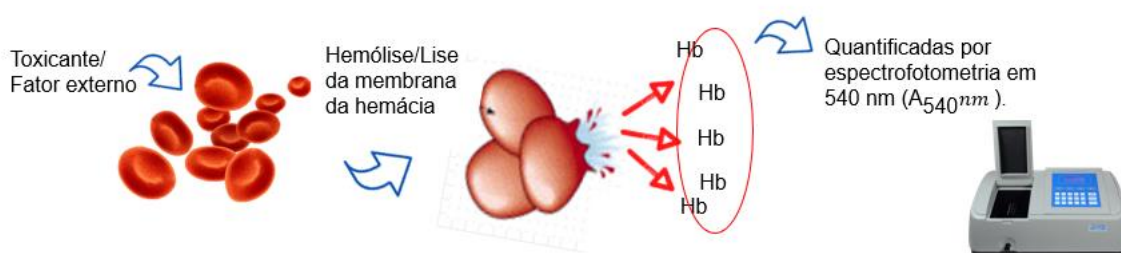
Fonte: MAGALHÃES, 2019.

Os eritrócitos são amplamente utilizados em estudos de determinação de estrutura, composição e comportamento da membrana devido à sua estabilidade, disponibilidade e acessibilidade, contribuindo com informações para estimar o comportamento de outros tipos de células. Além disso, qualquer alteração da membrana dos eritrócitos, seja em sua composição ou estabilidade, serve de ferramenta diagnóstica para uma série de doenças e para estudos de comportamentos celulares mediante perturbação de seu metabolismo normal, como por exemplo ganho de idade, exercícios físicos, dieta, etanol e praguicidas (RODRIGUES et al., 2009). Teste de fragilidade osmótica eritrocitária (FOE)

O teste de FOE demonstra a habilidade das membranas manterem sua integridade estrutural quando expostas a um estresse osmótico (RODRIGUES et al., 2009). Ao sofrer hemólise por ação de qualquer fator externo, neste caso, provocado

por uma substância química em evidência, um surfactante, as hemácias liberam hemoglobina no meio, as quais podem ser quantificadas por espectrofotometria em 540 nm (A_{540nm}), conforme ilustrado na figura 8. O valor de absorbância a A_{540} é proporcional ao percentual de lise dos eritrócitos (NETTO, 2009). O teste de FOE é um método considerado de baixo custo e de elevada eficiência para avaliar a estabilidade das membranas e células.

Figura 8 - Ilustração do teste de fragilidade osmótica em eritrócitos humanos



Fonte: próprio autor.

Ou seja, o teste de FOE determina a concentração do agente químico estudado, neste caso, o LAS, capaz de provocar a lise de 50% dos eritrócitos frescos e incubados por 30 minutos em meio de NaCl 0,9 g/dL.

Para se determinar como os eritrócitos e consequentemente suas membranas se comportam na presença de um agente caotrópico, no caso do presente estudo o surfactante investigado (LAS), a análise experimental varia a concentração de toxicante (LAS) em contato com as hemácias, provenientes de amostras de sangue total.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

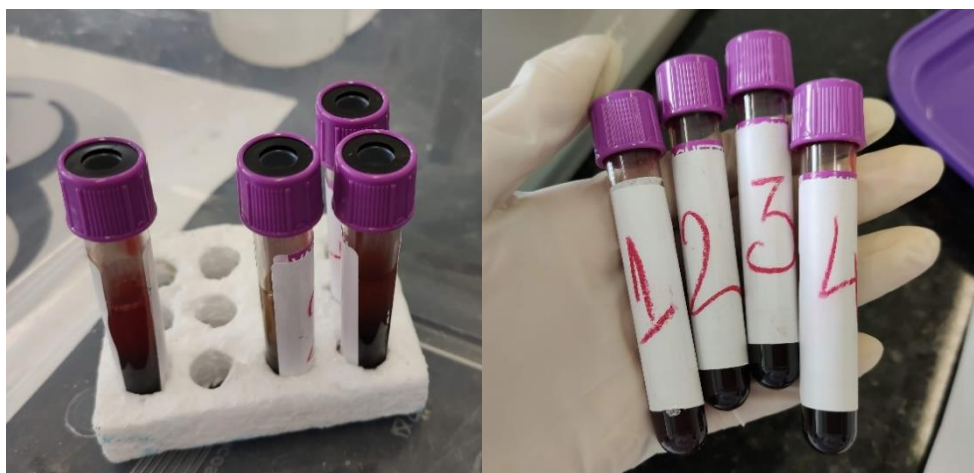
4.1. Considerações éticas

Esse trabalho foi previamente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos (CEP) por meio da Plataforma Brasil sob CAAE (certificado de apresentação para apreciação ética) número 21016719.2.0000.5467 e tão somente mediante autorização e obtenção do número de concessão relativo a esse projeto (parecer de aprovação 3.796.937), que os trabalhos experimentais foram iniciados.

4.2. Amostras de material biológico

Amostras de sangue (3 mL) foram coletadas no Laboratório Municipal de Análises Clínicas da Prefeitura de Lorena através de punção venosa após um período de jejum de 8-12 horas. Os indivíduos participantes foram codificados e permaneceram incógnitos, não podendo ser identificados até mesmo se os resultados da pesquisa pudessem beneficiá-los. O sangue foi coletado em tubos evacuados contendo 50 µL de K₃EDTA a 25 mmol/L e seguiu a rotina de análise do laboratório onde foram processados o eritrograma em equipamento Pentra DF Nexus (Horiba Medical Ltda) e o lipidograma por equipamento BT 3000-plus (Biotechnica Instruments) de modo totalmente automatizado. O sangue total não usado e considerado material de descarte foi, em no máximo 24 horas da sua obtenção, cedido à Universidade de São Paulo para o estudo a que se propôs esse trabalho. O sangue total foi transportado em recipiente acondicionado em ambiente refrigerado e mantido entre 0° C a 4° C até o momento da análise. Os resíduos foram armazenados em *descarpack* para serem incinerados juntamente com os resíduos biológicos no Laboratório Municipal de Análises Clínicas.

Figura 9 - Amostras de material biológico



Fonte: próprio autor.

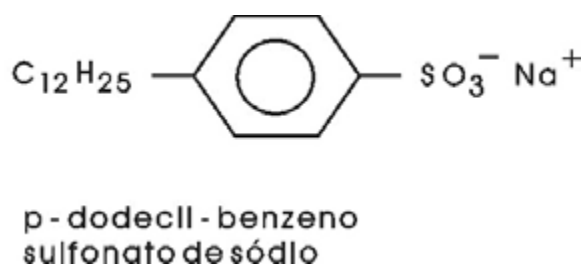
4.3. Reagentes

O reagente NaCl foi de grau ACS (Sociedade Química Americana) de pureza e obtido por meio do Laboratório de Engenharia Ambiental ligado ao Departamento de Ciências Básicas e Ambientais da EEL-USP.

O surfactante utilizado nos experimentos foi o dodecilbenzeno sulfonato de sódio (DBSNa), com fórmula molecular $C_{18}H_{29}NaO_3S$ (figura 10) e peso molecular 348,48 g/mol. Como mencionado anteriormente, o LAS consiste em uma mistura de tensoativos homólogos e isômeros de posição de cadeias alquiladas lineares (PENTEADO, 2006) e, dentre eles, se encontra o componente mais importante da mistura, o DBSNa. Dessa forma, utilizando-se o DBSNa como representante das propriedades do LAS, a interpretação dos resultados obtidos pode ser feita de forma mais precisa e os efeitos do LAS inferidos com maior segurança.

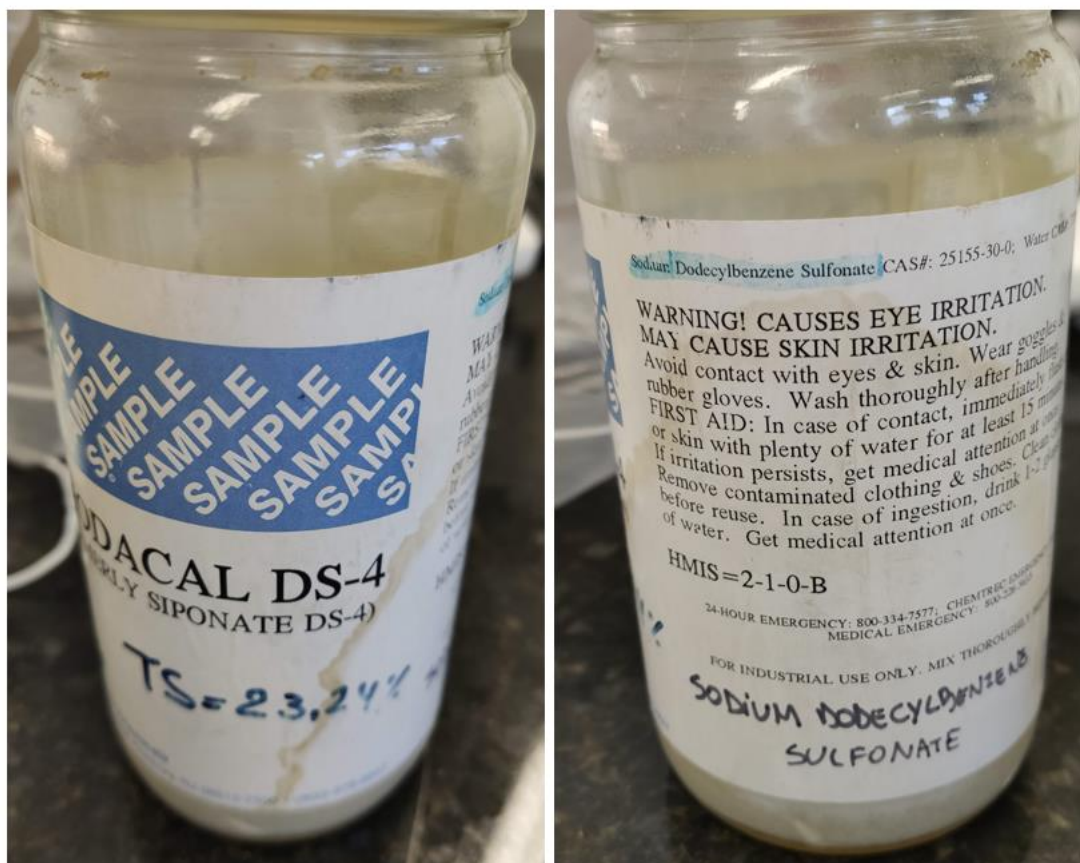
O DBSNa utilizado foi obtido através do Laboratório de Polímeros da EEL-USP, fabricado pelo grupo Rhodia, especificado em Tensão Superficial (TS) de 23,24%, como indicado na figura 11.

Figura 10 - Fórmula estrutural do DBSNa



Fonte: UFPB, 2005.

Figura 11 - DBSNa utilizado nos experimentos



Fonte: próprio autor.

4.4. Teste de FOE na presença do surfactante

Para a determinação dos efeitos citotóxicos do ácido linear alquilbenzeno sulfônico sobre a estabilidade dos eritrócitos humanos, foi usada, para cada amostra de sangue, uma bateria de 16 tubos eppendorfs em duplicata com concentrações crescentes de LAS em meio de $0,9 \text{ g} \cdot \text{dL}^{-1} \text{NaCl}$, mesma concentração salina presente no ambiente sanguíneo humano. A bateria de tubos eppendorfs foi então pré-incubada

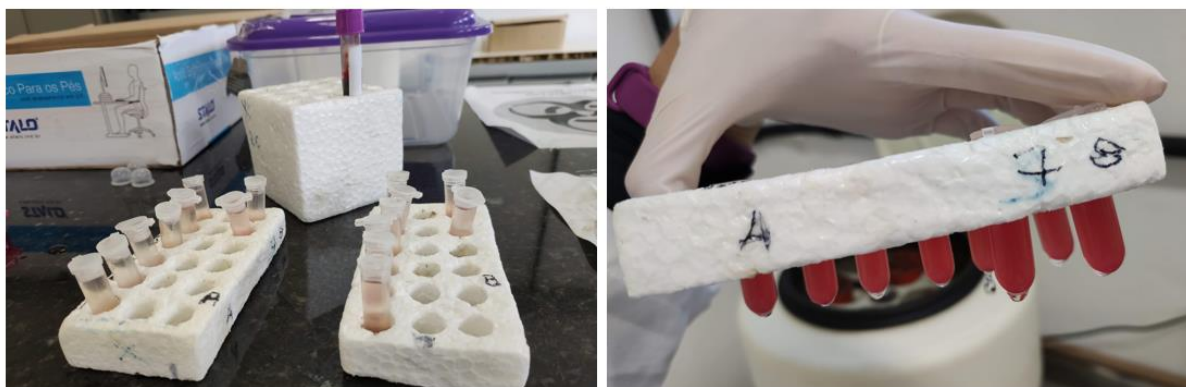
a temperatura de 36,5° C por 15 minutos sendo que, após esse tempo, foi adicionado em cada tudo, por meio de pipeta automática, 20 µL de sangue total. Cada tubo eppendorf foi homogeneizado e incubado a temperatura de 36,5° C por 30 minutos. Após a incubação os tubos foram centrifugados por 2 minutos a 1600 x g à temperatura ambiente. Em seguida, os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos com pipeta automática e submetidos a leitura de absorvância a 540 nm (A_{540}) em espectrofotômetro UV-VIS.

Figura 12 - Banho termostatzado a 37,5 °C



Fonte: próprio autor.

Figura 13 - Tubos eppendorfs com adição de sangue: (a) antes do banho termostatzado; (b) após o banho termostatzado

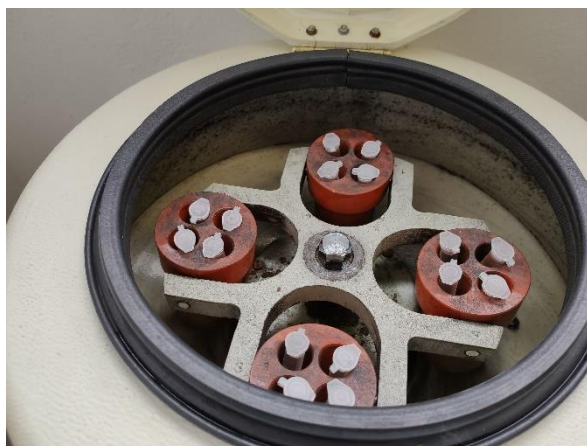


(a)

(b)

Fonte: próprio autor.

Figura 14 - Centrífuga com capacidade máxima de 16 tubos



Fonte: próprio autor.

4.5. Determinação das curvas de transição de hemólise

A dependência entre as leituras de absorbância a 540 nm (A_{540}) e concentração do toxicante é ajustada a uma linha de regressão sigmoidal, de acordo com a equação de Boltzmann (equação 1):

Equação 1 – Equação de Boltzmann

$$A_{540} = \frac{A_{\text{mín}} - A_{\text{máx}}}{1 + e^{-(X-H_{50})/dX}} + A_{\text{máx}}$$

Em que $A_{\text{mín}}$ e $A_{\text{máx}}$ são os valores A_{540} que representam, respectivamente, os patamares mínimos e máximos da hemólise, X é a concentração de toxicante, H_{50} representa a concentração do agente químico tóxico capaz de provocar 50% de hemólise, e dX é a amplitude da transição sigmoidal entre $A_{\text{mín}}$ e $A_{\text{máx}}$.

As variáveis dX e H_{50} estão relacionados à estabilidade da membrana eritrocitária. Quanto menor o valor de dX , menor é a estabilidade ou maior a fragilidade osmótica dos eritrócitos, uma vez que uma menor variação da concentração do toxicante é suficiente para promover a transição de estado estável para hemólise total. Por outro lado, quanto maior o valor de H_{50} , maior a estabilidade e menor a fragilidade

osmótica dos eritrócitos, porque o ponto médio da transição da hemólise (H_{50}) ocorreu em maior concentração do agente tóxico.

O valor *NOAEL* de concentração, correspondente ao $A_{\min}$, é a concentração de tóxico necessária para iniciar a hemólise e pode ser calculada pela equação 2 (FREITAS et al., 2019).

Equação 2 – Determinação de *NOAEL* ou $X_{\min}$

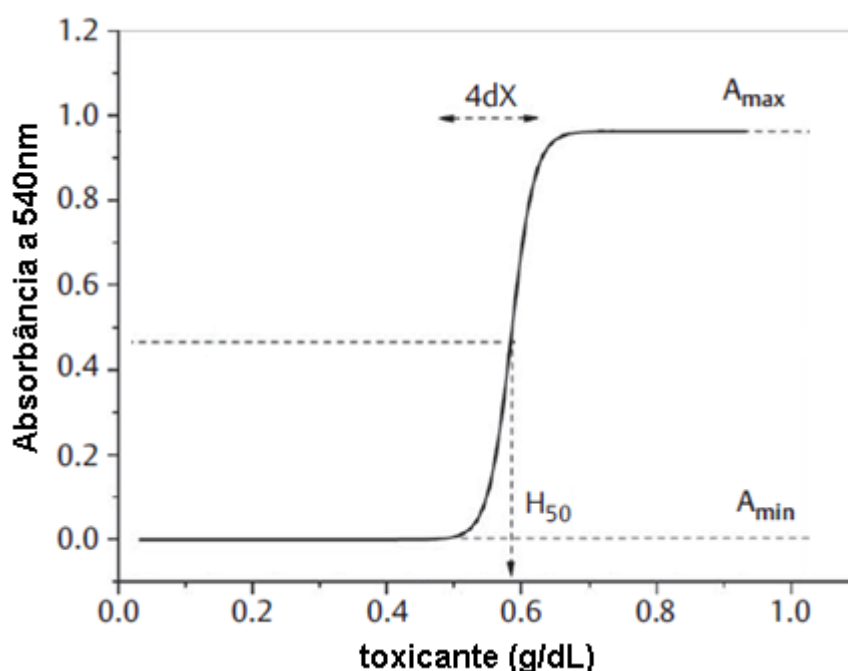
$$X_{\min} = H_{50} - 2dX$$

A concentração de tóxico no ponto em que a lise atinge o seu platô máximo define a variável $A_{\max}$, que representa a concentração de tóxico necessária para promover a lise total dos eritrócitos, podendo ser calculada pela equação 3 (FREITAS et al., 2019).

Equação 3 – Determinação de $X_{\max}$

$$X_{\max} = H_{50} + 2dX$$

Figura 15 - curva típica de dependência entre a absorbância a 540 nm e a concentração de agente químico tóxico em um teste de fragilidade osmótica. $A_{\min}$ representa a absorbância mínima média e está associada à hemólise na ausência do tóxico ou a concentrações abaixo daquela que gera efeitos observáveis. $A_{\max}$ representa a absorbância média máxima e está associada à hemólise total. H_{50} representa a concentração de tóxico necessária para promover 50% de hemólise e dX representa a alteração na concentração de agente tóxico associada à transição dos estados de estabilidade e hemólise total

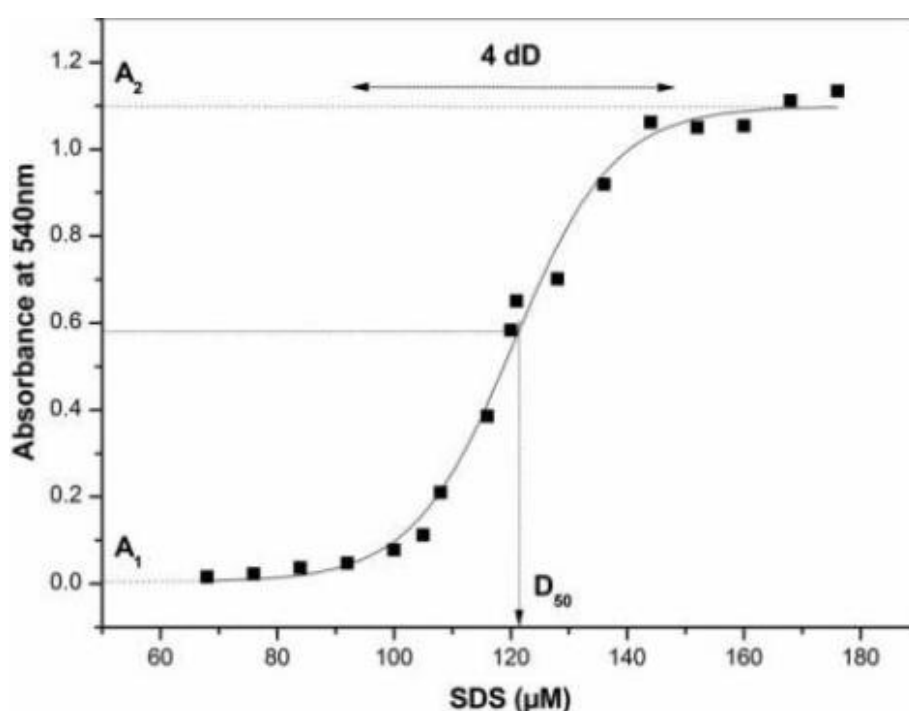


Fonte: próprio autor.

4.6. Concentração de DBSNa investigada

A concentração de DBSNa escolhida para investigação foi baseada em um artigo dos autores FREITAS et al. (2013) que determinou a curva da fragilidade eritrocitária com a variação da concentração entre 68 e 176 μM de dodecil sulfato de sódio (SDS), composto similar e da mesma família de tensoativos do DBSNa e LAS, com a concentração solução salina em 0,9 g/dL, conforme é mostrado na figura 15.

Figura 16 - Curva de fragilidade eritrocitária induzida pela variação da concentração de SDS e concentração de NaCl constante em 0,9 g/dL



Fonte: FREITAS et. al., 2013.

Não obstante a concentração de toxicante delineada para o estudo tenha sido de 68 a 176 μM , foi necessário alterá-la para a faixa de concentração de 0 a 800 μM de DBSNa para se conseguir determinar o DL_{100} e obter os dados que permitissem cumprir os objetivos do trabalho.

4.7. Determinação de variáveis bioquímicas e hematológicas

O eritrograma, a série branca e o lipidograma foram processados pelo Laboratório Municipal de Análises Clínicas da Prefeitura de Lorena e os valores de referência (indivíduos entre 19 e 55 anos) para o eritrograma, série branca e lipidograma foram definidos pelo Laboratório Municipal de Análises Clínicas da Prefeitura de Lorena como: Hemácias (Eritrócitos), 3,9 a 5,9 milhões/ mm^3 ;

Hemoglobina (Hb) 12,0-18,0 g/dL; Hematócrito (Ht) 35,6-48,6%; média do volume corpuscular (VCM), 76-96 fL; hemoglobina corpuscular média (HCM), 27-31 pg; concentração média corpuscular de hemoglobina (CHCM), 32,9-36%; leucócitos, 3100-11000/mm³; monócitos, 2 a 10%; linfócitos, 20 a 50%; eosinófilos, 1 a 7%; basófilos, 0 a 3%; neutrófilos segmentados, 40 a 65%, contagem de plaquetas 150 a 400 mil/mm³; colesterol total (t-C), <150 (ótimo) e ≥ 170 mg/dL (alto); lipoproteína de alta densidade (HDL_C), <35 (baixa) e > 45 mg/dL (ideal), lipoproteína de baixa densidade (LDL_C), <100 (bom) e > 130 mg/dL (Alto); lipoproteína de muito baixa densidade (VLDL_C), até 42 mg/dL (bom) e triglicerídeos (TG), <100 (ótimo) e > 130 mg/dL (alto).

4.8. Análise estatística dos dados experimentais

Os efeitos citotóxicos do DBSNa bem como o *NOAEL* foram obtidos graficamente por meio do Software OriginPro 9.7 (MicroCal TM, Northampton, MA, EUA).

Para as buscas de correlações e análises estatísticas, os parâmetros de toxicidade celular obtidos por meio dos testes FOE processados no Laboratório de Engenharia Ambiental da EEL-USP bem como as variáveis do eritrograma, lipidograma e série branca foram avaliadas inicialmente por meio de teste de normalidade de Shapiro-Wilk e estatística descritiva e exploratória, seguido pela busca de correlações por meio do teste Rhô de Spearman.

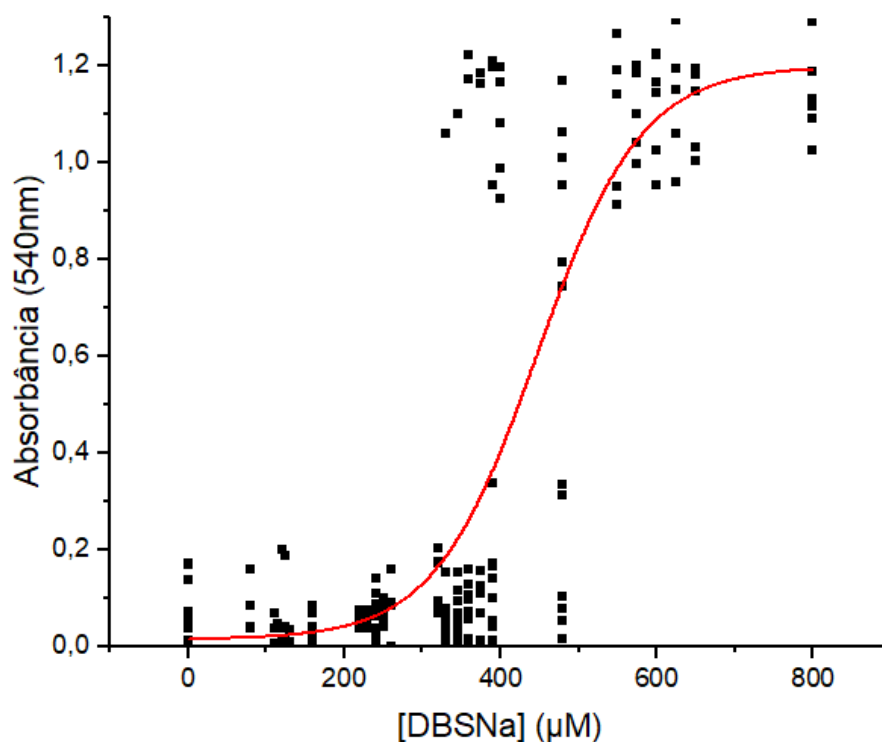
5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da citotoxicidade do LAS

Primeiramente, foram determinadas as linhas de base de dependência da hemólise em função da concentração de DBSNa de cada indivíduo a partir das leituras de absorbância a 540 nm da concentração de hemoglobina, ajustadas pela equação de Boltzmann.

A figura 16 apresenta a curva de hemólise de todas as amostras de material biológico em concentração constante de NaCl em 0,9 g/dL e em diferentes concentrações de DBSNa, que variaram entre 0 a 800 μ M. Para uma visualização detalhada por amostra (indivíduo), as figuras 17, 18, 19 e 20 apresentam, respectivamente, a curva de hemólise dos indivíduos 1, 2, 3 e 4. O tensoativo utilizado nos mostra que, quanto maior a sua concentração na corrente sanguínea, maior será a lise da população total dos eritrócitos. A figura 22 ilustra os tubos eppendorfs com concentrações crescentes de DBSNa (da esquerda para a direita) após serem centrifugados.

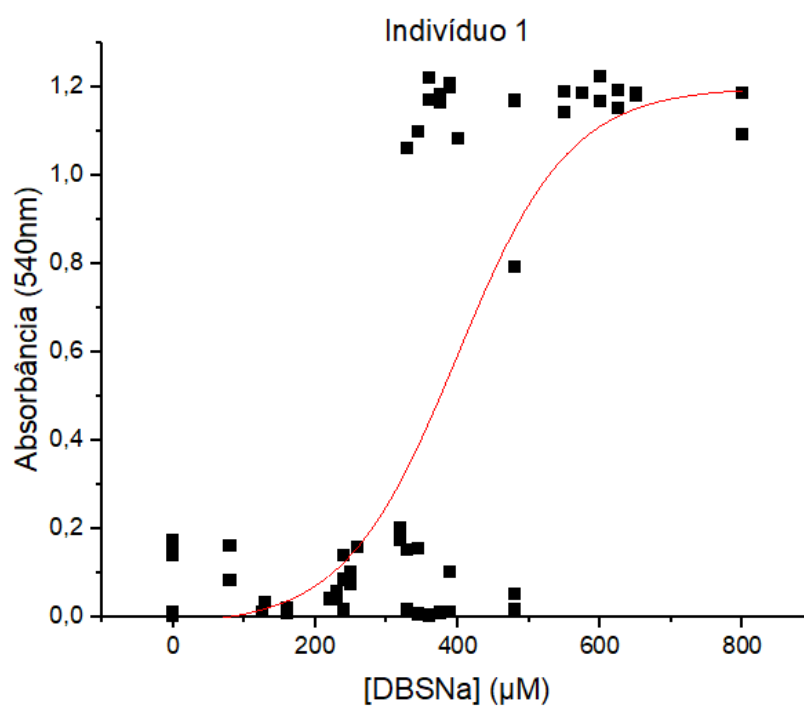
Figura 17 - Curva de hemólise das quatro amostras analisadas com concentração constante $[\text{NaCl}] = 0,9 \text{ g/dL}$



Fonte: próprio autor.

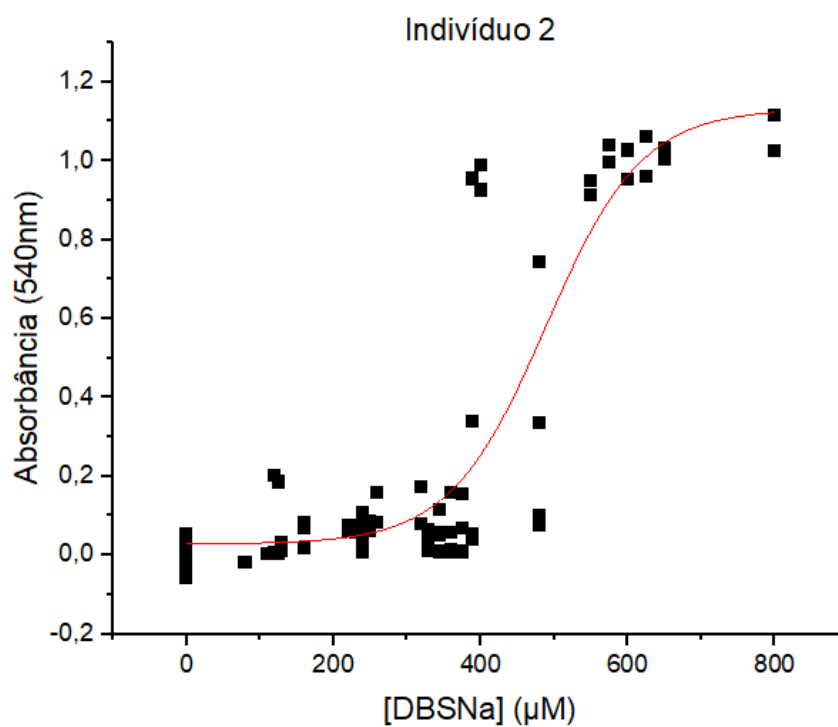
Através do ajuste dos dados experimentais de todas as amostras à linha de regressão sigmoidal de acordo com a equação de Boltzmann (Figura 16) obteve-se os valores de $dX = 66,3324$, $x_0/H_{50} = 447,6324 \text{ μM}$, $A_{\text{mín}} = 0,0129 \text{ Abs (540 nm)}$ e $A_{\text{máx}} = 1,1982 \text{ Abs (540 nm)}$. Aplicando-se as equações 2 e 3 descritas por Freitas et al. (2019), obteve-se $X_{\text{mín}} = 314,9676 \text{ μM}$ e $X_{\text{máx}} = 580,2971 \text{ μM}$. Portanto, o valor NOAEL encontrado foi de $314,9676 \text{ μM}$. A Tabela 1 identifica os Parâmetros de estabilidade dX , H_{50} e valores mínimo ($A_{\text{mín}}$) e máximo ($A_{\text{máx}}$) de absorbância encontrados experimentalmente para cada indivíduo.

Figura 18 - Curva de hemólise do indivíduo 1 (55 anos) analisada com concentração constante $[\text{NaCl}] = 0,9 \text{ g/dL}$



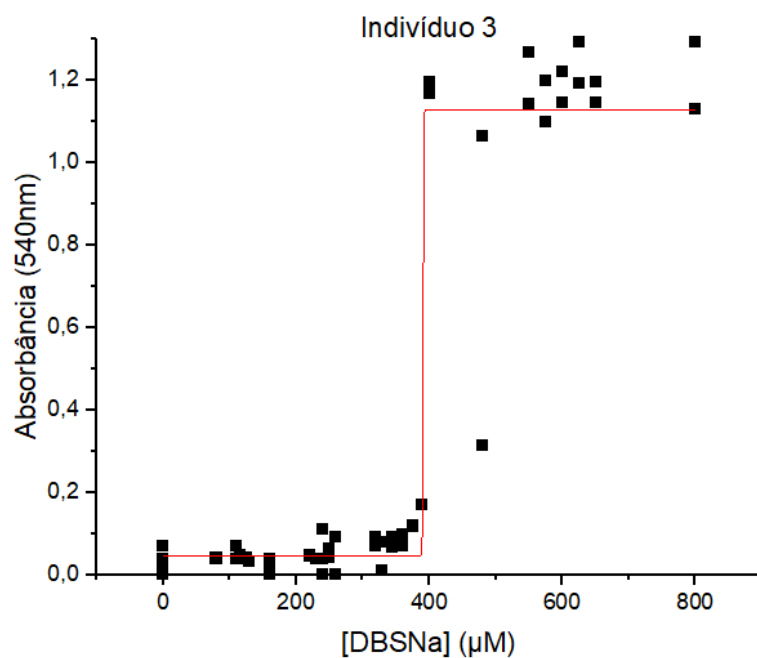
Fonte: próprio autor.

Figura 19 - Curva de hemólise do indivíduo 2 (19 anos) analisada com concentração constante $[\text{NaCl}] = 0,9 \text{ g/dL}$



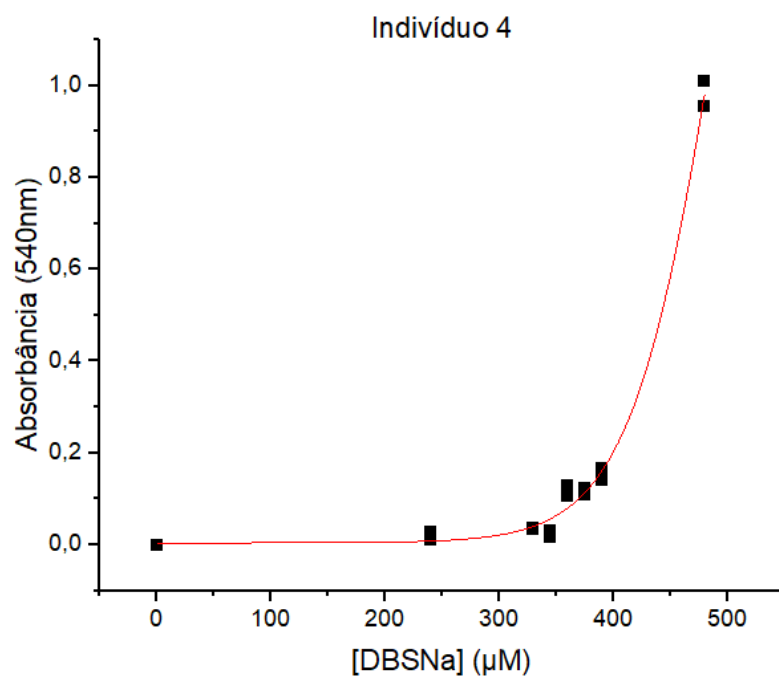
Fonte: próprio autor.

Figura 20 - Curva de hemólise do indivíduo 3 (45 anos) analisada com concentração constante $[\text{NaCl}] = 0,9 \text{ g/dL}$



Fonte: próprio autor.

Figura 21 - Curva de hemólise do indivíduo 4 (38 anos) analisada com concentração constante $[\text{NaCl}] = 0,9 \text{ g/dL}$



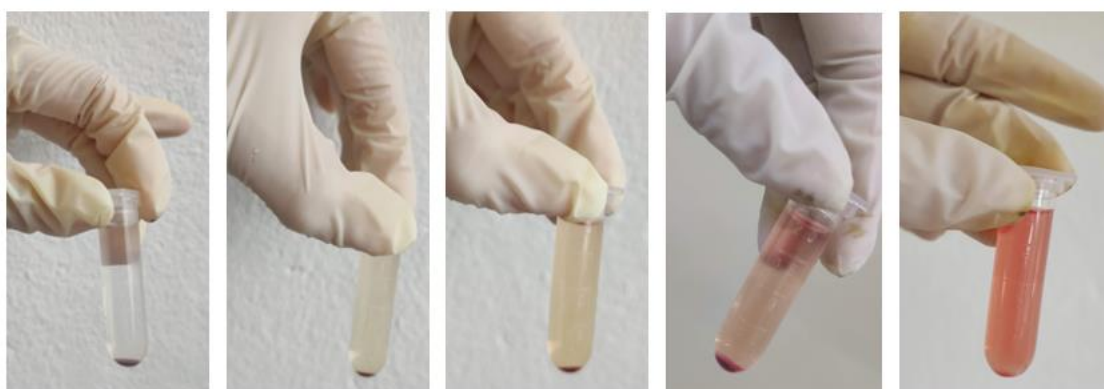
Fonte: próprio autor.

Tabela 1 - Parâmetros de estabilidade dX, H₅₀ e valores mínimo (A_{mín}) e máximo (A_{máx}) de absorbância encontrados experimentalmente para cada indivíduo

Indivíduo	1	2	3	4
dX	79,0691	65,2913	0,4435	39,5074
H50	398,7614	488,6693	390,9073	495,6527
A_{mín}	-0,0215	0,0282	0,0455	0,0040
A_{máx}	1,1998	1,1317	1,1289	2,4353

Fonte: próprio autor.

Figura 22 - Imagens dos tubos eppendorfs com concentrações crescentes de DBSNa (da esquerda para a direita) após serem centrifugados



Fonte: próprio autor.

5.2. Análise descritiva exploratória

A população de sujeitos envolvidos no estudo possui características relativas ao eritrograma, série branca e lipidograma, parâmetros de estabilidade e idade, apresentados na Tabela 1. A variação das idades entre as amostras foi de 19 a 55 anos com mediana em 41,5 anos. Os valores: mediana e valor máximo de colesterol, o valor máximo de LDL, o valor máximo de triglicérides, o valor máximo de HCM e o valor máximo de Neutrófilos Segmentados estão maiores que o desejável, descritos pelos valores de referência adotados. O valor mínimo de Eosinófilos está menor do que o desejável referente ao valor de referência adotado. Contudo, essas alterações não impactam os resultados a que se propõe esse estudo.

Tabela 2 - Análise descritiva exploratória dos parâmetros de estabilidade dX, H₅₀, A_{min}, A_{máx}, das variáveis do eritrograma, série branca e lipidograma da população (n=4)

	Mínimo	Máximo	Amplitude Total	Mediana	Primeiro Quartil (25%)	Terceiro Quartil (75%)	Desvio Interquartilico
dX	0,4	79,1	78,6	65,3	0,4	79,1	78,6
H50	390,9	495,7	104,7	398,8	390,9	488,7	97,8
dX/H50	0,0	0,2	0,2	0,1	0,0	0,2	0,2
A _{min}	0,0	0,0	0,1	0,0	0,0	0,0	0,1
A _{máx}	1,1	2,4	1,3	1,1	1,1	1,2	0,1
Absorbância (540 nm)	-0,1	1,3	1,4	0,1	0,0	0,3	0,3
Idade (anos)	19,0	55,0	36,0	45,0	19,0	55,0	36,0
Hemácias (milhões/mm ³)	4,4	5,1	0,8	4,9	4,4	5,1	0,7
Hemoglobina (mg/dL)	13,7	15,6	1,9	15,0	13,7	15,6	1,9
Hematócrito (%)	40,8	46,3	5,5	44,7	41,0	46,3	5,3
VCM (fL)	90,1	93,4	3,3	91,2	90,1	93,2	3,1
HCM (pg)	30,4	31,4	1,0	30,6	30,4	31,1	0,7
CHCM (%)	33,4	33,7	0,3	33,6	33,4	33,7	0,3
Leucócitos (células/mm ³)	4800,0	7700,0	2900,0	5200,0	4800,0	7700,0	2900,0
Neutrófilos Segmentados (%)	56,0	70,9	14,9	59,0	56,0	70,9	14,9
Eosinófilos (%)	0,7	2,0	1,3	1,3	0,7	1,7	1,0
Basófilos (%)	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1
Linfócitos (%)	21,6	35,4	13,8	33,2	21,6	35,4	13,8
Monócitos (%)	4,9	6,9	2,0	6,8	6,1	6,9	0,8
Plaquetas (10 ⁹ /mm ³)	227,0	393,0	166,0	297,0	227,0	393,0	166,0
t-Colesterol (mg/dL)	100,0	256,0	156,0	245,0	100,0	256,0	156,0
LDL (mg/dL)	46,0	150,0	104,0	135,0	54,0	150,0	96,0
HDL (mg/dL)	34,0	110,0	76,0	75,0	34,0	110,0	76,0
VLDL (mg/dL)	12,0	33,0	21,0	13,0	12,0	21,0	9,0
Triglicerídeos (mg/dL)	59,0	167,0	108,0	64,0	59,0	103,0	44,0

Fonte: Próprio autor.

5.3. Teste de normalidade exploratória Shapiro-Wilk

A normalidade dos dados é verificação necessária para a escolha dos testes estatísticos adequados para os dados. Para isso, o teste de normalidade de Shapiro Wilk foi aplicado a todos os conjuntos de dados (Tabela 2). O teste de normalidade Shapiro-Wilk avalia se a variável aleatória se adere a distribuição normal contra a hipótese alternativa de que a variável aleatória não adere à distribuição Normal. O modo de se avaliar é observar o valor-p dos testes e comparar com o nível de significância adotado. Se o valor-p do teste for menor que o nível de significância escolhido, rejeita-se a hipótese de normalidade. Os resultados não apresentaram normalidade para o conjunto de dados.

Tabela 3 - Teste de normalidade Shapiro Wilk dos parâmetros de estabilidade dX, H₅₀, Amín, Amáx, das variáveis do eritrograma, série branca e lipidograma da população (n=4)

	Média	Desvio padrão	W	p
dX	50,6333	32,0432	0,7279	0,00
H50	433,3338	46,6417	0,6775	0,00
dX/H50	0,1156	0,0774	0,7980	1,11E-16
Amín	0,0148	0,0275	0,7798	0,00
Amáx	1,2436	0,3274	0,3445	0,00
Absorbância (540 nm)	0,3113	0,4581	0,6607	0,00
Idade (anos)	39,1385	15,1082	0,7704	0,00
Hemácias (milhões/mm ³)	4,7756	0,3267	0,7604	0,00
Hemoglobina (mg/dL)	14,6740	0,8340	0,7485	0,00
Hematócrito (%)	43,7229	2,3513	0,7538	0,00
VCM (fL)	91,6571	1,3659	0,7730	0,00
HCM (pg)	30,7563	0,3419	0,8031	2,22E-16
CHCM (%)	33,5662	0,1247	0,7656	0,00
Leucócitos (células/mm ³)	5753,2468	1197,0890	0,6673	0,00
Neutrófilos Segmentados (%)	62,6048	6,2955	0,7567	0,00
Eosinófilos (%)	1,2584	0,4410	0,8393	9,66E-15
Basófilos (%)	0,1398	0,0491	0,6212	0,00
Linfócitos (%)	29,5290	5,9227	0,7376	0,00
Monócitos (%)	6,4680	0,5548	0,7112	0,00
Plaquetas (10 ³ /mm ³)	299,3636	64,1810	0,7953	1,11E-16
t-Colesterol (mg/dL)	192,0000	71,3579	0,6846	0,00
LDL (mg/dL)	106,7706	44,9613	0,7111	0,00
HDL (mg/dL)	69,4113	29,7780	0,8187	1,05E-15
VLDL (mg/dL)	16,7489	5,9269	0,7189	0,00
Triglicerídeos (mg/dL)	82,6234	29,9835	0,7105	0,00

Fonte: Próprio autor.

5.4. Matriz de correlações de Spearman

A busca de correlações entre as variáveis foi realizada através do teste de correlação de Spearman (ρ). O teste de correlações de Spearman é um teste livre de distribuição e tem o objetivo de avaliar o nível de associação linear entre duas variáveis, sendo ainda capaz de considerar ligeiras fugas da linearidade. Através do p-valor gerado pela busca de correlações de Spearman e considerando nível de significância de 5% (0,05), avalia-se quando $p\text{-valor} > 0,05$, não há certeza em afirmar que houve correlação e se $p\text{-valor} < 0,05$ podemos afirmar que existe correlação, pois temos 95% de confiança ao afirmá-la. Por meio do coeficiente Rhô (ρ) de Spearman é possível avaliar a existência de associação entre as variáveis bem como a força e o sentido dessa associação. Consideramos para as associações que possuem valor de Rhô menores que 0,3 uma correlação fraca, entre 0,3 e 0,7 uma correlação moderada e maiores que 0,7 uma correlação forte.

Os resultados apresentados na Tabela 3 mostraram que existe correlação ($p\text{-valor} < 0,05$) significativa das variáveis: absorbância, Idade, Hemácias, Hemoglobina, Hematócrito, VCM, HCM, CHCM, Leucócitos, Neutrófilos Segmentados, Eosinófilos, Basófilos, Linfócitos, Monócitos, Plaquetas, t-Colesterol, LDLc, HDLc, VLDLc e Triglicerídeos com o parâmetro de estabilidade dX, o mesmo ocorreu com H_{50} , com exceção das variáveis Eosinófilos e Basófilos, em que $p\text{-valor} > 0,05$. Na tabela 4 evidencia-se o grau de força das correlações e a relação (inversa ou direta) com os parâmetros de estabilidade dX e H_{50} .

Tabela 4 – Matriz de correlações de Spearman entre os parâmetros de estabilidade dX, H₅₀, A_{min} e A_{máx} com as variáveis do eritrograma, série branca, lipídograma e idade

		dX	H50	dX/H50	A _{min}	A _{máx}	Absorbância (540 nm)	Idade (anos)	Hemácias (milhões/mm ³)	Hemoglobina (mg/dL)	Hematócrito (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (%)
dX	<i>p</i>	1,00000	0,29799	1,00000	-0,93856	0,77814	-0,01440	0,45928	0,52072	0,49771	0,52072	-0,52072	-0,52072	0,48508
dX	<i>p</i> -valor	--	0,00000	--	0,00000	0,00000	0,82801	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
H50	<i>p</i>	0,29799	1,00000	0,29799	-0,35943	0,51985	-0,06464	-0,58985	-0,65129	-0,63033	-0,65129	0,65129	0,65129	-0,49285
H50	<i>p</i> -valor	0,00000	--	0,00000	0,00000	0,00000	0,32904	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
dX/H50	<i>p</i>	1,00000	0,29799	1,00000	-0,93856	0,77814	-0,01440	0,45928	0,52072	0,49771	0,52072	-0,52072	-0,52072	0,48508
dX/H50	<i>p</i> -valor	--	0,00000	--	0,00000	0,00000	0,82801	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
A _{min}	<i>p</i>	-0,93856	-0,35943	-0,93856	1,00000	-0,94001	0,01495	-0,52072	-0,45928	-0,49771	-0,45928	0,45928	0,45928	-0,58857
A _{min}	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	--	0,00000	0,82153	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
A _{máx}	<i>p</i>	0,77814	0,51985	0,77814	-0,94001	1,00000	-0,02395	0,37987	0,21800	0,30364	0,21800	-0,21800	-0,21800	0,48709
A _{máx}	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	--	0,71791	0,00000	0,00085	0,00000	0,00085	0,00085	0,00085	0,00000
Absorbância (540 nm)	<i>p</i>	-0,01440	-0,06464	-0,01440	0,01495	-0,02395	1,00000	0,04714	0,04769	0,04817	0,04769	-0,04769	-0,04769	0,04206
Absorbância (540 nm)	<i>p</i> -valor	0,82801	0,32904	0,82801	0,82153	0,71791	--	0,47682	0,47167	0,46722	0,47167	0,47167	0,47167	0,52564
Idade (anos)	<i>p</i>	0,45928	-0,58985	0,45928	-0,52072	0,37987	0,04714	1,00000	0,93856	0,98452	0,93856	-0,93856	-0,93856	0,98957
Idade (anos)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,47682	--	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Hemácias (milhões/mm ³)	<i>p</i>	0,52072	-0,65129	0,52072	-0,45928	0,21800	0,04769	0,93856	1,00000	0,98452	1,00000	-1,00000	-1,00000	0,88609
Hemácias (milhões/mm ³)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00085	0,47167	0,00000	--	0,00000	--	--	--	0,00000
Hemoglobina (mg/dL)	<i>p</i>	0,49771	-0,63033	0,49771	-0,49771	0,30364	0,04817	0,98452	0,98452	1,00000	0,98452	-0,98452	-0,98452	0,95258
Hemoglobina (mg/dL)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,46722	0,00000	0,00000	--	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Hematócrito (%)	<i>p</i>	0,52072	-0,65129	0,52072	-0,45928	0,21800	0,04769	0,93856	1,00000	0,98452	1,00000	-1,00000	-1,00000	0,88609
Hematócrito (%)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00085	0,47167	0,00000	--	0,00000	--	--	--	0,00000
VCM (fL)	<i>p</i>	-0,52072	0,65129	-0,52072	0,45928	-0,21800	-0,04769	-0,93856	-1,00000	-0,98452	-1,00000	1,00000	1,00000	-0,88609
VCM (fL)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00085	0,47167	0,00000	--	0,00000	--	--	--	0,00000
HCM (pg)	<i>p</i>	-0,52072	0,65129	-0,52072	0,45928	-0,21800	-0,04769	-0,93856	-1,00000	-0,98452	-1,00000	1,00000	1,00000	-0,88609
HCM (pg)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00085	0,47167	0,00000	--	0,00000	--	--	--	0,00000
CHCM (%)	<i>p</i>	0,48508	-0,49285	0,48508	-0,58857	0,48709	0,04206	0,98957	0,88609	0,95258	0,88609	-0,88609	-0,88609	1,00000
CHCM (%)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,52564	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	--
Leucócitos (células/mm ³)	<i>p</i>	-1,00000	-0,29799	-1,00000	0,93856	-0,77814	0,01440	-0,45928	-0,52072	-0,49771	-0,52072	0,52072	0,52072	-0,48508
Leucócitos (células/mm ³)	<i>p</i> -valor	--	0,00000	--	0,00000	0,00000	0,82801	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Neutrófilos Segmentados (%)	<i>p</i>	0,35943	0,93856	0,35943	-0,29799	0,35798	-0,06409	-0,65129	-0,58985	-0,63033	-0,58985	0,58985	0,58985	-0,59633
Neutrófilos Segmentados (%)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,33319	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Eosinófilos (%)	<i>p</i>	-0,95851	-0,09371	-0,95851	0,81514	-0,57386	0,00335	-0,50077	-0,64414	-0,58146	-0,64414	0,64414	0,64414	-0,48508
Eosinófilos (%)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,15570	0,00000	0,00000	0,00000	0,95967	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Basófilos (%)	<i>p</i>	0,71850	0,07544	0,71850	-0,88999	0,88999	0,00683	0,75191	0,58043	0,67664	0,58043	-0,58043	-0,58043	0,82960
Basófilos (%)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,25345	0,00000	0,00000	0,00000	0,91794	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Linfócitos (%)	<i>p</i>	-0,35943	-0,93856	-0,35943	0,29799	-0,35798	0,06409	0,65129	0,58985	0,63033	0,58985	-0,58985	-0,58985	0,59633
Linfócitos (%)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,33319	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Monócitos (%)	<i>p</i>	0,52072	-0,65129	0,52072	-0,45928	0,21800	0,04769	0,93856	1,00000	0,98452	1,00000	-1,00000	-1,00000	0,88609
Monócitos (%)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00085	0,47167	0,00000	--	0,00000	--	--	--	0,00000
Plaquetas (10 ⁹ /mm ³)	<i>p</i>	-0,35943	-0,93856	-0,35943	0,29799	-0,35798	0,06409	0,65129	0,58985	0,63033	0,58985	-0,58985	-0,58985	0,59633
Plaquetas (10 ⁹ /mm ³)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,33319	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
t-Colesterol (mg/dL)	<i>p</i>	-0,35943	-0,93856	-0,35943	0,29799	-0,35798	0,06409	0,65129	0,58985	0,63033	0,58985	-0,58985	-0,58985	0,59633
t-Colesterol (mg/dL)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,33319	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
LDL (mg/dL)	<i>p</i>	0,52072	-0,65129	0,52072	-0,45928	0,21800	0,04769	0,93856	1,00000	0,98452	1,00000	-1,00000	-1,00000	0,88609
LDL (mg/dL)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00085	0,47167	0,00000	--	0,00000	--	--	--	0,00000
HDL (mg/dL)	<i>p</i>	-0,35943	-0,93856	-0,35943	0,29799	-0,35798	0,06409	0,65129	0,58985	0,63033	0,58985	-0,58985	-0,58985	0,59633
HDL (mg/dL)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,33319	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
VLDL (mg/dL)	<i>p</i>	0,77814	0,51985	0,77814	-0,94001	1,00000	-0,02395	0,37987	0,21800	0,30364	0,21800	-0,21800	-0,21800	0,48709
VLDL (mg/dL)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	--	0,71791	0,00000	0,00085	0,00000	0,00085	0,00085	0,00085	0,00000
Triglicerídeos (mg/dL)	<i>p</i>	0,77814	0,51985	0,77814	-0,94001	1,00000	-0,02395	0,37987	0,21800	0,30364	0,21800	-0,21800	-0,21800	0,48709
Triglicerídeos (mg/dL)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	--	0,71791	0,00000	0,00085	0,00000	0,00085	0,00085	0,00085	0,00000

Fonte: próprio autor.

Tabela 3 (continuação)

		Leucócitos (células/mm ³)	Neutrófilos Segmentados (%)	Eosinófilos (%)	Basófilos (%)	Linfócitos (%)	Monócitos (%)	Plaquetas (10 ⁹ /mm ³)	t-Colesterol	LDL (mg/dL)	HDL (mg/dL)	VLDL (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)
dX	<i>p</i>	-1,00000	0,35943	-0,95851	0,71850	-0,35943	0,52072	-0,35943	-0,35943	0,52072	-0,35943	0,77814	0,77814
dX	<i>p</i> -valor	--	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
H50	<i>p</i>	-0,29799	0,93856	-0,09371	0,07544	-0,93856	-0,65129	-0,93856	-0,93856	-0,65129	-0,93856	0,51985	0,51985
H50	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,15570	0,25345	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
dX/H50	<i>p</i>	-1,00000	0,35943	-0,95851	0,71850	-0,35943	0,52072	-0,35943	-0,35943	0,52072	-0,35943	0,77814	0,77814
dX/H50	<i>p</i> -valor	--	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Amin	<i>p</i>	0,93856	-0,29799	0,81514	-0,88999	0,29799	-0,45928	0,29799	0,29799	-0,45928	0,29799	-0,94001	-0,94001
Amin	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Amáx	<i>p</i>	-0,77814	0,35798	-0,57386	0,88999	-0,35798	0,21800	-0,35798	-0,35798	0,21800	-0,35798	1,00000	1,00000
Amáx	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00085	0,00000	0,00000	0,00085	0,00000	--	--
Absorbância (540 nm)	<i>p</i>	0,01440	-0,06409	0,00335	0,00683	0,06409	0,04769	0,06409	0,06409	0,04769	0,06409	-0,02395	-0,02395
Absorbância (540 nm)	<i>p</i> -valor	0,82801	0,33319	0,95967	0,91794	0,33319	0,47167	0,33319	0,33319	0,47167	0,33319	0,71791	0,71791
Idade (anos)	<i>p</i>	-0,45928	-0,65129	-0,50077	0,75191	0,65129	0,93856	0,65129	0,65129	0,93856	0,65129	0,37987	0,37987
Idade (anos)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Hemácias (milhões/mm ³)	<i>p</i>	-0,52072	-0,58985	-0,64414	0,58043	0,58985	1,00000	0,58985	0,58985	1,00000	0,58985	0,21800	0,21800
Hemácias (milhões/mm ³)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	--	0,00000	0,00085	0,00085
Hemoglobina (mg/dL)	<i>p</i>	-0,49771	-0,63033	-0,58146	0,67664	0,63033	0,98452	0,63033	0,63033	0,98452	0,63033	0,30364	0,30364
Hemoglobina (mg/dL)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Hematócrito (%)	<i>p</i>	-0,52072	-0,58985	-0,64414	0,58043	0,58985	1,00000	0,58985	0,58985	1,00000	0,58985	0,21800	0,21800
Hematócrito (%)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	--	0,00000	0,00000	--	0,00000	0,00085	0,00085
VCM (fL)	<i>p</i>	0,52072	0,58985	0,64414	-0,58043	-0,58985	-1,00000	-0,58985	-0,58985	-1,00000	-0,58985	-0,21800	-0,21800
VCM (fL)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	--	0,00000	0,00000	--	0,00000	0,00085	0,00085
HCM (pg)	<i>p</i>	0,52072	0,58985	0,64414	-0,58043	-0,58985	-1,00000	-0,58985	-0,58985	-1,00000	-0,58985	-0,21800	-0,21800
HCM (pg)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	--	0,00000	0,00000	--	0,00000	0,00085	0,00085
CHCM (%)	<i>p</i>	-0,48508	-0,59633	-0,48508	0,82960	0,59633	0,88609	0,59633	0,59633	0,88609	0,59633	0,48709	0,48709
CHCM (%)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Leucócitos (células/mm ³)	<i>p</i>	1,00000	-0,35943	0,95851	-0,71850	0,35943	-0,52072	0,35943	0,35943	-0,52072	0,35943	-0,77814	-0,77814
Leucócitos (células/mm ³)	<i>p</i> -valor	--	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Neutrófilos Segmentados (%)	<i>p</i>	-0,35943	1,00000	-0,23708	-0,09604	-1,00000	-0,58985	-1,00000	-1,00000	-0,58985	-1,00000	0,35798	0,35798
Neutrófilos Segmentados (%)	<i>p</i> -valor	0,00000	--	0,00028	0,14563	--	0,00000	--	--	0,00000	--	0,00000	0,00000
Eosinófilos (%)	<i>p</i>	0,95851	-0,23708	1,00000	-0,58043	0,23708	-0,64414	0,23708	0,23708	-0,64414	0,23708	-0,57386	-0,57386
Eosinófilos (%)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00028	--	0,00000	0,00028	0,00000	0,00028	0,00028	0,00000	0,00028	0,00000	0,00000
Basófilos (%)	<i>p</i>	-0,71850	-0,09604	-0,58043	1,00000	0,09604	0,58043	0,09604	0,09604	0,58043	0,09604	0,88999	0,88999
Basófilos (%)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,14563	0,00000	--	0,14563	0,00000	0,14563	0,14563	0,00000	0,14563	0,00000	0,00000
Linfócitos (%)	<i>p</i>	0,35943	-1,00000	0,23708	0,09604	1,00000	0,58985	1,00000	1,00000	0,58985	1,00000	-0,35798	-0,35798
Linfócitos (%)	<i>p</i> -valor	0,00000	--	0,00028	0,14563	--	0,00000	--	--	0,00000	--	0,00000	0,00000
Monócitos (%)	<i>p</i>	-0,52072	-0,58985	-0,64414	0,58043	0,58985	1,00000	0,58985	0,58985	1,00000	0,58985	0,21800	0,21800
Monócitos (%)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	--	0,00000	0,00000	--	0,00000	0,00085	0,00085
Plaquetas (10 ⁹ /mm ³)	<i>p</i>	0,35943	-1,00000	0,23708	0,09604	1,00000	0,58985	1,00000	1,00000	0,58985	1,00000	-0,35798	-0,35798
Plaquetas (10 ⁹ /mm ³)	<i>p</i> -valor	0,00000	--	0,00028	0,14563	--	0,00000	--	--	0,00000	--	0,00000	0,00000
t-Colesterol (mg/dL)	<i>p</i>	0,35943	-1,00000	0,23708	0,09604	1,00000	0,58985	1,00000	1,00000	0,58985	1,00000	-0,35798	-0,35798
t-Colesterol (mg/dL)	<i>p</i> -valor	0,00000	--	0,00028	0,14563	--	0,00000	--	--	0,00000	--	0,00000	0,00000
LDL (mg/dL)	<i>p</i>	-0,52072	-0,58985	-0,64414	0,58043	0,58985	1,00000	0,58985	0,58985	1,00000	0,58985	0,21800	0,21800
LDL (mg/dL)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	--	0,00000	--	0,00000	--	0,00085	0,00085
HDL (mg/dL)	<i>p</i>	0,35943	-1,00000	0,23708	0,09604	1,00000	0,58985	1,00000	1,00000	0,58985	1,00000	-0,35798	-0,35798
HDL (mg/dL)	<i>p</i> -valor	0,00000	--	0,00028	0,14563	--	0,00000	--	--	0,00000	--	0,00000	0,00000
VLDL (mg/dL)	<i>p</i>	-0,77814	0,35798	-0,57386	0,88999	-0,35798	0,21800	-0,35798	-0,35798	0,21800	-0,35798	1,00000	1,00000
VLDL (mg/dL)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00085	0,00000	0,00000	0,00085	0,00000	--	--
Triglicerídeos (mg/dL)	<i>p</i>	-0,77814	0,35798	-0,57386	0,88999	-0,35798	0,21800	-0,35798	-0,35798	0,21800	-0,35798	1,00000	1,00000
Triglicerídeos (mg/dL)	<i>p</i> -valor	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00085	0,00000	0,00000	0,00085	0,00000	--	--

Fonte: próprio autor.

Tabela 5 - Análise do índice de correlação de Spearman ρ das variáveis em relação aos parâmetros de estabilidade dx e H₅₀

Parâmetros de estabilidade	Correlação forte $ \rho > 0,7$	Correlação média $0,3 < \rho < 0,7$	Correlação fraca $0 < \rho < 0,3$	Correlação direta ρ positivo	Correlação inversa ρ negativo
dx	Amin, Amáx, Leucócitos, Eosinófilo, Basófilos, VLDL	Idade, Hemácias, Hemoglobina, Hematócrito, VCM, HCM, CHCM, Neutrófilos Segmentados, Linfócitos, Monócitos, Plaquetas, t-Colesterol, LDL, HDL	H50, Absorbância (540 nm)	Amáx, Idade, Hemácias, Hemoglobina, Hematócrito, CHCM, Neutrófilos Segmentados, Basófilos, Monócitos, LDL, VLDL, Triglicerídeos	Amin, Absorbância (540 nm), VCM, HCM, Leucócitos, Eosinófilos, Linfócitos, Plaquetas, t-Colesterol, HDL
H50	Neutrófilos Segmentados, Linfócitos, Plaquetas, t- Colesterol, HDL	Amin, Amáx, Idade, Hemácias, Hemoglobina, Hematócrito, VCM, VCM, HCM, CHCM, Monócitos, LDL, VLDL, Triglicerídeos	Absorbância (540 nm), Leucócitos, Eosinófilos, Basófilos	Amáx, VCM, HCM, Neutrófilos Segmentados, Basófilos, VLDL, Triglicerídeos	Amin, Absorbância (540 nm), Idade, Hemácias, Hemoglobina, Hematócrito, CHCM, Leucócitos, Eosinófilos, Linfócitos, Plaquetas, t-Colesterol, HDL

Fonte: próprio autor.

6. DISCUSSÃO

O teste FOE avalia a estabilidade da membrana de eritrócitos em função da concentração de um agente caotrópico, neste caso, do surfactante LAS em concentração salina constante de 0,9 g/dL. Como mencionado, foi utilizado nos experimentos o principal componente do LAS, o DBSNa, para estudar as consequências do LAS à homeostase celular. Dessa forma, assumiu-se que os resultados dos experimentos do DBSNa são equivalentes aos resultados que iríamos obter utilizando LAS como agente caotrópico.

Em meio de caotrópico crescente, as hemácias perdem a sua homeostase de membrana até romperem-se (lise celular), levando à lise celular e liberação de hemoglobina. Por essa razão, espera-se que ao realizar a leitura de absorbância, na região do visível a 540 nm, a concentração de hemoglobina liberada se ajuste a uma curva sigmoideal ao variar a concentração do caotrópico (LAS), causando stress às células com o surfactante. Os experimentos foram realizados usando concentração de LAS crescente até que obtivéssemos lise das hemácias e provocasse medidas de absorbância entre 0 até aproximadamente 1,2, valor máximo de absorbância relativo a concentração de surfactante $X_{\text{máx}} = 580,2971 \mu\text{M}$ (DL_{100}) que foi capaz de provocar 100% de lise nos eritrócitos.

Como objetivo principal deste trabalho, encontrou-se a concentração de surfactante capaz de provocar 50% de lise dos eritrócitos, equivalente ao DL_{50} (Dose letal 50%), índice de Toxicidade Aguda evidenciado como “Informações Toxicológicas” nas FISPQs (Ficha de informações de segurança de produtos químicos) conforme regulamento do Comitê Brasileiro de Química, obedecendo à norma ABNT NBR 14725-4:2009 (ABNT, 2009). Não foram encontrados na literatura DL_{50} para DBSNa (ANIDROL, 2015, LABSYNTH, 2017). Entretanto, foram encontrados valores de toxicidade aguda para LAS de DL_{50} (oral, ratos) = 1470 mg/kg peso corpóreo (USIQUIMICA, 2009), DL_{50} (oral, ratos)= 775 mg/kg peso corpóreo, DL_{50} (dérmico, coelhos)= 2000 mg/kg peso corpóreo (DETEN, 2019, QUIMICLOR, 2016) e DL_{50} (oral, ratos)= 1500 mg/kg peso corpóreo (GARDEN, 2013). As divergências que podem ser vistas aqui refletem o fato de que o LAS é uma mistura de vários componentes e, por isso, as variações de composição percentual podem refletir em diferentes índices de toxicidade, motivo pelo qual o presente trabalho optou

por usar o DBSNa (substância pura) para que os resultados pudessem ser melhor interpretados e as inferências ao LAS fossem mais seguras.

O x_0 , ou H_{50} , ou DL_{50} encontrado de DBSNa/LAS para humanos foi de 447,6324 μM , e, considerando a densidade do sangue humano como aproximadamente 1 kg/L, obtemos 0,4476 mmol/kg peso sanguíneo ou 0,4476 mmol/L de sangue. Ou seja, esta concentração presente na corrente sanguínea poderá causar a morte de 50% das células do sangue. Para efeitos de comparação, adotando como unidade biológica mmol/kg, identificou-se o equivalente ao DL_{50} referente à ingestão oral do LAS (Massa molar=322 g/mol) para ratos: (A) 4,5652 mmol/kg peso corpóreo (USIQUIMICA, 2009), (B) 2,4068 mmol/kg peso corpóreo (DETEN, 2019, QUIMICLOR, 2016) e (C) 4,6584 mmol/kg peso corpóreo (GARDEN, 2013). Neste caso, a unidade biológica é quilos de massa corporal de ratos, dessa forma, podemos interpretar como sendo as concentrações que quando ingeridas por 100 ratos causaria a morte de 50% da população (50 ratos). Também foi identificado o DL_{50} referente ao contato dérmico em coelhos, em (D) 6,2112 mmol/kg de peso corpóreo que causaria a morte de 50% da população dos coelhos em contato com LAS através da pele. Comparando-se o resultado de DL_{50} avaliado por meio do sangue humano e aqueles avaliados em cobaias (ratos e coelhos), encontramos resultados de DL_{50} para as cobaias em (A) 10,19 vezes maior que o DL_{50} para as hemácias humanas, em (B) 5,37 vezes maior que o DL_{50} para as hemácias humanas, em (C) 10,40 vezes maior que o DL_{50} para as hemácias humanas e em (D) 13,87 vezes maior que o DL_{50} para as hemácias humanas. Assim, podemos inferir que os prejuízos à saúde humana não são bem avaliados por meio de experimentos feitos com cobaias visto que eritrócitos humanos parecem ser bem mais sensíveis.

Resgatando-se informações de doses que possivelmente podem ser ingeridas por dia da literatura, APARICIO et. al. (2017) afirma que o pior cenário para ingestão diária de LAS seria 14 μg /dia para ingestão de vegetais folhosos e 4,7 μg /dia para ingestão de tubérculos. Construindo uma analogia dessas doses diárias de ingestão de LAS e, considerando exposição única, absorção de 100% pela corrente sanguínea e adotando que o organismo humano possui, em média, 5 L de sangue total, teríamos $8,6957 \times 10^{-6}$ mmol/L de sangue de LAS (Massa molar=322 g/mol) ingeridos diariamente através de vegetais folhosos e $2,9193 \times 10^{-6}$ mmol/L de sangue ingeridos diariamente através de tubérculos. Relacionando essas concentrações com o DL_{50} do

LAS encontrado experimentalmente, 0,4476 mmol/L de sangue, as concentrações calculadas ingeridas diariamente são 1.9426×10^{-5} vezes menor para vegetais folhosos e 6.5215×10^{-6} vezes menor para tubérculos que a concentração capaz de causar 50% de lise das hemácias totais.

Ou seja, considerando a dose diária calculada por APARICIO et. al. (2017), podemos afirmar que não haveria riscos significativos à saúde das hemácias. Porém, a ingestão de vegetais folhosos e tubérculos não pode ser considerada uma exposição única, já que a população brasileira, ingere esses tipos de alimentos diariamente, tornando esta uma exposição repetida crônica. Em muitos casos, os efeitos tóxicos que se manifestam após exposição única são muito diferentes dos produzidos por exposições repetidas. (EATON; GILBERT, 2012) Portanto, sugere-se posteriores estudos para melhor definição dos impactos toxicológicos que a ingestão crônica repetida de LAS pode causar ao equilíbrio das células sanguíneas.

Paralelamente, através da matriz de correlação de Spearman encontrou-se correlações significativas já vistas na literatura, como por exemplo correlação inversa de t-Colesterol e H_{50} que nas Tabelas 3 e 4 mostra-se forte. Essa correlação nos revela que quanto maior o t-Colesterol, maior estabilidade. Esta correlação era esperada e já foi evidenciada em outros trabalhos, o que corrobora para afirmar que nosso método foi aplicado corretamente. Entretanto, também foi encontrada a correlação inversa de t-Colesterol e dX que nas Tabelas 3 e 4 demonstra ser grau médio, o que contradiz o que é encontrado na literatura. Acreditamos que seja devido ao tamanho amostral limitado e a variabilidade dos indivíduos. Variadas outras correlações foram encontradas e, apesar de não serem o escopo desse trabalho, abrem portas para estudos posteriores em que as variáveis externas moduladoras podem ser avaliadas e assim verificarmos existência ou não de efeitos externos sobre os resultados aqui apresentados.

7. CONCLUSÃO

Com o objetivo de avaliar os efeitos citotóxicos do LAS, por meio do teste FOE, esse estudo foi capaz de verificar que os dados de DL_{50} do LAS encontrados na literatura utilizando-se cobaias não são seguros quando comparados às concentrações capazes de provocar o início da hemólise ($X_{\min}$ ou NOAEL) e 50% da hemólise ($H_{50}/x0/DL_{50}$) de humanos. Os valores de DL_{50} para cobaias são da ordem de 5,3 a 13,8 vezes maiores do que o encontrado experimentalmente para humanos. Portanto, podemos inferir que os prejuízos à saúde humana não são bem avaliados por meio de experimentos feitos com cobaias visto que eritrócitos humanos parecem ser bem mais sensíveis. Também se comprovou que a quantidade de LAS residual encontrada em vegetais folhosos e tubérculos não é considerado tóxica, ou seja, não provoca mudanças negativas na estabilidade dos eritrócitos humanos.

Estudos de correlação entre parâmetros de estabilidade eritrocitária e variáveis externas moduladoras do eritrograma, série branca, lipidograma e variáveis individuais foram realizados e foram encontradas correlações já descritas na literatura, como a correlação inversa de H_{50} e t-Colesterol, bem como outras que se deve investigar. Sugere-se que outros estudos para avaliar detalhadamente essas correlações sejam realizados futuramente.

8. REFERÊNCIAS

ABRIL, Concepción et al. Determination of perfluorinated compounds, bisphenol A, anionicsurfactants and personal care products in digested sludge, compostand soil by liquid-chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal Of Chromatography A**. Seville, Spain, p. 34-41. set. 2018a.

ABRIL, Concepción et al. Dispersive liquid–liquid microextraction as a new clean-up procedure for the determination of parabens, perfluorinated compounds, UV filters, biocides, surfactants, and plasticizers in root vegetables. **Analytical And Bioanalytical Chemistry**. Seville, Spain, p. 5155-5163. jun. 2018b.

ANIDROL. **FICHA DE INFORMAÇÃO DE SEGURANÇA DE PRODUTO QUÍMICO: SULFONATO DE SÓDIO (DODECILBENZENO)**. 2015. Disponível em: <[http://www.anidrol.com.br/fispq/SULFONATO%20DE%20SODIO%20\(DODECILBENZENO\)%20-%20A-8671.pdf](http://www.anidrol.com.br/fispq/SULFONATO%20DE%20SODIO%20(DODECILBENZENO)%20-%20A-8671.pdf)>. Acesso em: 17 jan. 2020.

ANVISA. **PROGRAMA DE ANÁLISE DE RESÍDUOS DE AGROTÓXICOS EM ALIMENTOS**. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+PARA+2013-2015_VERS%C3%83O-FINAL.pdf/494cd7c5-5408-4e6a-b0e5-5098cbf759f8. Acesso em: 15 ago. 2019.

APARICIO, Irene et al. Determination of household and industrial chemicals, personal care products and hormones in leafy and root vegetables by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal Of Chromatography A**. Seville, p. 49-56. dez. 2017.

ASCOM/ANVISA. **Publicada reclassificação toxicológica de agrotóxicos**. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/publicada-reclassificacao-toxicologica-de-agrotoxicos/219201?p_p_auth=QPcHfSq&inheritRedirect=false&redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br%2Fnoticias%3Fp_p_auth%3DQPcHfSq%26p_p_id%3D101_INSTANCE_FXrpx9qY7FbU%26p_p_lifecycle%3D0%26p_p_state%3Dnormal%26p_p_mode%3Dview%26p_p_col_id%3Dcolumn-3%26p_p_col_count%3D5. Acesso em: 03 set. 2019.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 14725-4:2009**: Produtos químicos — Informações sobre segurança, saúde e meio ambiente Parte 4:

Ficha de informações de segurança de produtos químicos (FISPQ). Rio de Janeiro: Abnt, 2009. Disponível em: <https://ww2.icb.usp.br/icb/wp-content/uploads/seguranca_quimica/Parte4_NBR_14725-4-2009.pdf>. Acesso em: 17 dez. 2020.

BAIN & COMPANY. Banco Nacional do Desenvolvimento Econômico (BNDES). **Potencial de diversificação da indústria química Brasileira: Relatório 4 - Tensoativos**. Rio de Janeiro: Bain & Company, 2014.

BERNARDINO NETO, M. e colab. **Bivariate and multivariate analyses of the correlations between stability of the erythrocyte membrane, serum lipids and hematological variables**. Biorheology, v. 50, n. 5–6, p. 305–320, 2013.

BJERREGAARD, H. F. e STÆRMOSE, S. e VANG, J. **Effect of linear alkylbenzene sulfonate (LAS) on ion transport and intracellular calcium in kidney distal epithelial cells (A6)**. Toxicology in Vitro, v. 15, n. 4–5, p. 531–537, 2001.

BRUCE, A. Membrana Celular. v. 2, p. 36, 2002.

CAMACHO-MUÑOZ, Dolores et al. Occurrence of surfactants in wastewater: Hourly and seasonal variations in urban and industrial wastewaters from Seville (Southern Spain). **Science Of The Total Environment**. Seville, Spain, p. 977-984. out. 2013.

COWAN-ELLSBERRY, Christina et al. Environmental Safety of the Use of Major Surfactant Classes in North America. **Critical Reviews In Environmental Science And Technology**. Washington, Dc, p. 1893-1993. jan. 2014.

DALTIN, Decio. **Tensoativos**. [S.l: s.n.], 2011.

DAMASIO, Kevin. **Liberação recorde reacende debate sobre uso de agrotóxicos no Brasil. Entenda**. Disponível em: <https://www.nationalgeographicbrasil.com/meio-ambiente/2019/07/liberacao-recorde-reacende-debate-sobre-uso-de-agrotoxicos-no-brasil-entenda>. Acesso em: 15 ago. 2019.

DELFORNO, Tiago Palladino. **Caracterização Microbiana e remoção do alquilbenzeno linear sulfonado em reator EGSB**. 2011. 123 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Hidráulica, Eesc - Usp, São Carlos, 2011.

DETEN. **FICHA DE INFORMAÇÃO DE SEGURANÇA DE PRODUTO QUÍMICO: ÁCIDO LINEAR ALQUILBENZENO SULFÔNICO**. 2019. Disponível em: <http://www.deten.com.br/Files/pdf/produtos/detlas320/FISPQ_LAS_portugues.pdf>. Acesso em: 17 jan. 2020.

- DONNACHIE, Rachel L.. **INTELLIGENT ECOTOXICOLOGY OF CHEMICALS IN UK RIVERS – DEVELOPMENT OF A RISK-RANKING METHODOLOGY**. 2016. 311 f. Tese (Doutorado) - Curso de Life Sciences, Brunel University London, Londres, 2016.
- EATON, David L.; GILBERT, Steven G.. Princípios de Toxicologia. In: KLAASSEN, Curtis D.. **Fundamentos Em Toxicologia de Casarett e Doull**. Porto Alegre: Amgh, 2012. Cap. 2. p. 5-17.
- ELISA, A. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 2017.
- FOGAÇA, Jennifer (Ed.). **Química dos sabões e detergentes**. Disponível em: <<https://brasilecola.uol.com.br/quimica/quimica-dos-saboes-detergentes.htm>>. Acesso em: 2 ago. 2019.
- FREITAS, Mariana V. de et al. Influence of age on the correlations of hematological and biochemical variables with the stability of erythrocyte membrane in relation of sodium dodecyl sulfate. **Hematology**. Uberlândia, p. 424-430. nov. 2013.
- FREITAS, Márcia Aires Rodrigues de et al. The role of the erythrocyte in the outcome of pregnancy with preeclampsia. **Plos One**. Uberlândia, Brazil, p. 1-17. mar. 2019.
- GARDEN. **FICHA DE INFORMAÇÃO DE SEGURANÇA DE PRODUTO QUÍMICO: ÁCIDO SULFÔNICO 90%**. 2013. Disponível em: <<https://www.farmacia.ufmg.br/wp-content/uploads/2018/10/FISPQ-%c3%81cido-Sulfonico-5.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2020.
- GLOBO RURAL (Ed.). **Brasil registra 40 mil casos de intoxicação por agrotóxicos em uma década**. Disponível em: <https://g1.globo.com/economia/agronegocios/globo-rural/noticia/2019/03/31/brasil-tem-40-mil-casos-de-intoxicacao-por-agrotoxicos-em-uma-decada.ghtml>. Acesso em: 02 ago. 2019.
- GONZÁLEZ, M.m. et al. Degradation and environmental risk of surfactants after the application of compost sludge to the soil. **Waste Management**. Seville, Spain, p. 1324-1331. abr. 2012.
- IVANKOVIĆ, Tomislav; HRENOVIĆ, Jasna. Surfactants in the Environment. **Archives Of Industrial Hygiene And Toxicology**, [s.l.], v. 61, n. 1, p.95-110, 1 jan. 2010. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.2478/10004-1254-61-2010-1943>.
- JORNAL NACIONAL (Ed.). **Governo acelera liberação do uso de novos agrotóxicos no país**. Disponível em: <https://g1.globo.com/jornal-nacional/noticia/2019/06/28/governo-acelera-liberacao-do-uso-de-novos-agrotoxicos-no-pais.ghtml>. Acesso em: 15 ago. 2019.

KERVALT, Marcelo. **Liberação de agrotóxicos no Brasil é a maior em 14 anos.** Disponível em: <https://www.nsctotal.com.br/noticias/liberacao-de-agrotoxicos-no-brasil-e-a-maior-em-14-anos>. Acesso em: 15 ago. 2019.

LABSYNTH. **FICHA DE INFORMAÇÃO DE SEGURANÇA DE PRODUTO QUÍMICO: DODECILBENZENO SULFONATO DE SÓDIO.** 2017. Disponível em: <http://downloads.labsynth.com.br/FISPQ/rv2012/FISPQ-%20Dodecilbenzeno%20Sulfonato%20de%20Sodio.pdf>. Acesso em: 17 jan. 2020.

LARA. **Química dos tensoativos.** Disponível em: <http://quimicadostensoativos.blogspot.com/2008/11/o-que-so-tensoativos.html>. Acesso em: 02 jul. 2019.

LAZZERI, Thais. **Agrotóxicos: Brasil libera quantidade até 5 mil vezes maior do que Europa.** Disponível em: <https://reporterbrasil.org.br/2017/11/agrotoxicos-alimentos-brasil-estudo/>. Acesso em: 15 ago. 2019.

MAGALHÃES, Lana. **Hemoglobina.** Disponível em: <https://www.todamateria.com.br/hemoglobina/>. Acesso em: 02 jul. 2019.

MARTINS, Nuno et al. Role of surfactant headgroups on the toxicity of SLEnS-LAS mixed micelles: A case study using microtox test. **Science Of The Total Environment.** Portugal, p. 1366-1372. jul. 2018.

MOREIRA, Roger. **O que são tensoativos?** 2014. Disponível em: <http://www.quimicalegal.com/tensoativos-o-que-sao/>. Acesso em: 12 abr. 2018.

MURADOR, Priscila; DEFFUNE, Elenice. Aspectos estruturais da membrana eritrocitária. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter..** Botucatu, Brasil, p. 168-178. jan. 2007.

MYERS, Drew. **SURFACTANT SCIENCE AND TECHNOLOGY.** Hoboken: John Wiley& Sons, Inc., 2006.

NETTO, R. **Estabilidade de membrana de eritrócitos em portadores de depressão.** Universidade Federal de Uberlândia - UFU, 2009.

OKBAH, M. A.. Environmental monitoring of linear alkylbenzene sulfonates and physicochemical characteristics of seawater in El-Mex Bay (Alexandria, Egypt). **Environ Monit Assess.** Alexandria, Egypt, p. 3103-3115. ago. 2012.

PARAISO, L. e colab. **Influence of Acute Exercise on the Osmotic Stability of the Human Erythrocyte Membrane.** International Journal of Sports Medicine, v. 35, n. 13, p. 1072–1077, 2014. Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0034-1371834>.

PENTEADO, José Carlos P. e EL SEOUD, Omar A. e CARVALHO, Lilian R.F.

Alquilbenzeno sulfonato linear: Uma abordagem ambiental e analítica. Química Nova, v. 29, n. 5, p. 1038–1046, 2006.

PRODUCTS, Hera - Human And Environmental Risk Assessment On Ingredients Of Household Cleaning. **LAS Linear Alkylbenzene Sulphonate (CAS No. 68411-30-3)**. Disponível em: http://www.heraproject.com/files/HERA-LASrevisedApril_2013_Final1.pdf. Acesso em: 20 maio 2018.

PROSSER, R.s.; SIBLEY, P.k.. Human health risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in plant tissue due to biosolids and manure amendments, and wastewater irrigation. **Environment International**. Ontario, Canada, p. 223-233. dez. 2014.

QUIMICLOR. **FICHA DE INFORMAÇÃO DE SEGURANÇA DE PRODUTO QUÍMICO: ÁCIDO SULFÔNICO 90%**. 2016. Disponível em: http://www.quimiclor.com.br/produtos/pdf/fispq1_4.pdf. Acesso em: 17 jan. 2020.

RODRIGUES, H. G. et al. Efeitos de pesticidas sobre a fragilidade osmótica de eritrócitos - Uma breve revisão. **Revista Biotemas**, n. 22, p. 7-16, Março 2009. ISSN 0103 - 1643.

RUPPENTHAL, Janis Elisa. **Toxicologia**. Disponível em: http://estudio01.proj.ufsm.br/cadernos_seguranca/sexta_etapa/toxicologia.pdf. Acesso em: 16 abr. 2018.

SANTOS, J.I.. A new method for the routine analysis of LAS and PAH in sewage sludge by simultaneous sonication-assisted extraction prior to liquid chromatographic determination. **Analytica Chimica Acta**. Seville, Spain, p. 102-109. out. 2007.

SHUKLA, Anubha; TRIVEDI, SunilP..An in vitro analysis of the rat C6 glioma cells to elucidate the linear alkylbenzene sulfonate induced oxidative stress and consequent G2/M phase cell cycle arrest and cellular apoptosis. **Chemosphere**. Lucknow, p. 443-451. abr. 2018.

UFPB, Lista de exercícios de Química 2. 2005. Disponível em: <http://www.educacional.com.br/userdata/construtor/2475/2475193/2005QUI3.PDF>. Acesso em: 28 nov. 2019.

USIQUÍMICA. **FICHA DE INFORMAÇÃO DE SEGURANÇA DE PRODUTO QUÍMICO: ÁCIDO SULFÔNICO LINEAR**. 2009. Disponível em: http://www.usiquimica.com.br/adm_img/fispq-9.pdf. Acesso em: 17 jan. 2020.

VARGAS, Leandro e SCHERER ROMAN, Erivelton. **Conceitos e aplicações dos adjuvantes**. 2006.

WU, Xiaoqin et al. Plant uptake of pharmaceutical and personal care products from recycled water and biosolids: a review. **Science Of The Total Environment**. Riverside, Ca,, p. 655-666. dez. 2015.