

## QUANTIFICAÇÃO SIMULTÂNEA DE INDICADORES BIOLÓGICOS DE EXPOSIÇÃO A SOLVENTES ORGÂNICOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Rachel Bulcão, Lucas Santa Maria, Mariele Charão, Angela Moro, Miguel Roehrs e Solange Cristina Garcia\*

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Universidade Federal de Santa Maria, CP 5061, 97110-970 Santa Maria - RS, Brasil

Renata Pereira Limberger

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90610-000 Porto Alegre - RS, Brasil

Recebido em 14/5/07; aceito em 7/3/08; publicado na web em 26/8/08

SIMULTANEOUS QUANTIFICATION OF ORGANIC SOLVENT BIOMARKERS BY HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY. Biological monitoring is very important to guarantee health to workers. This method was developed for simultaneous determination of xylene, toluene, styrene and ethylbenzene metabolites. It involves only dilution and centrifugation of urine samples and improved chromatographic conditions. Analyses show recovery  $\geq 95\%$ ;  $r^2 > 0.99$ ; intermediate precision  $CV\% < 6\%$  and  $\% \text{ bias} < \pm 10$ . Exposed subjects presented at least three metabolites in urine. The method proved to be feasible, reliable and important in biological monitoring, especially in exposure to organic solvent mixtures.

Keywords: HPLC; organic solvents; biological exposure index.

### INTRODUÇÃO

A toxicologia ocupacional estuda os efeitos da exposição laboral a produtos químicos sobre a saúde do trabalhador prevenindo, assim, prejuízos a longo prazo.<sup>1</sup> Além disso, procura entender as relações causais entre exposição e efeito para que se possa atuar nas etapas iniciais do processo, quando os danos fisiopatológicos ainda são reversíveis.

A exposição ocupacional é o período em que o ser humano se encontra suscetível à contaminação por xenobióticos que estão presentes no ambiente de trabalho. Essas substâncias podem ser absorvidas através das vias respiratória, cutânea, digestiva e placentária.<sup>2</sup> No caso dos solventes orgânicos, a absorção ocorre pela via respiratória e/ou cutânea, sendo predominantemente pela via respiratória.<sup>3</sup>

Solvente orgânico é a designação genérica dada a um grupo de substâncias químicas orgânicas que apresentam maior ou menor grau de volatilidade e lipossolubilidade. O uso de solventes orgânicos no meio ocupacional representa significativo risco à saúde do trabalhador, sendo que a utilização desses compostos é bastante ampla em pequenas, médias e grandes indústrias, no meio rural e laboratorial.<sup>4,5</sup>

Embora na última década os níveis de exposição tenham diminuído muito nos países industrializados, o número de trabalhadores expostos regularmente a solventes é ainda expressivo, levando a crer que ainda hoje milhões deles são expostos diariamente a solventes em todo o mundo.<sup>6</sup>

A monitorização biológica complementa o controle ambiental e a vigilância à saúde, considerando-se que determina a exposição global diretamente do indivíduo e detecta efeitos precoces e reversíveis, proporcionando uma melhor estimativa de risco.<sup>7</sup> Esta monitorização dá-se através da quantificação dos indicadores biológicos de exposição (IBE), que podem ser os próprios xenobióticos e/ou seus metabólitos em amostras biológicas do trabalhador. Desta forma, verifica-se se os

níveis encontrados permanecem dentro dos índices biológicos máximos permitidos (IBMP) que são determinados por meio de estudos epidemiológicos, experimentais e casos clínicos.<sup>8</sup>

No Brasil, a Norma Regulamentadora nº 7 (NR-7), de 29 de dezembro de 1994 da Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho, estabeleceu parâmetros biológicos para controle da exposição a agentes químicos. O referido programa objetiva promover e preservar a saúde dos trabalhadores.<sup>8</sup>

Dentre os solventes orgânicos, destacam-se tolueno, estireno, xileno e etilbenzeno como agentes químicos importantes ao risco ocupacional de exposição e toxicidade.<sup>9-11</sup> Na Tabela 1 é possível observar os atuais valores estabelecidos no Brasil para os IBE urinários destes quatro solventes. Os IBMP brasileiros estão de acordo com as recomendações da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) 2000 para os metabólitos destes xenobióticos.<sup>12</sup>

Esses solventes são empregados nas mais diversas funções. As principais fontes de exposição ocupacional ao tolueno decorrem do seu uso como solvente para óleos, borracha natural e sintética, resinas, carvão, como diluente para tintas e como matéria-prima para a síntese orgânica de outros compostos nas indústrias química, plástica, de fibras sintéticas, entre outras.<sup>11</sup> Sua principal ação tóxica ocorre no sistema nervoso central, sendo bem conhecida sua neurotoxicidade. Em exposições crônicas induz, ainda, hepatotoxicidade e nefrotoxicidade.<sup>13-15</sup> O ácido hipúrico urinário é proposto como IBE para a avaliação ocupacional a este solvente,<sup>10,16,17</sup> porém, é um metabólito normalmente presente no organismo humano, em indivíduos não ocupacionalmente expostos ao tolueno. Pois, o ácido benzóico utilizado em muitos alimentos como conservante também é biotransformado em ácido hipúrico,<sup>16</sup> existindo valores de referência estabelecidos para este IBE.<sup>4,8</sup>

O xileno é um hidrocarboneto aromático, que produz depressão do sistema nervoso central (SNC), é um irritante de pele e mucosas. É similar ao tolueno, mas preferencialmente acumula-se no cérebro e tecidos adiposos.<sup>4</sup> O ácido metil-hipúrico é seu indicador proposto pela Legislação Brasileira.<sup>8</sup> Este metabólito não representa um com-

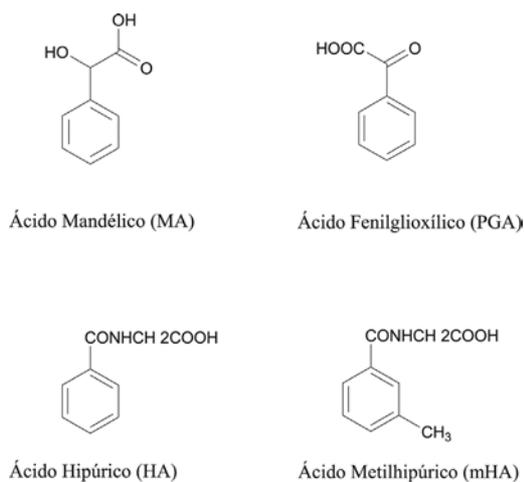
\*e-mail: sgarpom@smail.ufsm.br

ponente fisiológico da urina e correlaciona-se bem com a concentração total do solvente absorvido pelo indivíduo exposto. O ácido 3-metil-hipúrico, encontrado na urina, é o metabólito presente em maior concentração comparado aos outros isômeros (ácido 2-metil-hipúrico e ácido 4-metil-hipúrico).<sup>4,15</sup>

O estireno possui ação irritante de pele e mucosa, apresenta neurotoxicidade central e periférica, além de ser hepatotóxico e carcinogênico.<sup>4,9,18</sup> É metabolizado rapidamente a ácido mandélico e ácido fenilglioixílico que são excretados na urina, sendo estes os IBE reconhecidos pela Legislação Brasileira.<sup>10,13,19</sup>

O etilbenzeno é um intermediário químico de alto valor comercial, utilizado extensivamente nas indústrias química, petroquímica e farmacêutica, em diferentes aplicações, tais como solvente na fabricação de tintas e vernizes e como precursor de diversos outros produtos.<sup>20,21</sup> O IBE recomendado pela Legislação Brasileira é o ácido mandélico urinário.<sup>8</sup>

A Figura 1 representa as estruturas do ácido mandélico (MA), ácido fenilglioixílico (PGA), ácido hipúrico (HA) e ácido 3-metil-hipúrico (3mHA) que são indicadores de exposição aos solventes estireno (MA e PGA), etilbenzeno (MA), tolueno (HA) e xileno (3mHA). Desta forma, a monitorização da saúde do trabalhador, através da quantificação dos IBEs, pode assegurar a longo prazo o não aparecimento de doenças crônicas, como câncer, além de neurotoxicidade, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade.<sup>7</sup>



**Figura 1.** Estrutura química dos quatro metabólitos que são referentes aos solventes orgânicos: estireno (MA e PGA), etilbenzeno (MA), tolueno (HA) e xileno (3mHA)

Existem métodos para determinação de IBE em urina de indivíduos expostos que incluem, principalmente, a cromatografia gasosa (CG)<sup>22</sup> e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE),<sup>23</sup> que são duas técnicas sensíveis e seletivas, permitindo a detecção de pequenas quantidades dos indicadores. A análise dos IBEs por CLAE tem aumentado, já que além de oferecer a vantagem de separação e quantificação simultâneas, pode representar menor custo comparado com a CG porque não é necessária a derivatização prévia da amostra para torná-la volátil e termicamente estável. Por outro lado, a maioria das análises realizadas por CLAE apresenta várias etapas pré-analíticas como, por exemplo, extração da amostra, representando assim, algumas desvantagens relacionadas às condições cromatográficas.<sup>23</sup>

Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo otimizar e validar um método analítico para quantificar os IBEs: ácidos fenilglioixílico, mandélico, hipúrico e 3-metil-hipúrico, simultaneamente, empregando apenas diluição urinária, seguida de centrifugação, como pré-tratamento da amostra biológica. Além disso, algumas alterações

das condições cromatográficas foram realizadas. O método validado foi aplicado em amostras de indivíduos não expostos ocupacionalmente e em pintores expostos a tintas contendo uma mistura de solventes em sua composição.

A determinação simultânea dos IBEs é importante devido ao fato dos indivíduos encontrarem-se expostos a uma mistura de solventes tornando, assim, a determinação mais rápida, barata e confiável. Níveis alterados destes IBEs indicam exposição excessiva e a possibilidade do surgimento de efeitos em longo prazo, mesmo que os indivíduos não apresentem sinais de toxicidade no momento da coleta. Portanto, métodos simples e rápidos são imprescindíveis na rotina laboratorial, no auxílio da monitorização biológica e na prevenção de patologias ocupacionais crônicas.

## PARTE EXPERIMENTAL

### Reagentes e soluções analíticas

Os reagentes utilizados foram de pureza analítica ou grau cromatográfico. Foram utilizados metanol e acetonitrila grau HPLC da Tedia Company (Fairfield USA). Todos os outros reagentes utilizados foram de grau analítico, e os padrões de todos os biomarcadores foram da marca Merck®. As soluções padrões aquosas foram preparadas utilizando água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) e metanol grau HPLC.

Foram preparadas soluções padrão estoque de ácido hipúrico, ácido 3-metil-hipúrico, ácido mandélico e ácido fenilglioixílico. Utilizou-se água Milli-Q para preparar o PGA e MA; metanol e água Milli-Q (50:50 v/v) para HA e 3 mHA, nas concentrações de 1000 µg mL<sup>-1</sup>.

### Preparo das amostras

As amostras urinárias foram diluídas em proporção de 1:10 com KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 22,5 mM em ácido acético 1%:acetonitrila (90:10, v/v) e foram centrifugadas a 3000 g durante 5 min. A seguir, o sobrenadante foi filtrado em membrana de acetato de celulose 0,22 µm e após, 20 µL foram injetados no cromatógrafo (CLAE-UV).

Para a padronização do método analítico, na realização de curvas com adição de padrão, foi utilizado um *pool* de urina de voluntários saudáveis, acadêmicos e funcionários da Universidade Federal de Santa Maria, que declararam não terem sido expostos ocupacionalmente aos solventes em estudo.

As amostras urinárias para a aplicação metodológica foram coletadas como preconizado pela Legislação (NR-7) vigente, de acordo com o projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM (Ofício CEP nº 23081.015931/2006-59) e analisadas no Laboratório de Análises Toxicológicas, LATOX, da Universidade Federal de Santa Maria.

### Otimização das condições cromatográficas

Na otimização e validação do método foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Knauer, Berlim, Alemanha) equipado com uma bomba modelo K 1001, degasser *online* modelo K 5004, injetor manual com alça de amostragem de 20 µL, acoplado a um detector UV/VIS modelo K 2501. A aquisição dos dados foi obtida através do software Eurochrom 2000 software®, 2.05 para Windows (Knauer, Berlim, Alemanha).

A separação cromatográfica foi realizada através da coluna C18 Eurospher-100®, 150 x 4 mm com poro de 5 µm de diâmetro de partícula (d<sub>p</sub>), com pré-coluna Eurospher-100®, 5 x 4 mm, 5 µm de diâmetro de partícula.

A fase móvel consistiu em uma mistura de tampão  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  22,5 mM em ácido acético 1% - acetonitrila (90:10, v/v), com pH 3,5 ajustado com KOH 2 M. A eluição foi isocrática, com fluxo de 1,0 mL/min, a temperatura ambiente. A absorbância foi monitorada a 225 nm, e o tempo total de análise foi de 22 min.

#### Método proposto para determinação em urina com e sem adição de padrão

Em um tubo de vidro com junta esmerilhada foram colocados 1,0 mL de urina controle negativo e volumes relativos às concentrações desejadas do padrão analítico (a partir da solução-estoque de 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , resultando em concentrações finais de 0,01 – 0,21 g  $\text{L}^{-1}$ ). Posteriormente, foram diluídas numa proporção de 1:10 com a fase móvel (v/v). A mistura foi centrifugada a 3000 g por 5 min, o sobrenadante foi filtrado e 20  $\mu\text{L}$  do mesmo foram injetados no cromatógrafo (CLAE-UV). O procedimento para análise de rotina foi o mesmo, exceto a aplicação de padrões, ocorrendo apenas a diluição da amostra numa proporção de 1:10, seguida de centrifugação e quantificação cromatográfica.

#### Determinação da creatinina urinária

A creatinina urinária foi quantificada por método espectrofotométrico através do kit comercial Doles<sup>®</sup>, utilizando-se o espectrofotômetro UV/VIS Hitachi<sup>®</sup>.

Os níveis dos IBEs urinários foram corrigidos pela quantificação da creatinina urinária.<sup>10</sup> O cálculo para correção com a creatinina foi realizado pela divisão da concentração do indicador biológico pela concentração urinária da creatinina em g  $\text{L}^{-1}$ .

#### Validação do método

As condições de preparação das amostras juntamente com a etapa de análise cromatográfica foram validadas para assegurar a qualidade, confiabilidade e aplicabilidade do método.<sup>24</sup>

Os seguintes parâmetros da validação foram verificados: limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, precisão intermediária, exatidão, recuperação dos analitos na matriz, além da aplicação do método.<sup>25</sup>

Os LD e LQ foram determinados pelo uso do desvio padrão da resposta (s) e a inclinação da curva de calibração (b) construída em níveis próximos dos limites. As equações são:  $\text{LD} = 3,3 \text{ s/b}$  e  $\text{LQ} = 10 \text{ s/b}$ . O desvio padrão da resposta pode ser baseado no desvio padrão do branco, no desvio padrão residual da linha de regressão ou no desvio padrão da intersecção da reta no eixo y.<sup>26</sup>

Foram utilizadas as concentrações na faixa de 0,01 – 0,21 g  $\text{L}^{-1}$  dos padrões dos quatro metabólitos em água e em urina, analisadas em triplicata, realizando-se 5 curvas de cada. A linearidade das curvas foi verificada por meio da equação da reta e do coeficiente de regressão ( $r^2$ ) das curvas, o qual deve ser superior a 0,98.<sup>26-30</sup>

As precisões intermediárias foram determinadas por meio de análise em sextuplicata de amostras fortificadas de PGA, HA e 3 mHA nas concentrações urinárias de 0,03; 0,07 e 0,12 g  $\text{L}^{-1}$  e para o MA nas concentrações de 0,07; 0,11 e 0,21 g  $\text{L}^{-1}$ , analisadas em três dias diferentes. A precisão foi calculada indiretamente, por meio da imprecisão, dada pelo coeficiente de variação (CV%) das áreas relativas obtidas, sendo que este não deve ser superior a 15%.<sup>26-30</sup>

Para o estudo da exatidão, foram determinadas as concentrações dos IBEs presentes em amostras consideradas como referência negativa, analisando-se o pool de amostras de urina obtidas de indivíduos controle negativo nas concentrações de PGA, HA e 3 mHA de 0,03; 0,07 e 0,120 g  $\text{L}^{-1}$  e para o MA nas concentrações de 0,07; 0,11 e 0,21

g  $\text{L}^{-1}$ , em sextuplicata. A inexactidão foi calculada pela tendenciosidade (bias) que não deve ser superior a  $\pm 15\%$ .<sup>27,29,30</sup> Além disso, foi avaliada a recuperação do método, em triplicata. As respectivas médias das concentrações obtidas representaram o valor referencial, ou seja, o valor de concentração que deveria ser teoricamente encontrado. Os resultados de recuperação são satisfatórios dentro dos valores entre 70 e 120%.<sup>27-29</sup>

#### Aplicação

Foram analisadas amostras urinárias de indivíduos não expostos ocupacionalmente, homens (n=30; idade  $30 \pm 7$  anos) como do grupo controle, e de indivíduos ocupacionalmente expostos, homens (n=30; idade  $32 \pm 11$  anos, média  $\pm$  DP). Estes indivíduos eram trabalhadores de uma indústria de pintura automotiva. As amostras foram coletadas após 3 dias de exposição consecutiva e no final da jornada. A creatinina urinária foi quantificada em ambos os grupos.

#### Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS 10.05. O teste *t-Student* foi utilizado para verificar a significância dos dados entre os grupos relativos ao ácido hipúrico. Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo a NR-7, os ácidos hipúrico (HA), metil-hipúrico (mHA), mandélico (MA) e fenilglioixílico (PGA) urinários são considerados indicadores biológicos de exposição ocupacional aos solventes tolueno, xileno, etilbenzeno e estireno. Na Tabela 1 é possível observar os níveis estabelecidos para os índices biológicos máximos permitidos (IBMP) e o valor de referência (VR) para o HA.

**Tabela 1.** Parâmetros da NR-7\* relativos à exposição ocupacional ao tolueno, xileno, estireno e etilbenzeno. Os valores de referência e IBMP estão expressos por g/g de creatinina e o material biológico utilizado foi urina coletada após o final da jornada

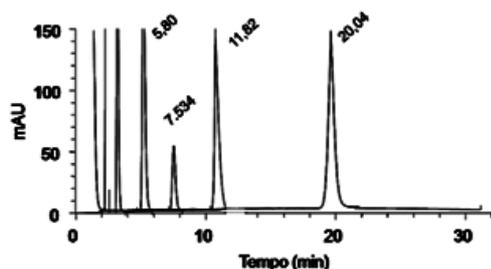
Agente Químico	IBE	VR	IBMP	Método
Tolueno	Ácido Hipúrico	$\leq 1,5$	2,50	CLAE ou CG
Xileno	Ácido Metil-Hipúrico	-	1,50	CLAE ou CG
Estireno	Ácido Mandélico e/ou	-	0,80	CLAE ou CG
	Ácido Fenilglioixílico	-	0,24	CLAE ou CG
Etilbenzeno	Ácido Mandélico	-	1,50	CLAE

\*VR – Valor de referência, IBMP – Índice biológico máximo permitido, CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência, CG – Cromatografia gasosa, (Brasil, NR – 7, 1994)

Os ácidos mHA, PGA e MA são encontrados somente em urina de indivíduos expostos a estes solventes, referentes aos IBMP. No entanto, o ácido hipúrico possui valor de referência (VR), pois indivíduos não expostos ocupacionalmente apresentam este metabólito que é proveniente da alimentação. Estes IBEs devem ser considerados para a correta avaliação da exposição ocupacional a estes solventes.<sup>8</sup>

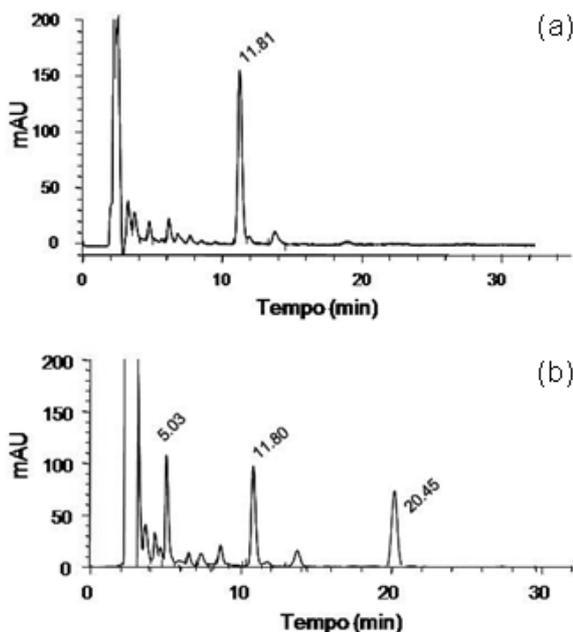
Um cromatograma típico obtido da adição de padrões dos quatro indicadores em urina é mostrado na Figura 2, nas concentrações de 0,03 g  $\text{L}^{-1}$ , em amostra de urina de voluntários não expostos ocupacionalmente a estes solventes. Os picos 1, 2, 3 e 4 são PGA, MA, HA e 3 mHA, respectivamente. Os tempos de retenção ( $t_R$ ) obtidos foram 5,80 min (PGA), 7,53 min (MA), 11,82 min (HA) e 20,40 min (3 mHA).

Além disso, um cromatograma obtido de um indivíduo não exposto (controle) é apresentado na Figura 3A, sendo encontrado



**Figura 2.** Perfil cromatográfico típico da adição de padrões, em amostra urinária, nas concentrações de  $0,03 \text{ g L}^{-1}$ , sendo (1) PGA; (2) MA; (3) HA e (4) 3mHA. Os tempos de retenção foram: 5,80 min (PGA); 7,53 min (MA); 11,82 min (HA) e 20,4 min (3mHA)

somente o HA, com tempo de retenção de 11,81 min. Um cromatograma obtido de indivíduo ocupacionalmente exposto é apresentado na Figura 3B, sendo os tempos de retenção de 5,03 min para PGA, 11,80 min para o HA e 20,45 min para o 3 mHA.



**Figura 3.** Cromatograma típico obtido da amostra urinária. (a) Indivíduo não ocupacionalmente exposto (controle). (b) Indivíduo ocupacionalmente exposto a tintas automotivas (trabalhadores com tempo de exposição superior a 5 anos). Os tempos de retenção foram: 5,03 min (PGA), 11,80 min (HA) e 20,45 min (3mHA)

Através da análise das amostras utilizadas neste trabalho foi verificado que o método não apresentou interferências no tempo de retenção dos compostos em estudo quando comparado aos padrões aquosos.

Os coeficientes de regressão ( $r^2$ ) foram superiores a 0,99, independente do metabólito, dentro da faixa de interesse de  $0,01 - 0,21 \text{ g L}^{-1}$ , sendo, portanto, adequados.<sup>24,28-30</sup> Os resultados das curvas de calibração para cada metabólito estão representados na Tabela 2, que contém as equações das curvas utilizadas para quantificação dos IBE e os respectivos coeficientes.

Os limites de detecção e de quantificação para determinação dos IBE urinários estão apresentados na Tabela 3.

**Tabela 2.** Equações das retas obtidas para cada metabólito, referentes às curvas aquosas ( $n=5$ ) e com adição de padrão na urina ( $n=5$ ), e os respectivos coeficientes de regressão ( $r^2$ )

Analito	Curva aquosa	$r^2$	Curva adição padrão	$r^2$
PGA	$y = 910,82x + 1,8011$	0,9978	$y = 906,59x + 1,6376$	0,9982
MA	$y = 143,4x + 0,3093$	0,9979	$y = 140,25x + 0,1704$	0,9965
HA	$y = 934,79x + 1,6687$	0,9983	$y = 907,42x + 1,8115$	0,9981
3mHA	$y = 980,05x + 0,4618$	0,9991	$y = 963,88x - 0,1006$	0,9992

**Tabela 3.** LD e LQ de cada IBE

Analito	LD $\text{g L}^{-1}$	LQ $\text{g L}^{-1}$
PGA	0,001	0,004
MA	0,009	0,020
HA	0,001	0,003
3mHA	0,003	0,008

A recuperação obtida a partir da fortificação das amostras apresentou valores satisfatórios, ou seja, acima de 96%, e estão demonstrados na Tabela 4. Estes valores se encontram dentro dos valores aceitos, os quais devem estar entre 70 e 120%.<sup>25</sup>

No estudo da especificidade foi observada uma boa separação cromatográfica e a precisão intermediária encontrada apresentou CV < 6%. A otimização e validação desta metodologia foram realizadas através da CLAE com detector UV, devido à sua larga utilização em rotinas laboratoriais.

A precisão intermediária encontrada no método apresentou-se dentro do limite aceito para validação de métodos cromatográficos que deve ser menor que 15%.<sup>26,28-30</sup> A inexatidão foi calculada pela tendenciosidade (% bias) e apresentou valores satisfatórios, ou seja, inferiores a  $\pm 15\%$  (Tabela 4).

A legislação brasileira preconiza para o ácido hipúrico, valor de referência de  $1,5 \text{ g/g}$  creatinina e IBMP de  $2,5 \text{ g/g}$  creatinina. Assim, os valores de ácido hipúrico urinário encontrados nas amostras dos indivíduos não expostos apresentaram um intervalo de  $0,058 - 0,23 \text{ g/g}$  creatinina, todos abaixo do valor de referência considerado seguro para a saúde e bem-estar do indivíduo.<sup>8,16</sup>

Em indivíduos expostos, as concentrações encontradas para cada IBE foram  $1,1 \pm 0,12$  para HA;  $0,14 \pm 0,02$  para o 3 mHA;  $0,26 \pm$

**Tabela 4.** Níveis de concentração ( $\text{g L}^{-1}$ ) e seus respectivos valores de recuperação, % bias e coeficiente de variação (CV%), ( $n = 5$ )

Analito	Concentração	Recuperação (%)	bias %	CV%
PGA	0,03	98,4	3,73	4,30
	0,07	98,8	4,28	1,65
	0,12	99,6	-1,58	0,64
MA	0,07	95,0	6,14	2,76
	0,11	97,9	1,07	1,89
HA	0,21	97,5	-0,95	3,00
	0,03	97,7	0	4,50
	0,07	97,6	4,42	1,29
3mHA	0,12	97,2	-1,68	0,94
	0,03	96,0	2,66	3,87
	0,07	98,1	2,50	2,09
	0,12	97,8	-0,98	3,46

0,03 para o MA e  $0,10 \pm 0,03$  para o PGA. Todos trabalhadores ( $n=30$ ) apresentaram concentração urinária de HA, sendo no mínimo cinco vezes superior ao grupo controle (não expostos), com diferença significativa entre os dois grupos ( $p<0,05$ ).

Destes trabalhadores, 2,5% estavam acima dos valores de referência e apenas 0,6% do total de trabalhadores apresentaram valores acima do IBMP. Foram encontrados PGA em 30%, MA em 26% e mHA em 96% das amostras analisadas, sendo estes valores, todos abaixo do IBMP.

Alguns métodos para determinação destes IBEs em amostras biológicas têm sido relatados na literatura científica, utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE),<sup>9</sup> cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CL/EM),<sup>23</sup> cromatografia em fase gasosa com detector de ionização por chama (CG/DIC),<sup>31</sup> cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM).<sup>22</sup> Porém, a legislação brasileira recomenda a determinação destes IBEs urinários na monitoração biológica por método de cromatografia líquida de alta eficiência, de acordo com a Tabela 1.<sup>8</sup>

O presente método, baseado apenas na diluição e centrifugação da amostra, demonstrou ser um procedimento prático e rápido, em comparação a métodos que utilizam extração em fase sólida (SPE)<sup>23</sup> ou extração líquido-líquido<sup>23</sup> ou, ainda, hidrólise enzimática.<sup>23</sup> Além disso, permitiu a análise de várias amostras diárias e alterou as condições cromatográficas, especialmente a concentração do fosfato que foi reduzida em 50%, já que no método realizado por Laffon *et al.* foi utilizada uma concentração de 50 mM de tampão salino.<sup>10</sup> Sabe-se que concentrações elevadas de sal danificam o sistema cromatográfico e diminuem o tempo de vida útil da coluna cromatográfica. Além disso, a eluição isocrática permitiu uma análise rápida devido à ausência de tempo entre uma análise e outra para recondicionar a coluna. O pH da fase móvel também foi modificado, passando de 2,5 a 3,5 (ajustado com KOH 2M). A maioria das colunas cromatográficas pode ser danificada em pH extremamente baixo.

Além disso, o IBE do xileno quantificado foi o 3-metil-hipúrico urinário. É conhecido que a biotransformação deste xenobiótico gera concentrações mais expressivas do 3mHA comparado ao ácido 2-metil-hipúrico.<sup>4,15</sup>

Quanto ao tempo de análise, considerando quatro metabólitos, o tempo de 22 min é relativamente rápido já que normalmente o trabalhador não está exposto somente a um solvente, sem mencionar o preparo rápido da amostra biológica. Em laboratórios responsáveis pela monitoração biológica de trabalhadores, estas análises não costumam detectar a presença simultânea de metabólitos, necessitando de um tempo maior, além do custo mais alto para fazer cada análise separadamente.

A metodologia analítica proposta demonstrou ser precisa e exata. Valores adequados de sensibilidade e linearidade também foram obtidos para os analitos. No parâmetro de recuperação a técnica empregada apresentou-se satisfatória demonstrando, por meio dos valores encontrados, perda aceitável frente às condições propostas (recuperação > 95% para todos os IBE).

O método aplicado em indivíduos não expostos e expostos ocupacionalmente mostrou-se sensível e reproduzível para quantificar os bioindicadores de exposição a estes solventes, em exposições concomitantes ou não, sendo útil na monitoração biológica realizada periodicamente, garantindo a longo prazo a saúde do trabalhador com custos menores, devido à quantificação simultânea.

## CONCLUSÕES

Os parâmetros de validação avaliados neste trabalho estão de acordo com as recomendações internacionais e com a legislação sani-

tária vigente no país. A linearidade dos quatro indicadores biológicos analisados apresentou um coeficiente de regressão linear ( $r^2$ ) maior que 0,99, precisão com coeficiente de variação menor que os 15% aceitáveis estatisticamente e percentagem de viés também menor que 15%, sendo portanto, linear, preciso e exato.

A etapa de tratamento da amostra é de fácil execução, dispensa uma extensa preparação da amostra, bem como uma etapa de *clean up* para eliminação de interferentes sem a desvantagem da derivatização da amostra. A concentração salina na fase móvel foi diminuída e o seu pH foi aumentado, permitindo o aumento de vida útil da coluna cromatográfica, normalmente crítica em quantificações utilizando amostras biológicas.

A concentração de ácido hipúrico do grupo controle foi inferior aos valores de referência encontrados na literatura. Além disso, o método foi reproduzível e eficaz na determinação destes IBEs em indivíduos expostos, a uma mistura de solventes, demonstrando a importância da determinação simultânea dos metabólitos. Mesmo que os valores dos IBEs estejam dentro dos permitidos, a monitoração torna-se necessária à prevenção de patologias ocupacionais.

Desta forma, a presente metodologia analítica pode ser utilizada seguramente na rotina laboratorial, na monitoração biológica de indivíduos ocupacionalmente expostos aos solventes orgânicos tolueno, xileno, etilbenzeno e estireno, através da quantificação cromatográfica dos seus IBEs urinários, sendo a exposição simultânea ou não.

## AGRADECIMENTOS

Ao auxílio financeiro do CNPq (processo 477740 / 2007-3), à Knauer® pelo suporte do aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência, à CAPES e FAPERGS pelas bolsas de mestrado e de iniciação científica concedidas e ao CNPq pelas bolsas de pesquisadoras concedidas para S. C. Garcia e R. Limberger.

## REFERÊNCIAS

1. Lauwerys, R. R.; *Occupational Toxicology. Casarett and Doull's Toxicology*, 5<sup>th</sup> ed., United States, 1996.
2. Câmara, V. M.; Galvão, L. A. C.; *Patologia do trabalho*, Atheneu: Rio de Janeiro, 1995.
3. Bertocello, I.; *Monografia de especialização em Audiologia Clínica*, Centro de Especialização em Audiologia Clínica: Porto Alegre, 1999.
4. Oga, S.; Camargo, M. M. A.; Batistuzzo, J. A. O.; *Fundamentos de Toxicologia*, 3<sup>a</sup> ed., Ateneu: São Paulo, 2003.
5. McDiarmid, M. A.; Agnew, J.; *Patologia do Trabalho*, Atheneu: Rio de Janeiro, 1995.
6. Johnson, A. C.; Nylén, P. R.; *Occup Med.* **1995**, *10*, 623.
7. Amorim, L. C. A.; *Rev. Bras. Epidemiol.* **2003**, *6*, 158.
8. [http://www.mtb.gov.br/legislacao/normas\\_regulamentadoras/nr\\_07.asp](http://www.mtb.gov.br/legislacao/normas_regulamentadoras/nr_07.asp), acessada em Janeiro 2007.
9. Astier, A.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1992**, *573*, 318.
10. Laffon, B.; Lema, M.; Méndez, J.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2001**, *753*, 385.
11. Gromadzinska, J.; Wasowicz, W.; *Comments on Toxicology* **2003**, *9*, 23.
12. Heinrich-Ramm, R.; Jakubowski, M.; Heinzow, B.; Molin-Christensen, J.; Olsen, E.; Hertel, O.; *Pure Appl. Chem.* **2000**, *72*, 385.
13. Moon, D. H.; Paik, N. W.; Shin, Y.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1997**, *694*, 367.
14. Amorim, L. C. A.; Leite, E. M. A.; *Rev. Bras. Saúde Ocup.* **1999**, *25*, 45.
15. Klaassen, C. D.; Amdur, M. O.; Doull, J.; *Occupational Toxicology. Casarett and Doull's Toxicology*, 6<sup>th</sup> ed., New York: United States, 2001.

16. Siqueira, M. E. P. B.; Paiva, M. J. N.; *Rev. Saúde Pública* **2002**, *36*, 723.
17. Xiao, J. Q.; Levin, S. M.; *Am. J. Ind. Med.* **2000**, *37*, 44.
18. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp53.html>, acessada em Agosto 2006.
19. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp53-c7.pdf>, acessada em Novembro 2006.
20. Degnan-Jr, T. F.; Smith, C. M.; Venkat, C. R.; *Appl. Catal.* **2001**, *221*, 283.
21. Kirk, R. E.; Othmer, R. F.; *Encyclopedia of Chemical Technology*, ed. Wiley: New York, 1984.
22. Ohashi Y.; Mamiya T.; Mitani K.; Wang B.; Takigawa T.; Kira S.; Kataoka H.; *Anal. Chim. Acta* **2006**, *566*, 167.
23. Manini, P.; Andreoli, R.; Niessen, W. M. A.; *J. Chromatogr., A* **2004**, *1058*, 21.
24. Peixe, T. S.; Nascimento, E. S.; Della Rosa, H. V.; *Rev. Bras. Ciênc. Farm.* **2006**, *42*, 279.
25. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 771.
26. ICH Q2B; *Validation of Analytical Procedures: Methodology*, ICH: Geneva, 1996.
27. [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899\\_03re.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm), acessada em Outubro 2005.
28. Causon, R.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1997**, *689*, 175.
29. Chasin, A. A. M.; Nascimento, E. S.; Ribeiro Neto, L. M.; Siqueira, M. E.P. B.; Andraus, M. H.; Salvatori, M. C.; Fernícola, N. A. G.; Gorni, R.; Salcedo, S.; *Rev. Brasil. Toxicol.* **1998**, *11*, 1.
30. Queiroz, S. C. N.; Collins, C. H.; Jardim, I. S. F.; *Quim. Nova* **2001**, *24*, 68.
31. Kongtip, P.; Vararussami, J.; Pruktharathikul, V.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2001**, *751*, 199.