UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Áreas de Toxicologia e Análises Toxicológicas

DETERMINAÇÃO DA 2,5-HEXANODIONA URINÁRIA POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA, COMO INDICADOR BIOLÓGICO DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO N-HEXANO

CLAUDIA REGINA DOS SANTOS

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientadora:
Prof[a]. Dr[a] Miriam Meyer Passarelli

São Paulo
2000

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Santos, Claudia Regina dos
S237d Determinação da 2,5-hexanodiona urinária por cromatografia em fase gasosa, como indicador biológico da exposição ocupacional ao n-hexano / Claudia Regina dos Santos. -- São Paulo, 2000.
125p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.
Orientador : Passarelli, Miriam Meyer

1. Toxicologia ocupacional I. T. II. Passarelli, Miriam Meyer, orientador.

615.902 CDD

CLAUDIA REGINA DOS SANTOS

DETERMINAÇÃO DA 2,5-HEXANODIONA URINÁRIA POR CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA, COMO INDICADOR BIOLÓGICO DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO N-HEXANO

COMISSÃO JULGADORA

DISSERTAÇÃO PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE

_____

Prof[a]. Dr[a] Miriam Meyer Passarelli
Orientadora presidente

_____

Prof[a]. Dr[a] Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira
1º Examinador

_____

Prof. Dr Antônio Cardozo dos Santos
2º Examinador

São Paulo, 04 de setembro de 2000.

Aos meus pais, Pedro e Iracema,
e meus irmãos Fernando e Sandro,

A essa Força Superior que sempre está presente
e nos mantém unidos, apesar da distância que nos separa.

A Prof^{a}. Drª Miriam Meyer Passarelli
pela orientação e dedicação durante todo
o decorrer deste trabalho meu sincero agradecimento

AGRADECIMENTOS

Aos Coordenadores do Curso de Pós-Graduação em Farmácia, área de Toxicologia e Análises Toxicológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, pela oprotunidade;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq- pela concessão de bolsa de estudo;

Aos Professores do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas pelos valiosos ensinamentos;

Aos Professores Elizabete Nascimento, Miriam Salvadori e Henrique Vicente Della Rosa, pelas sugestões no exame de qualificação;

Aos funcionários Dalva, Luzia, Roseli, Helena, Luíza, Márcia pelo auxílio prestado na rotina de trabalho;

Aos colegas da pós-graduação Alessandra, Alexandre, Adriano, Daniela, Fábio, Fernanda, Isarita, Jussara, Maurício, Paulo, Sandra, Sílvia e Saulo, pelo apoio e amizade sempre presentes

À Antônio Menezes pelo apoio técnico que permitiu dados mais completos relativamente a Etapa de Validação do método proposto neste trabalho

À colega de laboratório Liza pelo incentivo, interesse e amizade.

À colega Caroline Heilbrunn e à Luis Antonio Capelli Ronceco, pela contribuição na fase final deste trabalho;

Aos Professores da Universidade Federal de Santa Catarina, Marlene Zannin e Marcos José Machado, pelo apoio e colaboração técnica;

Ao Dr. Rogério, da WorkMed de Tijucas, pela ajuda preciosa que permitiu a coleta das amostras

A alguns familiares e amigos, por existirem e estarem presentes nesta fase da minha vida..

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 01
2. EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO N-HEXANO 05
2.1 Propriedades físico-químicas 05
2.2 Usos e fontes de exposição 06
2.3 Toxicocinética 09
2.3.1 Interações toxicocinéticas 17
2.4 Toxicodinâmica 19
2.5 Toxicidade 25
2.5.1 Toxicidade aguda 25
2.5.2 Toxicidade subaguda 27
2.5.3 Toxicidade crônica 28
2.5.3.1 Efeitos sobre o aparelho respiratório 28
2.5.3.2 Hepatotoxicidade 29
2.5.3.3 Esplenotoxicidade e efeitos sobre as glândulas salivares 30
2.5.3.4 Toxicidade perinatal e sobre o sistema reprodutor 30
2.5.3.5 Neurotoxicidade do n-hexano 32
2.5.3.6 Toxicidade ocular 36
2.5.3.7 Toxicidade sobre o sistema imunológico 36
2.5.3.8 Mutagenicidade 37
2.5.3.9 Potencial carcinógeno 37
2.6 Monitorização biológica 38
2.6.1 Biomarcadores de dose interna e seus aspectos analíticos 39
2.6.2 Biomarcadores de efeito 50
3. OBJETIVOS E PLANO DE TRABALHO 51
3.1 Objetivos 51
3.2 Plano de Trabalho 51

4. MATERIAL E MÉTODO 52
4.1 Casuística 52
4.2 Material..... 58
4.2.1 Reagentes.....58
4.2.2 Soluções padrão..... 59
4.2.3 Equipamentos, acessórios e vidraria..... 59
4.3 Método..... 59
4.3.1 Padronização do método analítico para determinação da 2,5-hexanodiona urinária..... 60
4.3.3.1 Otimização das condições cromatográficas.....61
4.3.3.2. Linearidade do instrumento.....61
4.3.2 Determinação da 2,5-hexanodiona urinária..... 61
4.3.2.1 Determinação de 2,5-hexanodiona, sem e com hidrólise urinária..... 62
4.3.3 Validação do método analítico para determinação da 2,5-hexanodiona urinária..... 64
4.3.3.1 Limite de quantificação..... 64
4.3.3.2 Limite de detecção..... 64
4.3.3.3 Linearidade sem hidrólise da urina..... 64
4.3.3.4 Linearidade com hidrólise 65
4.3.3.5 Curva de calibração..... 65
4.3.3.6 Efeito da matriz sem hidrólise da urina..... 65
4.3.3.7 Efeito da matriz com hidrólise da urina..... 66
4.3.3.8 Estabilidade..... 66
4.3.3.9 Precisão..... 66
4.3.3.10 Recuperação relativa sem hidrólise..... 67
4.3.3.11 Recuperação relativa com hidrólise..... 67
4.3.3.12 Exatidão..... 68
4.3.4 Determinação de 2,5-hexanodiona em urina de trabalhadores..... 68

4.4.4 Análise estatística dos resultados..... 68
5. RESULTADOS..... 69
5.1 Otimização das condições cromatográficas..... 69
5.2 Limite de quantificação..... 69
5.3 Limite de detecção..... 69
5.4 Linearidade sem hidrólise da urina..... 71
5.5 Linearidade com hidrólise da urina..... 71
5.6 Efeito da matriz sem hidrólise..... 72
5.7 Efeito da matriz com hidrólise..... 74
5.8 Estabilidade..... 74
5.9 Precisão..... 77
5.10 Recuperação sem e com hidrólise da urina..... 77
5.11 Exatidão..... 78
5.12 Determinação da 2,5-hexanodiona em urina de trabalhadores expostos e em não expostos ocupacionalmente ao n-hexano em indústrias de calçados..... 78
6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS..... 86
7. CONCLUSÕES.....98
8. ANEXOS
8.1 Anexo 1 – Questionário..... 100
8.2 Anexo 2 – Consentimento Pós Informação.....102
8.3 Anexo 3 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa..... 104
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Propriedades físico-químicas do n-hexano..... 05

Tabela 2- Coeficientes de partição tecido/sangue observados em ratos..... 11

Tabela 3- Toxicidade aguda do n-hexano, da 2-hexanona e da 2,5-hexanodiona..... 26

Tabela 4- Sintomas, achados clínicos, eletrofisiológicos e alterações morfológicas nos nervos periféricos após a exposição ao n-hexano em animais de experimentação e em trabalhadores..... 35

Tabela 5- Condições analíticas utilizadas na determinação de 2,5-hexanodiona urinária por CG-DIC..... 45

Tabela 6- Distribuição dos trabalhadores quanto ao hábito de fumar, hábito de beber, tempo de trabalho e tipo de indústria, na indústria 1 (n=16)..... 54

Tabela 7- Distribuição dos trabalhadores quanto ao hábito de fumar, hábito de beber, tempo de trabalho e tipo de indústria, na indústria 2 (n=04)..... 54

Tabela 8- Distribuição dos trabalhadores quanto ao hábito de fumar, hábito de beber, tempo de trabalho e tipo de indústria, na indústria 3 (n=17)..... 55

Tabela 9- Distribuição dos trabalhadores quanto ao hábito de fumar, hábito de beber, tempo de trabalho e tipo de indústria, na indústria 4 (n=18)..... 56

Tabela 10- Distribuição dos trabalhadores quanto ao hábito de fumar, hábito de beber, tempo de trabalho e tipo de indústria, na indústria 5 (n=6)..... 57

Tabela 11- Distribuição dos trabalhadores quanto ao hábito de fumar, hábito de beber, tempo de trabalho e tipo de indústria, na indústria 6 (n=8)..... 57

Tabela 12- Distribuição dos trabalhadores quanto ao hábito de fumar, hábito de beber, tempo de trabalho e tipo de indústria, na indústria 7 (n=18)..... 58
Tabela 13- Análise da estabilidade da 2,5-hexanodiona (5,0mg/L) à temperatura ambiente, nos tempos 0, 24 e 48 horas..... 74
Tabela 14- Análise da estabilidade da 2,5-hexanodiona (5,0mg/L) em urinas conservadas em geladeira à 4°C..... 75
Tabela 15- Estudo da estabilidade da 2,5-hexanodiona (5,0mg/L) em urinas conservadas em *freezer* à -20°C..... 76
Tabela 16- Estudo da estabilidade da 2,5-hexanodiona (5,0mg/L) em urinas mantidas em *freezer* à -20°C, após 2 e 3 ciclos congelamento/descongelamento..... 76
Tabela 17- Precisão do método analítico para determinação de 2,5-hexanodiona urinária, expressa em função dos coeficientes de variação..... 77
Tabela 18- Recuperação de 2,5-hexanodiona adicionada ao *pool* de urina, sem e com hidrólise, nas concentrações de 1,0; 5,0 e 10mg/L... 78
Tabela 19- Valores de 2,5HD em urinas de trabalhadores expostos ao n-hexano (sem e com hidrólise das amostras) expresso em mg/L e em mg de 2,5HD/g de creatinina na Indústria 1..... 81
Tabela 20- Valores de 2,5HD em urinas de trabalhadores expostos ao n-hexano (sem e com hidrólise das amostras) expresso em mg/L e em mg de 2,5HD/g de creatinina na Indústria 2..... 82
Tabela 21- Valores de 2,5HD em urinas de trabalhadores expostos ao n-hexano (sem e com hidrólise das amostras) expresso em mg/L e em mg de 2,5HD/g de creatinina na Indústria 3..... 82

Tabela 22- Valores de 2,5HD em urinas de trabalhadores expostos ao n-hexano (sem e com hidrólise das amostras) expresso em mg/L e em mg de 2,5HD/g de creatinina na Indústria 4..... 83
Tabela 23- Valores de 2,5HD em urinas de trabalhadores expostos ao n-hexano (sem e com hidrólise das amostras) expresso em mg/L e em mg de 2,5HD/g de creatinina na Indústria 5..... 84
Tabela 24- Valores de 2,5HD em urinas de trabalhadores expostos ao n-hexano (sem e com hidrólise das amostras) expresso em mg/L e em mg de 2,5HD/g de creatinina na Indústria 6..... 84
Tabela 25- Valores de 2,5HD em urinas de trabalhadores expostos ao n-hexano (sem e com hidrólise das amostras) expresso em mg/L e em mg de 2,5HD/g de creatinina na Indústria 7..... 85
Tabela 26- Estudo estatístico da comparação dos métodos, sem e com hidrólise da urina para determinação da 2,5-hexanodiona urinária (mg/L)..... 85
Tabela 27- Análise descritiva e porcentagem dos sintomas relatados pelos trabalhadores envolvidos no estudo..... 96

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição dos solventes que contém n-hexano, no Brasil entre os anos de 1987-1991 07

Figura 2- Consumo de n-hexano, no Brasil, por segmento industrial em 1988 08

Figura 3- Biotransformação do n-hexano em mamíferos 13

Figura 4- Biotransformação do n-hexano, 2-hexanona e 2,5-hexanodiona em ratos 14

Figura 5 Marcha analítica usada na determinação da 2,5-hexanodiona sem hidrólise urinária 63

Figura 6- Marcha analítica usada na determinação da 2,5-hexanodiona com hidrólise urinária 63

Figura 7- Perfil cromatográfico da 2,5-hexanodiona em urina e padrão interno (ciclohexanona) 70

Figura 8- Curva de linearidade de 2,5-hexanodiona em urina 71

Figura 9- Curva de linearidade de 2,5-hexanodiona, com hidrólise da urina 72

Figura 10- Curva que representa o resultado da interferência da matriz biológica sem hidrólise, na análise de 2,5-hexanodiona 73

Figura 11- Curva que representa o resultado da interferência da matriz biológica com hidrólise, na análise de 2,5-hexanodiona 74

Figura 12- Perfil cromatográfico da determinação da 2,5-hexanodiona em urina de trabalhador exposto ao n-hexano. 79

Figura 13- Perfil cromatográfico da determinação da 2,5-hexanodiona em urina de trabalhador não exposto ao n-hexano (grupo controle). 80

SUMMARY

N-hexane is a solvent used in industries, and can cause peripheral neuropathy. The bioindicator in the biological monitoring of workers exposed to n-hexane is the 2,5-hexanedione (2,5HD). This study was developed in order to validate a method for 2,5HD analysis in urine by gas chromatography with flame ionization detector considering two types of sample preparing with and without acid hydrolysis. The chosen technique was performed with HP1 column measured 15m by 530μm inner bore. Helio was used as the carrier gas at a flow rate of 4,2mL/min. The detection and quantification limits were respectively 0,05 and 0,1mg/L. A linear relationship (r = 0,999) was observed in the range from 0,1-20mg/mL. The average recovery was 98-102%, with precision and accuracy. To apply this method, 87 samples from shoe factory workers were analyzed (52 exposed group and 35 control group). The samples with acid hydrolysis show levels ten times higher than samples without acid hydrolysis. This difference was statistically significant (p<0,0001), but this levels weren't higher than the Biological Exposure Index (BEI) were recommended value is 5mg/g creatinine, in any of the analyzed samples. These results reveal that the validated method has application for biological monitoring, and the samples with acid hydrolysis showed rates higher than the samples without hydrolysis.

RESUMO

O n-hexano é um solvente usado industrialmente, e pode causar neuropatia periférica. O indicador biológico da exposição ocupacional ao n-hexano é a 2,5-hexanodiona (2,5HD). O objetivo deste estudo foi validar um método para determinação da 2,5HD urinária por cromatografia em fase gasosa, com detetor de ionização de chama. A validação do método levou em consideração dois tipos de tratamento da amostra, com hidrólise ácida e sem hidrólise ácida. Foi utilizada coluna HP1 (15m x 530μm e espessura do filme 1,5μm), gás de arraste He:4,2mL/min.e ciclohexanona como padrão interno. O método apresentou limites de detecção e quantificação, respectivamente 0,05 e 0,1mg/L, linearidade de 0,1-20mg/mL, r = 0,999, recuperação entre 98-102%, com precisão e exatidão. Para verificar a aplicação do método foram analisadas 87 amostras de trabalhadores de indústrias de calçados (52 do grupo exposto e 35 do grupo controle),. As amostras com hidrólise apresentaram níveis de 2,5HD cerca de dez vezes maiores quando comparados com as amostras sem hidrólise, esta diferença foi estatisticamente significante ($p<0,0001$), mas os níveis de 2,5HD não ultrapassaram o Índice Biológico Máximo Permitido (IBMP) de 5mg/g de creatinina, em nenhuma das amostras analisadas. Os resultados indicam que o método validado mostrou aplicação prática para monitorização biológica, e as amostras que passaram pelo tratamento de hidrólise ácida apresentaram maiores níveis de detecção.

1. INTRODUÇÃO

Solventes hexacarbônicos alifáticos de cadeia normal constituem um grupo de substâncias químicas com amplo uso industrial, que reconhecidamente causam uma condição de neurotoxicidade periférica, axonopatia central-periférica distal ou polineuropatia (NOMEIR & ABOU-DONIA, 1985).

O n-hexano é um importante constituinte do petróleo, sendo utilizado como solvente orgânico em polidores, tintas, colas, na extração de óleo vegetal, na laminação de polietileno e polipropileno, como diluente na produção de plásticos e borrachas, na produção de pneumáticos, na indústria farmacêutica e de cosméticos e ainda na composição da gasolina, em tinturarias, no processo de fabricação de tecidos, em impressoras e gráficas (SANAGI *et al.* 1980; JORGENSEN & COHR, 1981).

Dificilmente o n-hexano é usado puro. Há muitas misturas comercialmente disponíveis conhecidas como "hexano comercial", "hexano técnico", benzina, éter de petróleo, ligroína, etc...Estas são obtidas a partir da fração do petróleo, de substâncias com ponto de ebulição entre 40°C e 90°C, constituída por hidrocarbonetos de 5 a 7 átomos de carbono, tanto lineares como ramificados ou cíclicos, e cuja composição varia de acordo com o processo de obtenção utilizado (CARVALHO, 1993; OSHA, 1999).

O n-hexano tem sido usado mundialmente em larga escala, principalmente após a proibição do uso do benzeno como solvente. No Brasil, esta proibição deu-se por meio da portaria n°03, de 1982, sendo o n-hexano um dos substitutos indicados, já que possui propriedades de solvência muito parecidas com as do benzeno, sendo que no Brasil seus preços se equivalem (SILVA *et al.* 1991).

Por um longo período, o n-hexano foi uma substância que não era conhecida como muito nociva ao homem (SANAGI *et al.* 1980). Porém, em 1964, no Japão, a neurotoxicidade do n-hexano foi inicialmente relatada em trabalhadores. Logo após, problemas semelhantes apareceram na Itália, no Marrocos, na França e Estados Unidos da América, quando os indivíduos ficavam expostos durante meses, trabalhando diariamente, a níveis de n-hexano no ar superiores a 500ppm (GRAHAM *et al.* 1995). Sabe-se que o n-hexano é o representante mais tóxico dentre os solventes alifáticos da classe dos alcanos (QUE HEE, 1993). Apesar da maioria dos trabalhos relatarem que o desenvolvimento da polineuropatia ocorre quando as concentrações ambientais são maiores que 100ppm, há relatos que descrevem o aparecimento de sintomas em exposições abaixo deste valor. Nestes estudos, a via dérmica é considerada como segunda forma potencial de absorção, diferentemente de outros que consideram somente a inalatória como via principal de absorção (SANAGI *et al.* 1980).

Os principais sintomas, que caracterizam o quadro de neuropatia periférica, são alterações sensoriais simétricas nas mãos e nos pés, evoluindo para parestesia muscular distal e perdas dos reflexos tendinosos profundos. Os primeiros sintomas aparecem meses ou anos após a exposição e, estando a neuropatia periférica instalada, é observada a progressão dos sintomas até quatro meses após cessada a exposição. A recuperação é lenta e dependendo da extensão da lesão, os sintomas demoram de meses a anos para desaparecerem (JORGENSEN & COHR, 1981; SIMONSEN *et al.* 1994).

O aumento do uso de n-hexano, está intimamente relacionado com o aumento na incidência das polineuropatias em trabalhadores, desta forma a neuropatia periférica tornou-se uma doença profissional que aumentou em quase todos os países produtores de calçados (SILVA *et al.* 1991).

O Brasil, nos últimos tempos, entrou no grupo de países que possuem grande número de fábricas de calçados e tornou-se um país exportador, devido à alta qualidade alcançada pelos seus produtos, alinhando-se assim, com países produtores de grande tradição como França, Itália, e mais recentemente o Japão, no que se refere a calçados de materiais sintéticos. É de se supor, então, que este tipo de neuropatia esteja aumentando também no Brasil, por ser o n-hexano largamente usado tanto nas colas, como na limpeza do produto acabado (OLLE, 1986).

Com o objetivo de evitar danos à saúde do trabalhador, oriundos da exposição ocupacional, um programa preventivo deve ser desenvolvido nas empresas que utilizam o n-hexano, ou produtos que contenham n-hexano na sua formulação. Para que isso se efetive é necessário uma análise detalhada do processo de produção e suas operações, além da análise das atividades executadas pelos trabalhadores, de modo a identificar as situações de maior potencial de exposição.

A monitorização ambiental consiste na medida sistemática de avaliação do risco à saúde por meio da identificação e quantificação dos agentes químicos no ambiente de trabalho, de modo a permitir uma série histórica de dados de exposição de um grupo de trabalhadores ou indivíduos isolados. A *American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH)*, recomenda para o n-hexano, um limite no ar do ambiente de trabalho, "*Threshold Limit Value - Time Weighted Average*" (TLV-TWA) de 50ppm, para 8 horas diárias de trabalho, 5 dias por semana, ou seja, 40 horas semanais (ACGIH, 1998).

A avaliação da exposição ocupacional realizando análise de material biológico do próprio trabalhador é chamada de monitorização biológica. Vários estudos buscam verificar a correlação entre a exposição ao n-hexano e o melhor indicador biológico. Após avaliar o n-hexano no sangue e no ar exalado e seus metabólitos urinários, observa-se que a 2,5-hexanodiona

(2,5HD) urinária, é um indicador bastante adequado na aplicação da monitorização biológica da exposição ao n-hexano. Acredita-se que esta γ-dicetona esteja relacionada com o desenvolvimento da neuropatia periférica, além disso trata-se do metabólito excretado em maior concentração. (VEULEMANS *et al.* 1982; AHONEN & SCHIMBERG, 1988; KAWAI *et al.* 1990; KAWAI *et al.* 1992a; KAWAI *et al.* 1992b; MUTTI 1993; CARDONA *et al.* 1993; PERIAGO *et al.* 1993; VAN ENGELEN *et al.* 1995; SORIANO *et al.* 1996).

De acordo com a Norma Regulamentadora NR – 7, do Ministério do Trabalho – Brasil, o Índice Biológico Máximo Permitido (IBMP) para 2,5HD na urina é 5mg/g de creatinina (BRASIL, 1994).

Frente ao exposto, o objetivo do presente trabalho foi, padronizar e validar um método cromatográfico para determinação da 2,5-hexanodiona urinária, comparando as técnicas com e sem hidrólise ácida da urina, visando a utilização deste método na monitorização biológica para exposição ocupacional ao n-hexano.

2. EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO N-HEXANO

2.1 Propriedades Físico-Químicas

Conhecer as propriedades físico-químicas de um composto é importante para o delineamento dos fatores que condicionam a disponibilidade química e biológica da substância.

O n-hexano é um hidrocarboneto alifático de cadeia normal, isolado a partir de gás natural e óleo cru, por destilação fracionada. É altamente inflamável e forma misturas explosivas com o ar, além disso pode reagir vigorosamente com materiais oxidados como o tetróxido de dinitrogênio (COURI & MILKS, 1982; WALSH *et al.* 1992).

As principais propriedades físico-químicas do n-hexano, podem ser observadas na Tabela 1(JORGENSEN & COHR, 1981; COURI & MILKS, 1982; WALSH *et al.* 1992; WHO IPCS n°59, 1991; WHO IPCS n° 122, 1991).

Tabela 1: Propriedades físico-químicas do n-hexano.

Fórmula química	C_6H_{14}
Peso molecular	86,18
Ponto de ebulição	69°C
Ponto de fusão	-95,6°C
Pressão de vapor (25°C)	149mmHg
Densidade (20°C)	0,66
Insolúvel em água	
Solúvel em solventes orgânicos	

O solvente puro contém aproximadamente 0,0005% de material não volátil em sua composição, enquanto que o n-hexano comercial pode conter mais que 0,04%. O fator de conversão de ppm para mg/m^3 é o seguinte: (IPCS WHO n°59, 1991).

$$1 \text{ppm de n-hexano no ar} = 3{,}52 \text{mg/m}^3$$
$$1 \text{mg/m}^3 = 0{,}284 \text{ppm de n-hexano no ar}$$

2.2 Usos e fontes de exposição

Devido a excelente capacidade solvente do n-hexano, o seu uso industrial é bastante amplo.

Dentre seus usos e fontes de exposição são destacados (JORGENSEN & COHR, 1981; WALSH *et al.* 1992; WHO IPCS n°59, 1991; WHO IPCS n° 122, 1991, CARVALHO, 1993; QUE HEE, 1993):

- A produção de alimentos, incluindo a extração de óleos vegetais de soja, linhaça, amendoim, milho, e grãos em geral;
- Como solvente na indústria de polidores, tintas e diluentes;
- Como solvente na polimerização da borracha;
- Como solvente de colas para indústria de calçados;
- Em termômetros de baixas temperaturas;
- Na manufatura de produtos farmacêuticos e cosméticos;
- Na laminação de polietileno e polipropileno;
- Como agente químico laboratorial;
- Na composição da gasolina, cerca de 1,5%;
- Em tinturarias e no processo de fabricação de tecidos em indústrias têxteis;
-Em impressoras e gráficas.

O n-hexano puro é raramente usado. É mais comum ocorrer a mistura de hidrocarbonetos alifáticos, isômeros do n-hexano (2-metilpentano; 3-metilpentano; 2,3-dimetilbutano), com frações de ciclopentano, pentano e isômeros de heptano e outros solventes como o tolueno. Dependendo do uso industrial, a composição do n-hexano comercial varia, podendo conter de 20-80% de n-hexano (TAKEUCHI *et al.* 1980; JORGENSEN & COHR, 1981; WHO IPCS n° 122, 1991; CARVALHO, 1993).

A distribuição dos solventes que contém n-hexano no Brasil entre os anos de 1987-1989 pode ser observada na Figura 1 (SILVA *et al.* 1991).

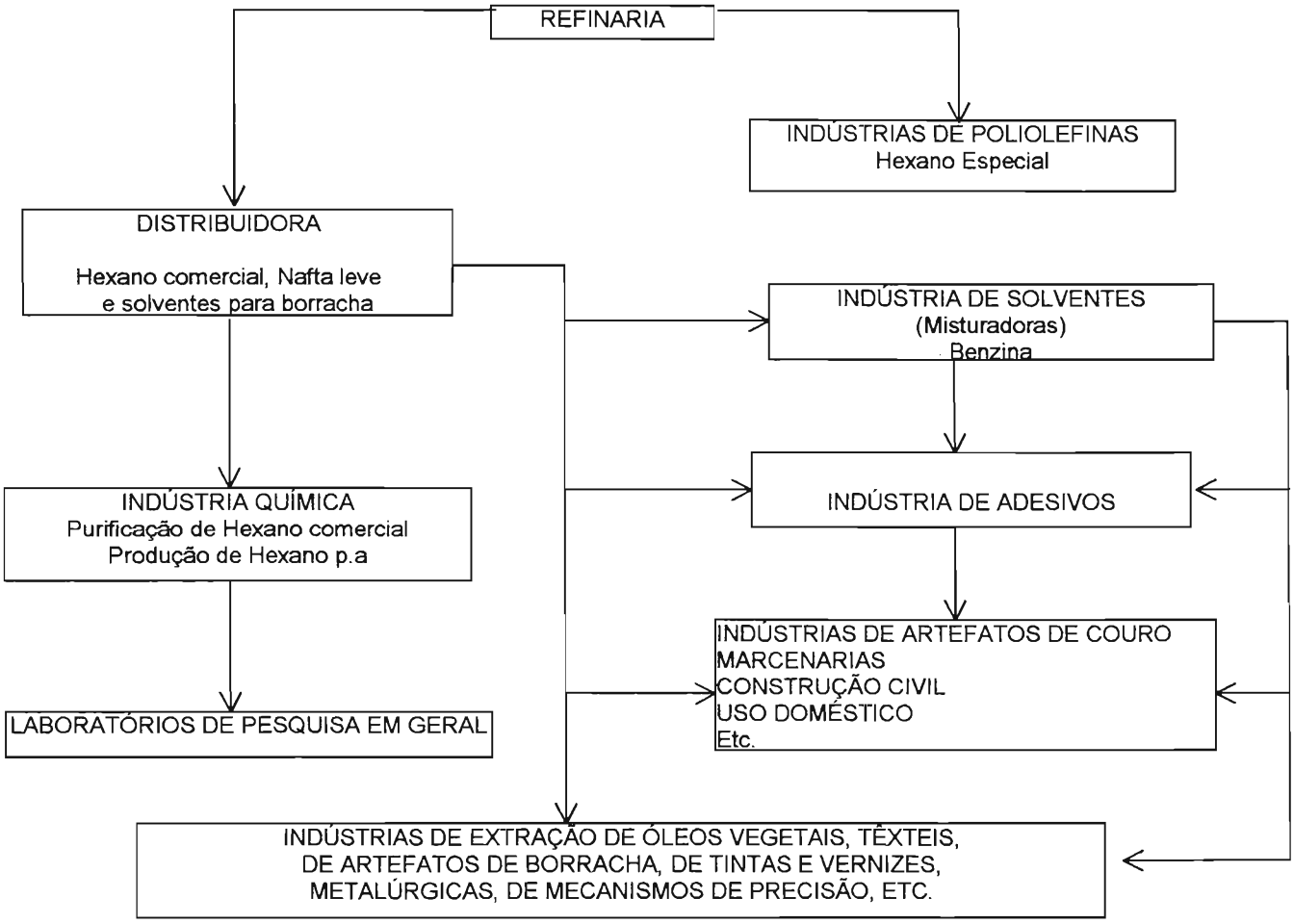

Figura 1 : Distribuição dos solventes que contém n-hexano no Brasil entre os anos de 1987-1989 (SILVA *et al.* 1991).

Na Figura 2, pode-se observar o consumo de hexano em 1988, pelo segmento industrial. Percebe-se que 60% foi utilizado pelas indústrias de extração óleo vegetal, 16% pelas indústrias de colas, 14% pelas indústrias de poliolefinas e o restante por outros segmentos industriais (SILVA *et al.* 1991).

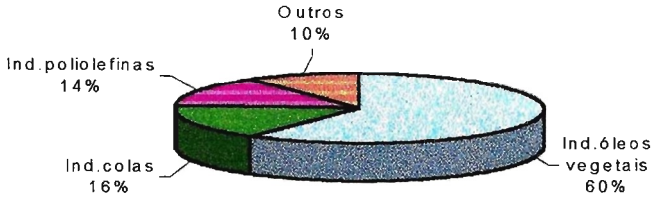

Figura 2: Consumo de n-hexano, no Brasil, por segmento industrial em 1988 (SILVA *et al.* 1991).

Em virtude da grande utilização, estima-se que grande número de trabalhadores estejam em contato com o n-hexano, algo em torno de 2,5 milhões de trabalhadores potencialmente expostos (COURI & MILKS, 1982).

O consumo de n-hexano comercial nos Estados Unidos da América e Canadá durante 1975, com diferentes propósitos, foi estimado entre 450.000 a 490.000m^3 (120-130 milhões de galões[11]), na Comunidade Econômica Européia (E.E.C.) em 1979, o consumo foi de 10.000 toneladas (WHO IPCS n°122, 1991). No Brasil a produção de n-hexano puro, no ano de 1987, foi de 60.000m^3 (SILVA *et al.* 1991).

Apesar da maior parte do n-hexano produzido no Brasil ser destinado às indústrias de extração de óleo conforme mostra a Figura 2, do ponto de vista ocupacional, a exposição mais importante ocorre entre trabalhadores que manipulam colas que contém n-hexano. Primeiro, por estas indústrias envolverem, em seu processo, grande número de trabalhadores que ficam expostos ao n-hexano, além disso, é de relevante importância esclarecer

[1] 1- Um galão corresponde a aproximadamente 3,8 litros

que os processos, nas indústrias de extração de óleos e poleolefinas, são em sua maioria enclausurados, diminuindo assim o contato do trabalhador com n-hexano. Acredita-se que o número de trabalhadores potencialmente expostos a solventes de colas, possa ser estimado em cerca de 500.000, considerando apenas os que trabalham com vínculo empregatício no Brasil (SILVA *et al.* 1991).

Em um estudo realizado pela FUNDACENTRO-SP, foi definido o perfil da fração volátil de colas utilizadas para diversos fins no Brasil, principalmente daquelas empregadas na fabricação de artefatos de couro. Das 83 marcas analisadas, o n-hexano foi um dos principais constituintes, aparecendo em 61% das amostras analisadas (SILVA *et al.* 1991).

2.3 Toxicocinética

O n-hexano pode ser absorvido pelas vias inalatória, percutânea e digestiva. Porém, devido a elevada pressão de vapor, a via de maior importância no ambiente ocupacional é a respiratória, sendo que entre 5-33% do n-hexano inalado é absorvido pelos pulmões (QUE HEE, 1993).

Estudos em ratos tem mostrado que a absorção percutânea do n-hexano é baixa, cerca de 0,012nmol/cm^2/min., entretanto, quando não há a devida proteção, a absorção por ambas as vias, cutânea e respiratória, pode levar ao aparecimento de efeitos tóxicos (AHONEN & SCHIMBERG, 1988).

Conforme observado por CARDONA *et al.* (1996), os níveis de 2,5 hexanodiona (2,5HD), metabólito urinário do n-hexano, aumentam em trabalhadores que não utilizam luvas, quando comparados com trabalhadores que usam luvas dentro da mesma indústria, ou seja sob a mesma exposição ambiental. Desta forma, fica claro que a via cutânea

permite a absorção, mesmo que em menor quantidade.

Sabe-se que após a injeção intraperitoneal de 132mg de n-hexano em cobaias, o pico sanguíneo foi atingido em 30min., evidenciando rápida absorção do solvente quando aplicado por esta via (COURI *et al.* 1978).

De acordo com PERBELLINI *et al.* (1986a), a absorção total (Q) pode ser calculada através da seguinte fórmula:

$$Q = Ci \times R \times VA \times t/kg$$

Onde: Ci = concentração ambiental
R = retenção alveolar
VA = ventilação alveolar
t = tempo de exposição em minutos
kg = peso corporal do indivíduo

O equilíbrio entre a concentração no ar exalado e no sangue é lentamente alcançado e varia em função dos níveis de exposição. Aproximadamente 28% do solvente é absorvido pelos pulmões, alcançando o equilíbrio após duas horas de exposição (NOMIYAMA & NOMIYAMA, 1974). Um estudo realizado em ratos, mostra que após uma exposição ao n-hexano nas concentrações de 170mg/m^3, o equilíbrio (sangue/ar exalado), é atingido após 4-5horas (JORGENSEN & COHR, 1981).

Após a absorção o n-hexano distribui-se para tecidos ricos em lipídios, principalmente para o Sistema Nervoso Central (SNC). O coeficiente de distribuição do n-hexano é aproximadamente 0,8-1,0, entre o sangue e o ar a temperatura ambiente (JORGENSEN & COHR, 1981).

A solubilidade do n-hexano em água é limitada, desta forma é necessário a ligação deste com lipoproteínas plasmáticas para que alcance órgãos e tecidos. O sangue é capaz de reter cerca de 25mg de n-hexano por

grama de lipídio (JORGENSEN & COHR, 1981).

Os principais sitios de acúmulo do n-hexano são: o cérebro, as adrenais, os rins e o fígado. No fígado para que ocorra a saturação, há relatos de que sejam necessárias mais de 10h de exposição, isso se deve a capacidade de acúmulo adicional de lipídios (triglicerídeos) que o órgão possui, mesmo após cessada a exposição (COURI & MILKS, 1982). A Tabela 2 traz os coeficientes de partição tecido/sangue observados em ratos (JORGENSEN & COHR, 1981).

Tabela 2 - Coeficientes de partição tecido/sangue observados em ratos

Orgão	Coeficiente de partição tecido/sangue
Glândulas Adrenais	3,27
Cérebro	2,60
Rins	1,33
Fígado	0,93

A meia-vida de armazenamento nos tecidos ricos em lipídios é de aproximadamente 60h, sendo que a exposição ocupacional diária favorece o acúmulo de n-hexano nestes tecidos (PERBELLINI *et al.* 1990a).

Devido a elevada lipossolubilidade, o n-hexano em mamíferos, pode atravessar a barreira placentária e assim atingir tecidos fetais (WHO IPCS n° 59, 1991).

A biotransformação do n-hexano tem sido investigada principalmente com frações microssomais do sistema das monooxigenases do complexo citocromo P450 (cit P450), e das álcool-desidrogenases, de fígado animal. No entanto, sabe-se que esta pode ocorrer em outros tecidos como a musculatura esquelética, o cérebro e os pulmões. Nestes locais, estas

reações ocorrem por ação das diferentes isoformas do cit P450, a 2E1 e a 2B1/2 (TOFTGARD *et al.* 1986; CROSBIE *et al.* 1997a).

Sabe-se que a hidroxilação do n-hexano aos três primeiros álcoois, 1-, 2- e 3-hexanol, é mediada pelo cit P450 e a próxima oxidação é iniciada por enzimas álcool desidrogenases citosólicas. Estudos em ratos evidenciam que na musculatura esquelética há baixos níveis de cit P450 ativos e estes são realmente capazes de oxidar n-hexano a 1-, 2- e 3-hexanol, mas não à 2,5-hexanodiona; supõem-se então que, devido a existência de altos níveis de 2-hexanol (precursor do metabólito tóxico, a 2,5-hexanodiona), os órgãos alvo adquirem poder de metabolização e acabam produzindo 2,5-hexanodiona como intermediário. Talvez esta seja a razão pelo desenvolvimento da patologia neuronal e muscular, característica da toxicidade do n-hexano (CROSBIE *et al.* 1997b).

O processo de biotransformação sumarizado nas Figuras 3 e 4, envolve a formação de uma série de metabólitos, que incluem o 1-hexanol; 2-hexanol; 3-hexanol; 5-hidróxi-2-hexanona; 2,5-dimetilfurano, γ-valerolactona, 2,5-hexanodiona, etc...(COURI & MILKS, 1982; PERBELLINI *et al.* 1982a).

Basicamente ocorre inicialmente a oxidação do n-hexano a 2-hexanol, que por sua vez pode ser oxidado a ambos, metil-n-butilcetona ou 2,5-hexanodiol, que eventualmente produzirão 5-hidróxi-2-hexanona. A reação final pode seguir três vias: na primeira sofrendo enolização, oxidação e ciclização produzindo o 2,5-dimetilfurano; na segunda, oxidação a 2,5-hexanodiona e na terceira, α-oxidação, descarboxilação e oxidação ao ácido 4-hidroxipentanóico, o qual pode sofrer uma lactonização e originar a γ-valerolactona (QUE HEE, 1993).

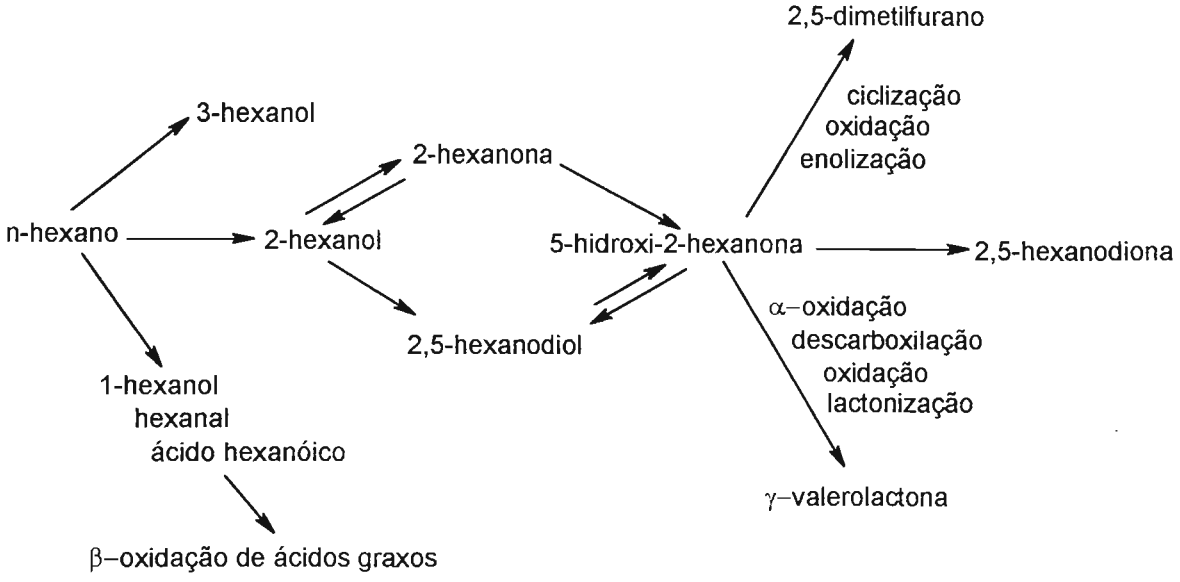

Figura 3: Biotransformação do n-hexano em mamíferos (PERBELLINI *et al.*, 1982a).

É importante observar que no metabolismo do n-hexano as reações de oxidação ocorrem principalmente através de hidroxilações. Da mesma forma, ocorrem reações de oxidação para formar álcoois. Tais produtos de hidroxilação são preferencialmente eliminados na urina, em forma de θ-sulfatos e θ-glicuronídeos, podendo ainda entrar no metabolismo intermediário para serem eliminados como CO_2 ou incorporados aos tecidos (COURI & MILKS, 1982; PERBELLINI *et al.* 1982a).

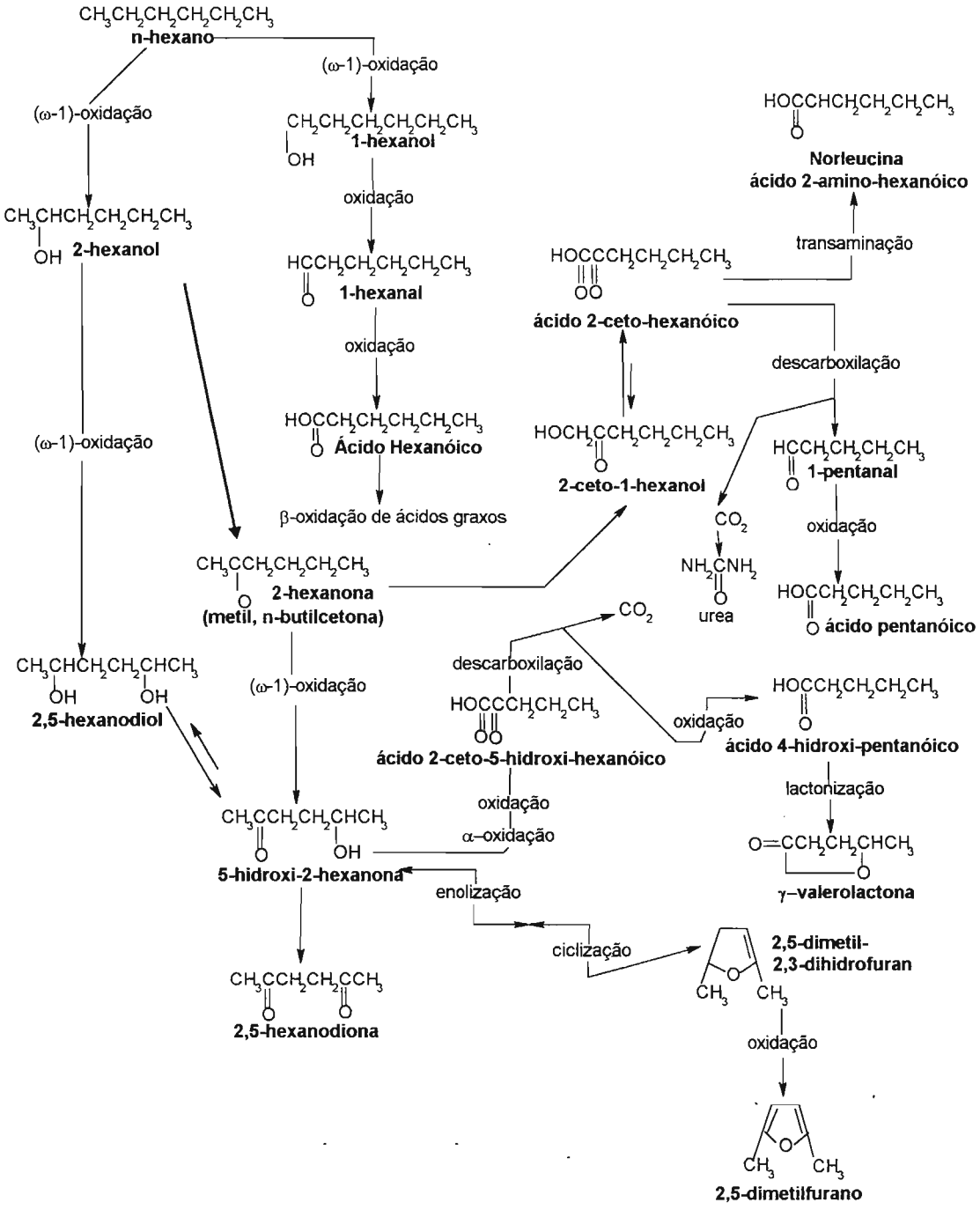

Figura 4: Biotransformação do n-hexano, 2-hexanona e 2,5-hexanodiona em ratos (COURI & MILKS, 1982).

A comparação da formação dos metabólitos em ratos, coelhos e macacos, tem mostrado que, para as três espécies ocorre a hidroxilação nas posições 2 e 3, o que difere é a proporção dos álcoois que são formados

entre as espécies. As elevadas concentrações de 2,5-hexanodiona(2,5HD), γ-valerolactona(γ-VL) e 2,5-dimetilfurano(2,5DMF), presentes na urina de ratos, se comparadas com as baixas quantias de 2,5HD e ausência de γ-VL e 2,5DMF em coelhos e macacos, sugerem que a biotransformação do n-hexano a 2-hexanol, precursor destes três metabólitos, é mais ativa em ratos que em coelhos e macacos (PERBELLINI *et al.* 1982a). FILSER *et al.* (1987), realizaram um estudo de avaliação da cinética do n-hexano em ratos e em humanos, os dados dos experimentos sugerem que, apesar da cinética fornecer valores diferentes para as duas espécies, os valores obtidos do estudo com ratos podem até ser extrapolados para humanos, considerando que os parâmetros fisiológicos são determinantes na avaliação da cinética de xenobióticos.

O n-hexano pode ser excretado inalterado no ar exalado e, seus metabólitos, no ar exalado e na urina (WHO IPCS n°59, 1991).

A concentração de n-hexano no ar expirado, 10 minutos após cessada a exposição, é 2-5% da concentração de equilíbrio durante a exposição. Nas primeiras 4h, cessada a exposição, cerca de 50-60% da quantia retida é eliminada pelos pulmões (JORGENSEN & COHR, 1981). Sabe-se que a excreção pelo ar exalado varia em função das oscilações de concentrações presentes no ambiente. Como normalmente o local de trabalho, apresenta momentos de concentrações mais elevadas e outros menos elevadas, para que este modelo de excreção reflita a exposição total, um protocolo muito bem definido deve ser conduzido com cautela, principalmente pelo fato do tempo de meia vida do n-hexano no ar exalado ser relativamente curto (MUTTI *et al.* 1984).

A cinética do n-hexano e por consequência a excreção de metabólitos na urina, também variam em função da exposição, devido a possível saturação dos sítios enzimáticos responsáveis pela biotransformação, além do acúmulo que pode ocorrer nos tecidos ricos em lipídios. Desta forma, em

um mesmo ambiente, o biotipo dos trabalhadores certamente será um fator de variabilidade interindividual. Deve ser levado em consideração que a excreção completa dos tecidos ricos em lipídios, necessita mais de dez dias na ausência de exposição (PERBELLINI *et al.* 1986a).

Os metabólitos do n-hexano, que são excretados pela urina, atingem o máximo de excreção, muitas horas após cessada a exposição (PERBELLINI *et al.,* 1982a). Sendo assim, estudos foram realizados em indústrias que utilizavam n-hexano, com o objetivo de determinar as porcentagens de metabólitos excretados na urina. As urinas coletadas no final da jornada de trabalho apresentaram os seguintes metabólitos: 2-hexanol 1,7%; 2,5-hexanodiona 39%; 2,5-dimetilfurano 31% e γ-valerolactona 28,3% (PERBELLINI *et al.* 1981a; PERBELLINI *et al.* 1981b).

A 2,5HD é o metabólito em maior proporção. Sabe-se que a 2,5HD existe no organismo humano, na forma livre e na forma conjugada, sendo esta segunda representada principalmente pela 4,5-dihidróxi-2-hexanona. A fração lipofílica, 2,5HD livre, presente na urina, pode retornar ao sangue devido a vascularização capilar renal. Já a fração conjugada e solúvel, que não pode retornar ao sangue, uma vez filtrada pelos rins, fornece concentrações urinárias maiores se comparada com a 2,5HD livre (PERBELLINI *et al.* 1993; VAN ENGELEN *et al.* 1995; SORIANO *et al.* 1996)

Estudos que determinam a correlação entre a determinação da 2,5HD urinária com as concentrações de n-hexano no ambiente, mostram relação linear, sendo este metabólito considerado um bom indicador biológico para a exposição ao n-hexano. No entanto permanece a questão sobre qual a melhor forma para interpretar a análise, se determinando somente a fração livre ou a 2,5HD total (livre e conjugada) (AHONEN & SCHIMBERG; 1988; QUE HEE, 1993; PERBELLINI *et al.* 1993; VAN ENGELEN *et al.* 1995; SORIANO *et al.* 1996; PERBELLINI *et al.* 1998).

2.3.1 Interações toxicocinéticas

Vários são os fatores que podem interferir na toxicocinética do n-hexano.

O n-hexano, assim como outros xenobióticos, é biotransformado por isoenzimas do complexo cit P450, mais especificamente pelas frações 2E1 e 2B1/2. O Fenobarbital induz a isoforma 2B1/2, deste modo espera-se que os níveis de metabólitos formados aumentem consideravelmente. Sendo assim, indivíduos em contato com o n-hexano e que fazem uso de fenobarbital, provavelmente apresentarão níveis aumentados dos metabólitos neurotóxicos, principalmente 2,5HD, aumentando assim a toxicidade do n-hexano (COURI *et al.* 1978; TOFTGARD *et al.* 1986; NAKAJIMA *et al.* 1995).

Além disso, sabe-se que os solventes orgânicos são causadores de inibição competitiva da fração 2E1, desta forma em função da frequência da exposição, a metabolização do n-hexano pode ser afetada. Estas situações são relevantes quando pessoas que manuseiam o n-hexano, estão em contato com substâncias metabolizadas pelo complexo do cit P450 e que portanto podem induzir ou inibir as reações de biotransformação (CROSBIE *et al.* 1997a).

Outra questão importante é que, dentro do ambiente de trabalho a exposição nunca é somente ao n-hexano puro, mas a uma grande variedade de solventes que podem atuar sinergicamente ou antagonicamente à ação tóxica do n-hexano.

Vários trabalhos mostram que, na exposição simultânea n-hexano/metil-etilcetona (MEK), mesmo com os dois solventes em níveis baixos, de forma crônica, há o aparecimento do quadro clínico característico da toxicidade do n-hexano, a neuropatia periférica. Sabe-se que a MEK não exerce ação indutora do cit P450, porém, é observado um aumento nos

níveis séricos de 2,5HD, o metabólito responsável pelo desenvolvimento do distúrbio neurológico, o que se espera na realidade é que ocorra uma inibição da depuração plasmática, aumentando a meia-vida da 2,5HD (TAKEUCHI *et al.* 1983; ROBERTSON *et al.* 1989; SHIBATA *et al.* 1990a; SHIBATA *et al.* 1990b).

Quando foi avaliada a exposição simultânea n-hexano/MEK, de forma aguda (60ppm durante 15,5minutos), em voluntários humanos, observou-se que, ao contrário do que ocorre de forma crônica, esta exposição conjunta provocou uma diminuição nos níveis de 2,5HD em relação ao que era esperado, diminuindo assim o risco da ação tóxica. Uma possível explicação é que ocorra uma inibição em uma das etapas do metabolismo dos dois solventes, acumulando então precursores e não a 2,5HD propriamente dita (VAN ENGELEN *et al.* 1997).

A metil-isobutilcetona(MIBK), possui ação sinérgica ao n-hexano, em relação a toxicidade, e isto é devido ao fato da MIBK exercer um efeito indutor no complexo enzimático cit P450 e, desta forma, os metabólitos neurotóxicos tem seus níveis potencialmente aumentados e assim, o risco do desenvolvimento da neurotoxicidade também se eleva (ABOU-DONIA *et al.* 1985; ABOU-DONIA *et al.* 1991; LAPADULA *et al.* 1991).

Com relação a exposição combinada n-hexano/acetona, CARDONA *et al.* (1996) verificaram que a cetona pode induzir um aumento nos níveis da forma livre de 2,5HD. Simultaneamente há um decréscimo da forma 4,5-dihidróxi-2-hexanona, sem afetar os níveis de 2,5HD total. Talvez esta ação concomitante na biotransformação do n-hexano, seja a explicação para ausência de interação significativa quando da exposição simultânea com acetona.

Estudos envolvendo a observação dos efeitos, frente a exposição simultânea tolueno/n-hexano, sugerem que o tolueno exerce uma ação

inibitória nas frações microssomais responsáveis pelas reações de oxidação da biotransformação do n-hexano. Desta forma, há redução nos níveis dos metabólitos neurotóxicos, assim o risco pela ação tóxica do tolueno torna-se aparentemente mais importante que a ação tóxica do n-hexano, neste caso com o metabolismo inibido (TAKEUCHI *et al.* 1981; PERBELLINI *et al.* 1982b; IWATA *et al.* 1983; TAKEUCHI *et al.* 1993; IKEDA, 1995; YU *et al.* 1998). É provável que esta seja a mesma explicação para a inibição na neurotoxicidade do n-hexano, quando a população em estudo foi exposta simultaneamente com benzina (ONO *et al.* 1982).

Em um estudo em que foi avaliado a exposição combinada xileno/n-hexano, verificou-se que, simultaneamente ocorre a inibição e indução de determinados efeitos do n-hexano. O efeito de perda de equilíbrio postural, foi inibido, não sendo observado. No entanto, a perda da sensibilidade auditiva foi induzida. Fica claro que, para conseguir estimar qual o risco para a saúde do trabalhador frente a esta exposição simultânea, estudos posteriores devem ser realizados (YOKOYAMA *et al.* 1997).

2.4. Toxicodinâmica

Sabe-se que os efeitos tóxicos do n-hexano, assim como de seus metabólitos, 2-hexanona; 2,5-hexanodiona; 2-hexanol e 2,5-hexanodiol; ocorrem em sua maioria devido a reações covalentes com proteínas axonais. Por esta razão a principal preocupação quando tratamos da toxicologia do n-hexano, é em relação a exposição crônica a este agente químico, e a sua capacidade de produzir neuropatia periférica, em humanos e em animais de experimentação (GRAHAM, 1980).

Os termos neuropatia periférica e polineuropatia, designam uma síndrome clínica que consiste em diminuição da força muscular, abolição da sensibilidade e alteração dos reflexos, devido a lesões difusas dos nervos

periféricos. De acordo com a lesão neuronal, a polineuropatia pode consistir de uma axonopatia (degeneração axonal), uma desmielinização ou uma associação dos dois tipos de lesão, sendo então denominada mista (CARVALHO, 1991).

A instalação do quadro neurológico causado pelo n-hexano, é geralmente insidiosa e de progressão lenta nas exposições ocupacionais, por esta razão a neuropatia é caracterizada como simétrica de instalação subaguda ou crônica, manisfestando-se por parestesias dos músculos dos membros, tanto proximais quanto distais, e perda dos reflexos tendinosos profundos (CARVALHO, 1991).

Além do quadro de neuropatia periférica, também chamada de neuropatia hexacarbônica, estudos em ratos tem demonstrado que o n-hexano e seus metabólitos possuem a capacidade de causar atrofia testicular (GILLIES *et al.* 1981).

O termo "neuropatia hexacarbônica" aplicado a síndrome tóxica, na qual são atingidos neurofilamentos axonais, localizados na região distal das fibras nervosas mielinizadas, é atribuído ao quadro clínico causado por agentes químicos que possuem seis carbonos em sua estrutura química e que são capazes de produzir γ-dicetonas como produtos de metabolismo (COURI & MILKS, 1982, DECAPRIO *et al.* 1988).

Há vários trabalhos que comparam a toxicidade do n-hexano com isômeros, que normalmente estão presentes no "hexano comercial". Em um experimento em ratos expostos a vários solventes isoladamente, foi verificado que a ordem de severidade do quadro neurológico foi; n-hexano > metilciclopentano > 2-metilpentano = 3-metilpentano (ONO *et al.* 1981).

Um outro estudo, em humanos e em ratos, comparou o potencial tóxico entre n-hexano e n-heptano e seus respectivos metabólitos, os

resultados mostram que, a excreção da 2,5-hexanodiona (2,5HD) e da 2,5-heptanodiona (2,5HP) existe, tanto em indivíduos expostos quanto em ratos, porém a quantia de 2,5HP excretada na urina foi menor que a 2,5HD, evidenciando maior chance do desenvolvimento da toxicidade pela 2,5HD. Esta suspeita foi comprovada pela medida da razão de reação de pirróis com a N-α-acetil-L-lisina que com a 2,5HP foi quase a metade da obtida pela 2,5HD (FILSER *et al.* 1996).

Diversas são as hipóteses postuladas com a finalidade de explicar o mecanismo de ação neurotóxica do n-hexano e de seus metabólitos. As teorias propostas tentam explicar eventos associados com o acúmulo de neurofilamentos de 10nm, a preferência da localização do dano celular e a relação entre a estrutura química e a atividade neurotóxica (CARVALHO, 1991).

A inibição do metabolismo energético neuronal tem sido postulada para explicar o mecanismo de neurotoxicidade. De acordo com esta hipótese, acredita-se que há uma inibição das enzimas sulfidriladas, principalmente a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e a fosfofrutoquinase (PFK). Esta inibição reduz a disponibilidade energética e desta forma há redução das enzimas glicolíticas nos axônios, resultando na produção inadequada de energia com subsequente deterioração seletiva das fibras neuronais longas e de maior diâmetro (COURI & MILKS, 1982, LAWERYS, 1992, CARVALHO, 1993, GRAHAM, 1995).

Em um trabalho desenvolvido por CHAPIN *et al.* (1983) foi observado que a inibição da GAPDH é muito específica e ocorre somente nas células de Sertoli, levando a alteração testicular e nos axônios causando axonopatia periférica. Outra enzima de interesse, que tem seus níveis reduzidos, é a enolase neurônio específica, da creatinina quinase B e da proteína β-S-100, encontrada preferencialmente na região distal dos nervos periféricos, justificando por isso a ação local (HUANG *et al.* 1992).

GRAHAM (1980), admitiu que a inibição da GAPDH pela 2,5 HD possui um efeito cumulativo, e ainda propôs que a inibição exista devido a reação com grupos amino da enzima, no lugar dos grupos sulfidrilas. Sustentou também, a hipótese de que ocorre a ligação cruzada inter e intramolecular de proteínas de neurofilamentos, resultando em agregação e obstrução do transporte axonoplasmático, com consequente degeneração axonal.

Devido a hipótese da inibição da via glícolítica ser um, possível mecanismo de ação, e ainda pelo fato de pessoas diabéticas, quando expostas ao n-hexano desenvolverem, antes das não diabéticas, os sintomas da neuropatia periférica, buscou-se uma correlação bioquímica para definir as razões deste aumento na susceptibilidade. Há suspeitas de que, pessoas hiperglicêmicas logo desenvolvem falência renal e assim há a diminuição na depuração de 2,5HD, aumentando, consequentemente, a toxicidade desta substância. Na realidade, não foi observado nenhuma redução nos níveis de glicose, caracterizando a alteração bioquímica, no entanto a 2,5HD não foi determinada na urina, nem no sangue, ou seja, não se tem certeza se estes níveis sofrem ou não o efeito da redução da depuração urinária (GOTO *et al.* 1997; KIMURA *et al.* 1998).

A inibição do metabolismo lipídico, também foi estudada como um provável mecanismo de ação do n-hexano e suas γ-dicetonas, principalmente a 2,5HD (GILLIES *et al.* 1980; GILLIES *et al.* 1981; LAWERYS, 1992). Alguns estudos constataram a inibição da esterologênese e ainda, que esta é acompanhada pela inibição na síntese da ubiquinona. Esta segunda é considerada uma alteração mais importante que a inibição na síntese de colesterol, já que a maioria das células precisam produzir sua própria ubiquinona, enquanto que colesterol pode ser sintetizado ou derivado do sangue (GILLIES *et al.* 1980).

A ubiquinona é responsável pela transferência de elétrons entre NADH desidrogenase, e pelo transporte de elétrons mitocondrial do citocromo b. Esta hipótese foi proposta como uma outra forma de bloqueio no metabolismo de energia, resultante na inibição da glicólise. Outro aspecto interessante, é que esta alteração metabólica ocorre no nervo ciático, enquanto que no fígado e no cérebro estas não são observadas. É provável então que, esta seja uma ação específica e represente talvez um mecanismo secundário de ação tóxica (GILLIES *et al.* 1980, GILLIES *et al.* 1981).

Outros efeitos bioquímicos do n-hexano e de seus metabólitos, são propostos para explicar o mecanismo da neurotoxicidade, incluindo principalmente, a inativação da tiamina, a deficiência de piridoxina, o efeito quelante do cálcio mitocondrial e a elevação dos níveis plasmáticos de colinesterase (SAVOLAINEN *et al.* 1977; SCHOENTAL & CAVANAGH, 1977; SPENCER *et al.*1980, BASTONE *et al.* 1987 GRAHAM *et al.* 1995).

Uma outra teoria que tem merecido grande atenção por parte dos pesquisadores, é a formação de pirrol em proteínas do citoesqueleto axonal. De acordo com esta teoria, o que ocorre é a reação dos compostos γ-dicetonas com grupos amino de proteínas para formar 2,5-dimetilpirrol (DECAPRIO *et al.* 1982, DECAPRIO *et al.* 1983; ANTHONY *et al.* 1983).

Diversos são os mecanismos que visam explicar como ocorre a modificação de proteínas de neurofilamentos, através da formação de derivados pirrólicos com a degeneração da fibra nervosa na neurotoxicidade dos compostos γ-dicetonas. Com base na natureza hidrofóbica do derivado 2,5-dimetilpirrol, há a possibilidade de que ocorra um aumento nas interações hidrofóbicas entre neurofilamentos, com resultante acúmulo e agregação desses elementos no desenvolvimento da neuropatia. Segundo esta hipótese, os agregados de neurofilamentos se depositam em áreas de constrição axonal (nos nódulos de Ranvier) induzindo um bloqueio físico no

transporte de nutrientes dentro do axônio distal (DECAPRIO *et al.* 1983).

A formação do anel pirrólico é resultado de um fenômeno de *crosslinking* autoxidativo mediado por radicais livres. Esta hipótese é confirmada em um estudo realizado com 2,5-hexanodiona-marcada, neste observa-se uma substituição de um radical (via abstração de H^+), ou adição de um radical no anel pirrólico (DECAPRIO *et al.* 1988).

Alguns trabalhos sugerem que, as alterações que causam a atrofia testicular estão relacionadas com a ação nos microfilamentos de actina e vimetina das células de Sertoli, e no caso da neuropatia, a relação é com neurofilamentos. Estudos *in vitro* mostram que a citopatologia da 2,5HD envolve mitocôndria, retículo endoplásmatico rugoso e complexo de Golgi, o que ocorre são alterações em algumas membranas intracitoplasmáticas, contribuindo para ação citotóxica. Um efeito indireto ou "catalítico" envolve uma ou mais vias do metabolismo intermediário, relacionado com a reação da 2,5HD com grupos sulfidrila que pode causar um efeito na divisão celular, com subsequente inibição reversível no crescimento. (MALORNI *et al.* 1989; HALL *et al.* 1991).

Embora a maioria dos trabalhos evidenciem a importância da formação de pirróis, envolvendo sub unidades de proteínas de neurofilamentos, como evento crítico na modificação de proteínas do citoesqueleto axonal, a sequência de eventos entre a formação de pirrol e a degeneração axonal permanece obscura. Tem-se reconhecido que os vários mecanismos propostos podem não ser mutuamente exclusivos, havendo assim a possibilidade de uma participação conjunta na patogênese da neuropatia (DECAPRIO *et al.* 1987).

Grande parte dos estudos buscam explicações para a maneira de como ocorre a neuropatia periférica, em função da exposição crônica ao n-hexano. Porém, MADEJA *et al.* (1997) realizaram um estudo para verificar

qual mecanismo era responsável pelo aparecimento de efeitos centrais como excitação, narcose, tonturas, entre outras, em situações de exposição a elevadas concentrações de n-hexano, caracterizando a intoxicação aguda. O trabalho tentou estabelecer uma correlação entre o desenvolvimento desses efeitos e uma possível ação nos canais de potássio, principalmente por saber que alguns metabólitos do n-hexano, como o 2-hexanol e a metil-n-butilcetona, podem reduzir a corrente nos canais de potássio. Observou-se que, há uma leve ação nestes canais, no entanto este não é o principal mecanismo para neurotoxicidade aguda, certamente estudos posteriores poderão, também, ajudar a elucidar o mecanismo de ação no caso de intoxicações agudas.

2.5. Toxicidade

A literatura possui uma ampla variedade de referências relativas à toxicidade potencial do n-hexano e/ou seus produtos de biotransformação e aos seus efeitos no organismo.

2.5.1. Toxicidade aguda

Os dados disponíveis com relação a toxicidade aguda do n-hexano, sugerem que esta é relativamente baixa. Este solvente é considerado um irritante cutâneo médio, que pode causar eritema quando o contato é por um curto período de tempo (WHO IPCS n°59, 1991).

Contato oclusivo de n-hexano durante 1-5 horas, causa eritema e lesões erosivas depois de cinco horas. Aplicação de 1,5mL a 3,1cm^3 da pele do antebraço, durante cinco minutos, resulta em ardência e eritema (WALBERG, 1984). Em algumas referências, tem-se que o n-hexano é irritante de mucosas, de membranas do trato respiratório e dos olhos, para humanos, nas concentrações de 150ppm (JORGENSEN & COHR, 1981).

A exposição aguda ao n-hexano leva ao aparecimento de tontura, mal estar, narcose moderada e vertigem, após dez minutos de exposição, a 5000ppm. Desconforto ocular e na garganta, cefaléia e menos comumente náuseas, foram observadas em indivíduos expostos a 1500ppm, durante dez minutos. Aspectos relacionados à toxicidade do n-hexano, da 2-hexanona e da 2,5-hexanodiona podem ser observados na Tabela 3 (COURI & MILKS, 1982).

Tabela 3: Toxicidade aguda do n-hexano, da 2-hexanona e da 2,5-hexanodiona, em animais (COURI & MILKS, 1982)

Composto	**n-hexano**	**2-hexanona**		**2,5-hexanodiona**	
DL_{50}[a] em ratos (v.o., g/kg)	32	2.6		2.7	
Toxicidade inalatória em ratos					
Concentração (ppm)	48000	4000	8000	200	1700
Duração (horas)	4	4	4	4	>1
Efeito	CL_{50}[b]	sem mortes	CL_{100}[c]	CL_0[d]	CL_{100}[c]

[a] DL_{50}, Dose por via oral que é letal para 50% dos animais testados
[b] CL_{50}, Concentração no ar que é letal para 50% dos animais testados
[c] CL_{100}, Concentração no ar que é letal para 100% dos animais testados
[d] CL_0, menor concentração no ar que não causa mortes em ratos

Há relatos de inaladores de cola (cheiradores de cola ou "glue-sniffers") que referem, moderada euforia e narcose após inalação da mistura contendo n-hexano (CARVALHO, 1993).

Há estudos ainda, que avaliaram o efeito de doses únicas de 2,5HD, nos órgãos linfóides, nos sistemas imunológico e hematológico. UPRETI *et al.* (1986) consideraram como DL_{50} oral para 2,5HD em ratas fêmeas a concentração de 2,14mL/kg de peso corpóreo. Os ratos foram tratados com 0,43mg/kg de peso em doses únicas e repetidas, foi observado que ocorre atrofia mais grave no timo, quando ocorre exposição única, se comparada com a exposição repetida.

Em outro trabalho, com camundongos, foi avaliada a ação de doses únicas e repetidas no sistema imunológico e hematológico. Foi considerada DL_{50} oral para 2,5HD em camundongos machos, a concentração de 4,90mL/kg de peso corpóreo. Administraram doses de 0,98mL/kg, por intubação gástrica com 0,5mL do volume fisiológico de salina, de ambas formas, dose única e sete doses repetidas, e observaram supressão de uma série de funções imunes. Surpreendentemente esta supressão é maior frente a exposição única. Foi observada também, uma redução na capacidade de aderência dos macrófagos, reduzindo assim o poder de fagocitose (UPRETI & SHANKER; 1987).

2.5.2 Toxicidade subaguda

Poucos são os estudos que avaliam a toxicidade subaguda do n-hexano e/ou seus metabólitos. JORTNER *et al.* (1993) realizaram um trabalho que comparou a média de sobrevivência, a perda de peso corporal, a ataxia para andar e lesões neuropatológicas, entre camundongos e galinhas, após administração de 2,5HD, por via intraperitoneal, três vezes por semana, durante três semanas nas concentrações de 75; 105; 150; 225 e 350mg/kgdia. Quanto a sobrevivência, galinhas são mais susceptíveis que camundongos. Ambos grupos apresentaram perda de peso corpóreo. A relação da dose quanto aos efeitos locomotores existiu nos dois grupos estudados. A marcha foi significativamente alterada em camundongos após duas semanas de exposição de 2,5HD, a 225 e 350mg/kgdia. A ataxia em galinhas foi observada, após exposição por uma semana, a 150mg/kgdia e, após duas semanas, a 75 e 105mg/kgdia. Quanto a neurotoxicidade as maiores alterações foram em relação ao movimento e sendo iguais tanto para ratos quanto para galinhas frente a exposição à 2,5HD.

2.5.3 Toxicidade crônica

Os estudos de toxicidade crônica do n-hexano revelaram até o momento duas importantes ações tóxicas do solvente, uma delas sobre os testículos de ratos expostos, e outra sobre o sistema nervoso, considerada de maior importância, tanto para animais quanto para humanos. Outros efeitos incluem lesões no trato respiratório, fígado, baço, glândulas salivares, sistema imunológico e olhos (CARVALHO, 1993).

2.5.3.1. Efeitos sobre o aparelho respiratório

DUNNICK *et al.* (1989) constataram alterações histopatológicas no trato respiratório de camundongos expostos a diferentes concentrações de n-hexano, incluindo moderada ação inflamatória, lesões erosivas e degenerativas no epitélio respiratório da cavidade nasal.

Diversas lesões pulmonares incluindo edema, infiltração celular, necrose, fibrose e hemorragia foram constatadas por TAIRA (1975) através da administração intramuscular diária de n-hexano em coelhos na dose de 660mg/kg, durante cinco dias ou 66mg/kg em óleo de oliva, durante o período de 21-77 dias.

LUNGARELLA *et al.* (1984) descreveram uma síndrome pulmonar obstrutiva, pela exposição prolongada a vapores de n-hexano. As alterações morfológicas do tecido pulmonar incluem: alargamento dos bronquíolos respiratórios, perda do septo inter-alveolar, compatível com o início de um enfisema, reação de fibrose e proliferação de células bronquiolares não ciliadas, esta situação foi observada em coelhos expostos a 3000ppm de n-hexano, 8h/dia, 5 dias/semana, durante 24 semanas.

Algumas alterações bioquímicas relacionadas à dose, e que são

indicativas de elevação da secreção pulmonar e dano celular, foram observadas em ratos expostos ao n-hexano, destacando principalmente elevação em proteínas, lipídeos, fosfatase alcalina, lactato desidrogenase (G6PD), atividade da convertase da angiotensina e da γ-glicuronidase (SHAU *et al.* 1982).

2.5.3.2. Hepatotoxicidade

Foram observadas necroses lobulares em fígado de ratos expostos a concentração de n-hexano (99% de pureza), em níveis de 125-500ppm, 22horas/dia, 7 dias/semana, durante mais de seis meses. Foi ainda constatado aumento de peso hepático e elevação nas taxas de proteínas microssomais hepáticas do citocromo P450, em camundongos expostos ao solvente (WHO, IPCS n°122, 1991).

Trabalhadores e "cheiradores de colas", que inalam vapores de n-hexano (100-600ppm) durante um período de 2 a 6 meses, tem significativa diminuição nos níveis de colinesterase sérica, acredita-se que este seja o primeiro efeito tóxico no fígado. Provas bioquímicas para avaliação das condições hepáticas, sugerem que na maioria dos casos, os parâmetros hepáticos não ficam alterados. No entanto em poucos casos individualizados, encontra-se valores elevados de creatina-fosfoquinase sérica, lactato desidrogenase e ornitina-carbamoil-transferase como reações positivas de urobilinogênio na urina (JORGENSEN & COHR, 1981).

O dano hepático está relacionado com o acúmulo de lipídios no fígado. Apesar da hepatotoxicidade não ser o efeito tóxico mais característico da intoxicação crônica pelo n-hexano, esta pode ser considerada uma evolução clínica, que certamente atingirá os trabalhadores excessivamente expostos ocupacionalmente ao n-hexano ou os "cheiradores de colas" (COURI & MILKS, 1982).

2.5.3.3. Esplenotoxicidade e efeitos sobre as glândulas salivares

A toxicidade tem sido descrita em baço ou outros órgãos linfóides e em glândulas salivares de animais expostos a n-hexano e seus metabólitos.

Foi descrito aumento no número de células gigantes e precipitação de hemosiderina, observado em baço de ratos expostos a 2992mg/m^3 (850ppm)de n-hexano durante 20 semanas (KURITA, 1974).

Alterações do timo, nódulos linfáticos e atrofia esplênica, foram constatadas em ratos após administração oral de 0,25; 0,5; 0,75 e 1mL de 2,5HD/kg de peso corpóreo (UPRETI *et al.* 1986).

Degeneração gordurosa e dilatação do ducto das glândulas parótidas e salivares foram observadas em ratos expostos a concentração de n-hexano de 500-700ppm, 22horas/dia, por período superior a nove semanas. Os efeitos citados encontravam-se geralmente associados a hipersalivação (ALTENKIRCH *et al.* 1982).

2.5.3.4. Toxicidade perinatal e sobre o sistema reprodutor

Estudos relacionados com a toxicidade perinatal foram desenvolvidos durante a gestação. Os resultados obtidos sugerem que não há diferenças na reabsorção fetal, no peso corpóreo ou outras anormalidades. A única alteração observada foi, perda de peso corpóreo na primeira semana após o nascimento, que se manteve por um período de 4 a 6 semanas, voltando ao normal somente após a sétima semana (JORGENSEN & COHR, 1981; COURI & MILKS, 1982).

Um estudo realizado em ratos mostra que concentrações de n-hexano em torno de 1000ppm, no ar inalado, podem causar uma atrofia testicular severa e cessação na produção de esperma, em até 14 meses de exposição continuada. Nos animais afetados são encontradas poucas espermatozoas e a maior parte com alterações morfológicas, no lúmen dos ductos testiculares e no corpo do epidídimo (NYLÉN, *et al.* 1989).

Vacuolização das células de Sertolli, aparência anormal e alongada das espermátides e alterações nos filamentos intermediários de actina e vimetina são descritas como degeneração testicular. Acredita-se que estas alterações, também estejam relacionadas com a inibição das enzimas testiculares, como a β-glicuronidase e a γ-glutamil-transferase. É relatado ainda diminuição na secreção do fluido tubular seminífero, estando provavelmente relacionada com os danos morfológicos, pois aparentemente primeiro ocorre a diminuição na secreção do fluido e, as outras alterações, ocorrem em consequência desta (CHAPIN *et al.* 1983; HALL *et al.* 1991; JOHNSON *et al.* 1991).

Diversos estudos realizados em animais de experimentação e em indivíduos expostos ocupacionalmente, demonstram que o n-hexano é capaz de afetar a capacidade reprodutora em ambos os sexos, porém os relatos são mais frequentes em relação ao masculino, principalmente, no que diz respeito a atrofia testicular e azoospermia.

Na tentativa de buscar a razão pela qual ocorre azoospermia, frente a exposição n-hexano, foi realizado um trabalho que verificou possível ação tóxica no sistema nervoso central (SNC), no sentido de alterar níveis hormonais e por consequência a homeostase testicular. Os resultados mostraram que não há ação depressora no SNC, no centro controlador das gonadotropinas. Após seis semana de tratamento os níveis de LH (Hormônio Luteinizante) e FSH (Hormônio Folículo Estimulante) estavam elevados, e como o nível de testosterona se manteve inalterado estas alterações

poderiam estar relacionadas com a azoospermia. Neste estudo porém, as enzimas testiculares, que em experimentos animais normalmente são as mais avaliadas, foi observada a diminuição da atividade da β-glicuronidase, assim como de outras enzimas localizadas nas células de Sertoli. Acredita-se que sejam estas alterações enzimáticas as responsáveis pelo desenvolvimento de azoospermia e não alguma ação no SNC (CHAPIN *et al.* 1982).

2.5.3.5. Neurotoxicidade do n-hexano

Indivíduos expostos cronicamente à concentrações relativamente elevadas de n-hexano, e animais expostos ao n-hexano ou seus metabólitos em elevadas concentrações, desenvolvem uma síndrome neurotóxica denominada "neuropatia periférica hexacarbônica" (COURI & MILKS, 1982).

Patologicamente, esta condição é caracterizada pelo agrupamento de axônios grandes e longos, consistindo em um acúmulo focal de neurofilamentos de 10nm. Esses acúmulos ocorrem ao longo das fibras nervosas, originadas no lado proximal dos nódulos de Ranvier na região mais distal do axônio, porém eventualmente pode-se desenvolver nas regiões proximal e internodal (COURI & MILKS, 1982; WHO IPCS n°122, 1991).

Além das alterações axonais, um trabalho que avaliou a neuropatia após uma exposição a cola, contendo 80% de n-hexano, durante 2-5 meses, evidenciou, também, uma denervação por atrofia muscular combinada com mudanças miopáticas focais e até uma reação de inflamação celular (SCELSI *et al.*1981).

O quadro clínico geralmente manifesta-se por parestesias dos músculos, tanto proximais quanto distais, e perda dos reflexos tendinosos profundos. Os sintomas iniciais são caracterizados por alterações sensoriais

simétricas nas mãos e pés, mais especificamente dormência periférica com distribuição em luva e meia que raramente se estende a outras partes do corpo. Com a progressão do quadro clínico são observados sintomas como ataxia, fraqueza muscular, perda de equilíbrio, disartria, parestesia muscular e perda dos reflexos podendo atingir até um quadro de tetraplegia em casos extremos (RIZZUTO *et al.* 1980; SCELSI *et al.* 1981; CHANG, 1990; CARVALHO, 1991).

Outros sintomas como cefaléia, naúseas, anorexia e astenia, também são relatados por indivíduos com síndrome da neuropatia periférica hexacarbônica (RIZZUTO *et al.* 1980).

Apesar da maioria dos trabalhos, relatarem que a toxicidade neurológica do n-hexano aparece frente a exposições no mínimo maiores que 100ppm, um estudo mostra que dois trabalhadores desenvolveram polineuropatia em uma indústria cuja concentração de n-hexano ambiental era apenas 21ppm. Vale ressaltar que, esses trabalhadores permaneciam na indústria 24h por dia e inclusive faziam suas refeições no ambiente de trabalho (WANG *et al.*1986).

Os achados neurofisiológicos envolvem exames eletromiográficos que revelam potencial de fibrilação nos pequenos músculos das mãos e dos pés. O estudo da condução demonstra diminuição na velocidade de condução nos nervos (PERBELLINI *et al.* 1978; MUTTI *et al.* 1982; WANG *et al.* 1986).

Um estudo realizado com trabalhadores expostos ao n-hexano, por mais de dez anos, avaliou o sintomas neurológicos e a persistência deles. No exame neurológico foram consideradas fasciculações, fraqueza muscular, perda de reflexos, vibrações, senso de posição, senso de toque, temperatura e atrofia. Os relatos envolveram sintomas neurológicos, componentes sensoriais e motores. A persistência dos sintomas foi observada em 30% dos pacientes, estando esta possivelmente envolvida

com os componentes sensoriais por uma razão não muito clara. Aparentemente os danos não envolvem somente nervos mas o SNC também. Desta forma células T dos gânglios espinhais podem ser afetadas, nestes casos a regeneração dos axônios sensoriais pode ser impossível. A recuperação não é completa, principalmente no que se refere aos componentes sensoriais. Sendo assim o estudo eletroneurográfico dos componentes motores pode ser suficiente para o diagnóstico, mas não para a recuperação das alterações já desenvolvidas (VALENTINO, 1996).

A Tabela 4 traz os sintomas, os achados clínicos e eletrofisiológicos e as alterações morfológicas nos nervos periféricos, após a exposição ao n-hexano (JORGENSEN & COHR, 1981).

Tabela 4: Sintomas, achados clínicos, eletrofisiológicos e alterações morfológicas nos nervos periféricos após a exposição ao n-hexano em animais de experimentação e em trabalhadores (JORGENSEN & COHR, 1981).

	Dados em trabalhadores	Dados animais
Dose de exposição	360-2160mg/m^3 (100-900ppm), com exposição máx. (2500ppm)	1400-36000mg/m^3, (400-10000ppm)
Concentração	70 - 95% de n-hexano	somente n-hexano
Período de latência	2 - 6 meses	4 - 5 meses
Sintomas	Distúrbios de sensação; fraqueza muscular e dor simétrica distal nas pernas	Distúrbios de marcha
Alterações clínicas	Atrofia muscular, hipotonia, diminuição no alongamento muscular, deficiência dos reflexos com debilitação de pés e mãos, parestesia e hipoestasia distal em pernas e braços	Atrofia muscular e debilitação de pés
Alterações eletrofisiológicas	Diminuição da condução nervosa motora e sensorial com aumento do período de latência distal, exames eletromiográficos indicam dano neurogênico	Diminuição condução nervosa motora e sensorial; Aumento do período refratário e diminuição da excitabilidade
Análise microscópica comum	Aumento dos nervos com distanciamento da bainha de mielina e retração paranodal; atrofia das fibras musculares	Dilatação local dos axônios com distanciamento da bainha de mielina e alterações na mielina
Análise ao microscópio eletrônico	Aumento dos axônios com massas de neurofilamentos, outros sinais de degenaração	Massas concisas de neurofilamentos longos
Máximo dos efeitos	Entre 2-3 meses após cessada a exposição	
Tempo de recuperação	Bastante longo (0,5 a 1 ano), e em algumas situações para polineuropatia clínica e sintomas após 2 anos	

2.5.3.6. Toxicidade ocular

A toxicidade do n-hexano sobre o olho humano pode ser de natureza local ou sistêmica. A toxicidade local geralmente ocorre por acidente ocupacional ou não-ocupacional, pelo contato do solvente com o globo ocular. Como resultado do contato direto com as partes externas do olho, este solvente, quando grande volume atinge o olho, pode causar dor e opacificação da córnea. Parece que o dano se deve a um a perda difusa de células epiteliais devido à lipossolubilidade presente nestas (POTTS, 1986).

Alterações na visualização de cores, associada com a distrofia na mistura de pigmentos e proliferação capilar perifocal, maculopatia e diminuição na amplitude são observadas em trabalhadores expostos ao n-hexano em concentrações que variam de 423-3000ppm (SEPPÄLAÄINEN *et al,* 1979; CHANG, 1990). São observados ainda estreitamento do campo visual, neurite e atrofia óptica em fabricantes de sandálias do Japão com neuropatia periférica (RIZZUTO *et al.* 1980).

Em um trabalho, tentou-se avaliar a cinética e a distribuição da 2,5HD no olho de ratos albinos; foi observado que a 2,5HD penetra na retina , sangue e barreiras humor/aquosas podendo então ficar concentrada nestes locais. É observado um efeito sinérgico nas células fotoreceptoras quando da presença de luz, porém o mecanismo ainda não é bem elucidado (BÄCKSTRÖM *et al.* 1998).

2.5.3.7. Toxicidade sobre o sistema imunológico

O sistema imunológico sofre ação tóxica do n-hexano, tanto em doses únicas quanto em doses repetidas conforme descrito por UPRETI & SHANKER (1987) que observaram supressão de uma série de funções deste sistema inclusive redução na capacidade de aderência dos macrófagos.

Foram observadas reduções nos níveis das imunoglobulinas IgM, IgG e IgA em trabalhadores expostos ao n-hexano em concentrações que variaram de 23 a 215ppm (KARAKAYA *et al.* 1996). Em um estudo posterior, buscou-se correlação entre os níveis de 2,5HD urinária e os níveis séricos de imunoglobulinas, porém não foram encontrados resultados satisfatórios, evidenciando então a necessidade de mais trabalhos, com o objetivo de esclarecer mais esta ação tóxica do n-hexano e seus metabólitos (JACKSON *et al.* 1997).

2.5.3.8. Mutagenicidade

Os efeitos genotóxicos do n-hexano ainda são pouco conhecidos, embora alguns estudos conduzidos *in vivo* e *in vitro*, demonstrem a capacidade do solvente de causar danos cromossômicos. Aumento de poliploidia, mas sem elevação de aberrações estruturais, foi observado após incubação de células fibroblásticas de cobaias com n-hexano a 95% em concentração de 330μg/mL durante 48 horas. Por outro lado, diversos testes realizados com *Salmonella typhimurium* não evidenciaram ação mutagência do n-hexano (ISHIDATE & SOFUNI, 1984; MORTELMANS *et al.* 1986).

Foram observadas ainda alterações cromossômicas em células germinativas de ratos expostos a 17600mg/m^3 (5000ppm) de vapor de n-hexano, durante 16 horas/dia. Após 2-4 semanas iniciada a exposição os espermatócitos apresentaram arranjos anormais dos cromossomos em metáfase e pontes cromossômicas em anáfase. As espermátides apresentavam núcleos gigantes, provavelmente poliplóides (WHO IPCS n°122, 1991).

2.5.3.9. Potencial carcinógeno

Assim como os efeitos genotóxicos o potencial carcinogênico do n-

hexano, não tem sido adequadamente investigado. A aplicação dérmica de n-hexano em camundongos parece não aumentar a formação de carcinomas de pele, seguido da exposição a um iniciador de tumor (7,12-dimetilbenzatraceno) ou, em exposição simultânea, com um agente promotor, tipo óleo de croton (WHO IPCS nº 122, 1991).

Em coelhos expostos a uma concentração de n-hexano de 10560 mg/m^3 de ar (3000ppm) durante 24 semanas, 8horas/dia, foi observado proliferação papilar de células bronquiolares não-ciliadas, descrito pelos autores como tumores papilares (LUNGARELLA *et al.* 1984).

2.6. Monitorização Biológica

"A monitorização biológica consiste na avaliação da exposição aos agentes químicos de uma forma global, por meio da medida dos determinantes biológicos apropriados em amostras biológicas do organismo do trabalhador, num determinado tempo (ACGIH, 1998)."

Os Índices Biológicos Máximos Permitidos (IBMP's), são valores para os quais se supõe que a maioria das pessoas ocupacionalmente expostas não correm risco de dano à saúde. Estes são capazes de indicar uma exposição no ambiente de trabalho acima do limite de tolerância, mas não indica doença, nem está associado a um efeito ou disfunção de qualquer sistema biológico. Os IBMP's são baseados em estudos de toxicocinética, de modo a tornar possível a eleição destes indicadores, bem como dos momentos ideais de coleta, levando em consideração tempo de meia-vida da substância e fatores que possam estar interferindo na análise (BRASIL, – NR 7, 1994).

2.6.1. Biomarcadores de dose interna e seus aspectos analíticos

Os bioindicadores de dose interna são aqueles que apresentam correlação com a quantidade do agente químico absorvida. Para o n-hexano, esses indicadores podem ser os metabólitos: 1-hexanol, 2-hexanol, 3-hexanol, 2-hexanona, 5-hidróxi-2-hexanona e 2,5-hexanodiona; o n-hexano inalterado ou derivados pirrólicos em urina, há ainda a possibilidade de avaliar o n-hexano inalterado no sangue ou no ar exalado.

n-hexano inalterado no sangue: estas análises envolvem extração por "head-space" e análise por cromatografia a gás (CG), com detetor de ionização de chama (DIC). Os resultados obtidos tem sido satisfatórios, mantendo boa correlação quando comparados com as análises dos metabólitos urinários, principalmente por não sofrer as interferências dos outros solventes na toxicocinética. Acaba tornando-se uma desvantagem para esta análise o fato da coleta ser invasiva. Além disso, outra dificuldade observada é que a meia-vida do n-hexano no sangue é em torno de 1,5 - 2 horas, isto acaba tornando necessário o rigor no momento da coleta, caso contrário a análise não refletirá a absorção do solvente (VEULEMANS *et al.* 1982; KAWAI *et al.* 1992a, KAWAI *et al.* 1992b).

n-hexano no ar exalado: as análises do n-hexano no ar exalado mostram boa correlação com outro bioindicador como por exemplo com 2,5HD urinária de final de jornada de trabalho, podendo este ser utilizado como indicador. Atenção deve ser dada a variação interindividual, como diferenças na absorção e retenção pulmonar do n-hexano em função de hábitos (fumantes e não fumantes), além é claro do ambiente de trabalho e doenças pulmonares que estarão provavelmente causando alterações para esta análise (VEULEMANS *et al.* 1982; PERIAGO *et al.*1993). A ACGIH, recomenda esta análise para monitorização biológica, no entanto no Brasil ainda não há limite definido para este possível indicador biológico de

exposição ao n-hexano (ACGIH, 1998).

n-hexano inalterado na urina: a determinação do n-hexano inalterado na urina foi estudada utilizando a técnica de extração por "head-space", seguida de análise por CG - DIC. Foram obtidos bons resultados inclusive com correlação entre monitorização ambiental e biológica. No entanto, reconhece-se que, apesar de ser uma metodologia rápida e de fácil execução, existem muitos pontos críticos, como a perda do solvente por volatilização, além de precauções que deverão ser tomadas quando da coleta da amostra de urina (IMBRIANI *et al.* 1984; KAWAI *et al.* 1992a, KAWAI *et al.* 1992b).

Derivados pirrólicos: como os metabólitos urinários, após hidrólise são convertidos a derivados pirrólicos, foi estudada a determinação destes, por meio da reação com o Reativo de *Erlich*, já que nesta há a formação de complexos de coloração vermelha, quantificados por espectrofotometria a 525nm. Os resultados tem mostrado boa correlação dos metabólitos urinários com a exposição ao n-hexano, bem como quando a análise destes pirróis é realizada em pelos de ratos após tratamento adequado prévio à extração, no entanto sabe-se que são necessários mais estudos para serem possíveis melhores conclusões quanto a confiabilidade do método (OGATA *et al.* 1990; KESSLER *et al.* 1990; JOHNSON *et al.* 1995).

Metabólitos do n-hexano na urina: vários são os trabalhos que fazem a determinação dos metabólitos na urina principalmente do 2-hexanol e da 2,5-hexanodiona. Normalmente quando estes são estudados é feita uma extração líquido-líquido na maioria das vezes com hidrólise prévia, e as análises são realizadas por CG acoplado a um espectômetro de massa (EM) ou DIC (PERBELLINI *et al.* 1980; FEDTKE & BOLT, 1986a, FEDTKE & BOLT, 1986b; KAWAI *et al.* 1991a; SORIANO *et al.* 1996).

Como a maioria dos trabalhos demonstram que a neurotoxicidade

pode ser desenvolvida não somente pelo n-hexano mas, também por seus metabólitos o 2,5-hexanodiol e a 2,5-hexanodina, e ainda pelo fato da 2,5HD ser o principal metabólito excretado na urina de indivíduos ocupacionalmente expostos ao n-hexano, atenção especial tem sido dada a esta dicetona (PERBELLINI *et al.* 1980, PERBELLINI *et al.* 1981a, PERBELLINI *et al.* 1981b, PERBELLINI *et al.* 1981c; MUTTI *et al.* 1984; AHONEN & SCHIMBERG, 1988).

A 2,5-hexanodiona urinária: a determinação da 2,5HD urinária tem sido estudada desde o início da década de 80, principalmente pelo fato de ser o metabólito da maior interesse toxicológico, sendo o causador primário da neuropatia periférica causada pelo n-hexano. Um limite sugerido e inclusive adotado no Brasil, segundo a NR7, é a determinação de 2,5HD na urina, colhida de final de jornada de trabalho, com valor de 5mg/g de creatinina. Em dois estudo ficou comprovado que em exposições ambientais entre 90 e 140ppm de n-hexano, a excreção de 2,5HD em amostras colhidas no final da jornada de trabalho, mostraram relação linear, ou seja os níveis urinários aumentaram proporcionalmente, a medida que a concentração no ambiente de trabalho também aumentava. Apesar disso há ainda muitas questões que permanecem em discussão, como por exemplo o melhor tratamento prévio da amostra (hidrólise enzimática seguida de ácida, hidrólise ácida, sem hidrólise etc..), e de que forma a determinação da 2,5HD urinária desempenha melhor o seu caráter preventivo de indicador biológico da exposição ao n-hexano (PERBELLINI *et al.* 1980, PERBELLINI *et al.* 1981a, PERBELLINI *et al.* 1981b, PERBELLINI *et al.* 1981c; MUTTI *et al.* 1984; AHONEN & SCHIMBERG, 1988; QUE HEE, 1993; BRASIL NR-7, 1994;).

Relacionado à técnica, basicamente é realizada uma extração líquido-líquido com diclorometano, utilizando como padrão interno a ciclohexanona ou a 3-metil,ciclopentanona. Há trabalhos que realizam como tratamento prévio uma hidrólise enzimática, seguida de hidrólise ácida (PERBELLINI *et*

al. 1981a, PERBELLINI *et al.* 1981b, PERBELLINI *et al.* 1981c; PERBELLINI *et al.* 1982; IWATA *et al.* 1983; MUTTI *et al.* 1984; FEDTKE & BOLT, 1986b; AHONEN & SCHIMBERG, 1988). Outros estudos realizam somente hidrólise ácida, antes da extração, e sugerem um pH entre 0,5 e 0,1, considerado ótimo, onde se observa melhora na sensibilidade. Isso porque, outros metabólitos do n-hexano, como a 5-hidróxi-2-hexanona e o 2,5-dimetilfurano, são convertidos a 2,5HD, aumentando os níveis desta na urina. No entanto há quem questione e inclusive sugira que esta hidrólise superestima a monitorização da exposição ao n-hexano, já que quando é feita a correlação da monitorização ambiental com os níveis de 2,5HD urinária sem hidrólise, são obtidos resultados melhores que os comparados com a análise após hidrólise (KAWAI *et al.* 1990, KAWAI *et al.* 1991a, KAWAI *et al.* 1991b; KAWAI *et al.* 1992a, KAWAI *et al.* 1992b; SAITO *et al.* 1991; VAN ENGELEN *et al.* 1995).

Outra etapa prévia descrita em alguns trabalhos, é uma purificação da amostra em fase sólida, utilizando colunas de sílica SEP-PAK, C_{18}, nestes casos a amostra pode ser eluída com metanol ou acetonitrila e a extração é desenvolvida normalmente com diclorometano. Os resultados obtidos mostram que apesar da recuperação ser boa, em torno de 80%, não é necessário um extrato tão puro, além deste processo envolver um custo muito elevado (FEDTKE & BOLT, 1986b; PERBELLINI *et al.* 1986b, PERBELLINI *et al.* 1990b; CARDONA *et al.* 1993, CARDONA *et al.* 1996).

As técnicas descritas ainda com análise por CG-DIC, que não utilizam extração líquido-líquido com diclorometano, envolvem derivação com O-pentafluorobenzil-hidroxilamina ou n-butilamina, e utilizam 2,4 pentanodiona como padrão interno. Os resultados para este tipo de análise são bons frente a elevadas exposições ao n-hexano (KÉZIC & MONSTER, 1991; VOHRA & GAIND, 1992).

Além da CG – DIC, a determinação da 2,5HD pode ser realizada por

cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), sendo a extração realizada conforme descrito acima, ou passar por uma derivação com dansilhidrazina ou 2,4-dinitrofenilhidrazona. A determinação pode ser feita por fase reversa e a detecção tanto com detector de fluorescência quanto com detector de ultra violeta (UV). A maioria dos trabalhos apresentam bons resultados, lembrando que as confusões acontecem principalmente devido as impurezas que existem no hexano comercial (COLOMBINI, 1992; STURARU *et al.* 1992, STURARU *et al.* 1993; MAESTRI *et al.* 1994; GORI *et al.*1995).

Em um estudo recente foi realizada a determinação da 2,5HD e de seus metabólitos por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massa, utilizando detecção através de ionização química com pressão atmosférica. Os resultados obtidos foram bons e este método mostra mais agilidade na análise já que pequenos volumes de amostra de urina são necessários e estas não precisam passar por nenhum tratamento para ser injetada no equipamento e desenvolver a análise (ANDREOLI *et al.* 1998).

A urina colhida no final da jornada de trabalho é preconizada pela ACGIH e, no Brasil, faz parte do Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO) da Norma Regulamentadora - 7 (NR-7), do Ministério do Trabalho, que traz a 2,5HD urinária como indicador biológico da exposição ocupacional ao n-hexano, e o Índice Biológico Máximo Permitido (IBMP) é de 5mg de 2,5-hexanodiona urinária/g de creatinina. A metodologia recomendada para esta análise é CG – DIC (BRASIL NR-7, 1994).

Vale ressaltar ainda que em trabalhos realizados com pessoas não expostas ao n-hexano, níveis baixos de 2,5HD urinária foram encontrados variando entre 0,12 - 0,78mg/L (média de 0,45 ± 0,20mg/L). Acredita-se que estes níveis foram detectados, pois cetonas podem ser formadas como produtos de metabolismo normal e, após hidrólise, estas podem ser convertidas a 2,5HD. Estes níveis são considerados valores de referência

para indivíduos não expostos ao n-hexano (FEDTKE & BOLT, 1986b; PERBELLINI *et al.* 1986b).

A Tabela 5 mostra as principais condições analíticas existentes nos trabalhos da literatura, que realizam a determinação da 2,5HD urinária por CG - DIC.

Tabela 5: Condições analíticas utilizadas na determinação de 2,5HD urinária por CG - DIC.

Volume/pH urina	Extração	Características cromatográficas	Observações	Referência
10mL/pH = 4,8	- 3mL de diclorometano; - Ciclohexanona como PI - Hidrólise enzimática com β-glicuronidase durante 24horas a 37°C, seguida de hidrólise ácida	-Coluna Carbopack com 0,2% de Carbowax 1500; -N_2, gás carreador 20mL/min.; -Temp. coluna 125°C-140°C, aumento de 2°C/min.; -Temp. injetor e detetor 225°C	2-hexanol e 2,5-hexanodiona foram detectados como metabólitos mais importantes.	PERBELLINI *et al.* 1981a, b
10mL/pH = 4,8	- 3mL de diclorometano; - Ciclohexanona como PI - Hidrólise enzimática com β-glicuronidase durante 24horas a 37°C, seguida de hidrólise ácida	-Coluna capilar sílica (25m x 0,25mm) fase Carbowax 20M; -He, gás carreador 1mL/min.; -Temp. coluna 40°C - 150°C, aumento de 30°C/min.; -Temp. detetor 250°C	O trabalho mostra que com coluna capilar a sensibilidade das determinações é melhor que com coluna empacotada.	PERBELLINI *et al.* 1981c
10mL/pH = 4,8	- 3mL de diclorometano; - Ciclohexanona como PI - Hidrólise enzimática com β-glicuronidase durante 24horas a 37°C, seguida de hidrólise ácida	-Coluna FS-WCOT silicone OV-101 (50m x 0,25mm); -He, gás carreador 1mL/min.; -Temp. coluna 40°C - 150°C, aumento de 30°C/min.; -Temp. detetor 250°C	Trabalho que verifica boa correlação de 2,5HD sanguínea com a 2,5HD urinária, sugerindo que esta seja utilizada como indicador biológico da exposição ao n-hexano.	PERBELLINI *et al.* 1982
10mL/pH = 4,8	- 5mL de diclorometano; - Ciclohexanona como PI - Hidrólise enzimática com β-glicuronidase/arilsulfatase durante 24horas a 37°C, seguida de hidrólise ácida	-Coluna capilar de sílica (25m x 0,25mm) com Carbowax 20M; -N_2, gás carreador 0,75mL/min.; -Temp. coluna 80°C - 120°C, aumento de 2°C/min.; -Temp. injetor 160°C	Trabalho que verifica níveis condizentes com a exposição quando a urina é colhida no final da jornada, e ainda oferece a vantagem de uma melhor estimativa que a monitorização ambiental.	IWATA *et al.* 1983

Tabela 5 (Cont.)

Volume/pH urina	Extração	Características cromatográficas	Observações	Referência
10mL/pH = 4,8	- 3mL de diclorometano; - Ciclohexanona como PI - Hidrólise enzimática com β-glicuronidase durante 24horas a 37°C, seguida de hidrólise ácida	-Coluna capilar de sílica (25m x 0,25mm) com fase líquida Carbowax 20M; -He, gás carreador 1mL/min.; -Temp. coluna 40°C - 150°C, aumento de 20°C/min.; -Temp. detetor 250°C; -Temp. injetor 200°C	2,5-hexanodiona em amostras coletadas no final da jornada dão a melhor estimativa de exposição total. Cerca de 3mg/g de creatinina de 2,5HD corresponde a 50ppm de n-hexano no ar.	MUTTI *et al.* 1984
1mL	- Hidrólise ácida pH = 0,1 aquecida a 100°C por 30min. -Coluna SEP-PAK C_{18} eluida com metanol seguido de 2mL de diclorometano -3-metilciclopentanona PI	-Coluna capilar de sílica (30m x 0,25mm) DB-5; -He, gás carreador 2mL/min.; -Temp. coluna 30°C - 270°C, diferentes razões de aumento; -Temp. detetor 300°C; -Temp. injetor 250°C	Máxima relação de detecção dos metabólitos do n-hexano em pH = 0,1 após aquecimento a 100°C por 30 min.	FEDTKE & BOLT, 1986b
5mL	- Hidrólise ácida com 1ml de HCl concentrado -Aquecida a 100°C por 45min. -Coluna SEP-PAK C_{18} eluida com acetonitrila; -2mL de diclorometano -Ciclohexanona como PI	-Coluna capilar de sílica (50m x 0,25mm) DB-5; -He, gás carreador 2mL/min.; -Temp. coluna 60°C - 200°C, com aumento de 5°C/min.; -Temp. detetor e injetor 210°C; -Razão de split 1/10	Trabalho que verifica bons resultados quando a eluição da coluna C_{18} é feita com acetonitrila, recuperação de 79,9% com CV de 2,8%. Traz como valor de referência de 2,5HD 0,49mg/L.	PERBELLINI *et al.* 1986
10mL/pH = 4,8	- 3mL de diclorometano; - Ciclohexanona como PI - Hidrólise enzimática com β-glicuronidase durante 24horas a 37°C, seguida de hidrólise ácida	-Coluna Carbopack com 0,2% de Carbowax 1500; -N_2, gás carreador 20mL/min.; -Temp. coluna 125°C-140°C, aumento de 2°C/min.; -Temp injetor e detetor 225°	Verifica efeito cumulativo da 2,5HD quando a exposição ao n-hexano é elevada. Sugere então uma coleta no início e outra no final para se ter a referência individual.	AHONEN & SCHIMBERG, 1988

Tabela 5 (Cont.)

Volume/pH urina	Extração	Características cromatográficas	Observações	Referência
5mL	SEM HIDRÓLISE -2mL de diclorometano -3-metilciclohexanona PI; HIDRÓLISE ENZIMÁTICA -β-glicuronidase/sulfatase 37°C por 24 horas idem a extração sem hidrólise; HIDRÓLISE ÁCIDA -HCl pH = 0,5 aquecer a 100°C por 30min. Idem a extração sem hidrólise	-Coluna capilar (30m x 0,25mm) DB-WAX -He, gás carreador 1mL/min.; -Temp. coluna 60°C - 180°C, com diferentes razões de aumento; -Temp. detetor 250°C; -Temp. injetor 200°C -Razão de split 1/20	Amostras sem hidrólise apresentaram melhor correlação sendo esta linear com a monitorização ambiental.	KAWAI *et al.* 1990
5mL	- Hidrólise ácida com 1mL de HCl concentrado pH = 0,1 aquecida a 100°C por 5min. -Coluna SEP-PAK C_{18} eluida com acetonitrila; -2mL de diclorometano -Ciclohexanona como PI	-Coluna capilar (50m x 0,32mm) Carbowax 1500; -Temp. coluna 80°C - 200°C, com aumento de 10°C/min.	Compara extração com e sem coluna coluna C_{18}, verificam que este extrato "puro", não é tão necessário. A análise sem esta coluna é tão boa quanto com ela, no entanto sem o custo é menor.	PERBELLINI *et al.* 1990b
5mL	- Hidrólise ácida com 2mL de HCl concentrado pH = 0,5 aquecida a 100°C por 45min. -1,5g de NaCl; -1mL de diclorometano -ciclohexanona como PI	-Coluna capilar (30m x 0,25mm) DB-WAX e DB - 1 -He, gás carreador 2mL/min.; -Temp. coluna 50°C - 200°C, com diferentes razões de aumento; -Temp. detetor 200°C; -Temp. injetor 120°C	Trabalho que verifica boa correlação com a monitorização ambiental. A amostra é estável por 30 dias entre -20°C e a 4°C. Foi obtida uma recuperação de 70%.	SAITO *et al.* 1991

Tabela 5 (Cont.)

Volume/pH urina	Extração	Características cromatográficas	Observações	Referência
2,8mL	- derivação com O-(pentafluorobenzil)-hidroxilamina; - 2,4-pentanediona como PI	-Coluna capilar CP-SIL-19 CB (25m x 0,25mm); -H_2, gás carreador 0,8mL/min.; -Temp. coluna 60°C - 200°C, com razão de aumento de 30°C	Bons resultados frente a exposições altas de n-hexano. Para exposições baixas, DIC não parece ser sensível o suficiente.	KÉZIC & MONSTER, 1991
5mL	SEM HIDRÓLISE -2mL de diclorometano -3-metilciclohexanona PI; HIDRÓLISE ÁCIDA -HCl pH = 0,3 - 0,5, aquecer a 100°C por 30min. idem a extração sem hidrólise	-Coluna capilar (30m x 0,25mm) DB-WAX, e DB - 1 (60m x 0,25mm) -N_2, gás carreador 1mL/min.; -Temp. coluna 50°C - 230°C, com diferentes razões de aumento; -Temp. detetor e injetor: 250°C; -Injeção tipo splitless	Estes trabalhos comprova que quando a hidrólise ácida é feita com pH < 0,5 e com uma coluna capilar apolar como a DB - 1, a separação da 2,5HD é boa, não sendo confundida com 2-acetilfurano, substância formada em determinadas situações de hidrólise. Boa correlação de 2,5HD urinária sem hidrólise com a determinação de n-hexano no ar.	KAWAI *et al.* 1991a, b e 1992a, b
5mL	- Derivação com n-butilamina; -Aquecer a 60°C por 30min.; - 1mL éter isopropílico, NaCl e sulfato dodecil de sódio;	- Coluna capilar (25m x 0,32mm) DB-5-metilfenilsilicone, e DB - 1 (60m x 0,25mm) -He, gás carreador 2mL/min.; -Temp. coluna 100°C - 250°C, com diferentes razões de aumento; -Temperatura. detetor: 250°C; -Temperatura injetor: 220°C.	Trabalho que traz como método a derivação da 2,5HD a n-butil-2,5-dimetilpirrol foram obtidos bons resultados.	VOHRA & GAIND, 1992

Tabela 5 (Cont.)

Volume/pH urina	Extração	Características cromatográficas	Observações	Referência
5mL	- Hidrólise ácida com 1mL de HCl concentrado pH = 0,1 aquecida a 100°C por 45min. -Coluna SEP-PAK C_{18} eluida com acetonitrila; -2mL de diclorometano -Ciclohexanona como PI	-Coluna capilar de sílica (50m x 0,32mm) SE-54; -H_2, gás carreador 1mL/min.; -Temp. coluna 80°C de início com aumento de 10°C/min.; -Temp. detetor 225°C; -Temp. injetor 200°C -Razão de split 1/20	Trabalho que verifica que o nível de 5mg 2,5HD/g de creatinina, preconizado com a ACGIH é coerente, com a exposição que pode vir a representar algum risco ao trabalhador exposto ao n-hexano.	CARDONA *et al.* 1993
5mL	SEM HIDRÓLISE -2mL de diclorometano -ciclohexanona como PI	-Coluna capilar (10m x 0,25mm) CP-SIL-43-CB -N_2, gás carreador 1,8mL/min.; -Temp. coluna 50°C - 180°C, diferentes razões de aumento; -Temp. detetor 250°C; -Temp. injetor 200°C -Razão de split 1/10	O trabalho comparou a técnica descrita com outras duas que incluia derivação e detecção por captura de elétrons. O método proposto é o de escolha pois além da boa resposta é de maior simplicidade.	VAN ENGELEN *et al.* 1995
5mL	- Hidrólise ácida com 1mL de HCl concentrado pH = 0,1 aquecida a 100°C por 45min. -Coluna SEP-PAK C_{18} eluida com acetonitrila; -2mL de diclorometano -Ciclohexanona como PI	-Coluna capilar (50m x 0,32mm) SE54 -H_2, gás carreador 1,0mL/min.; -Temp. coluna 80°C - 200°C, razão de aumento de 10°C/min.; -Temp. detetor 225°C; -Temp. injetor 200°C -Razão de split 1/20	Trabalho que verifica aumento nos níveis de 2,5HD urinária quando ocorre co-exposição n-hexano e acetona.	CARDONA *et al.* 1996

2.6.2. Biomarcadores de efeito

Há poucos estudos sobre biomarcadores de efeito para exposição ocupacional ao n-hexano. Em um estudo foi verificado que há uma diminuição dose-dependente na quimiotaxia de polimorfonucleares (PMN), quando doses progressivas de 2,5HD são adicionadas a suspensões de PMN. O trabalho coloca ainda que, como houve uma inibição significativa da quimiotaxia em trabalhadores cujos níveis de 2,5HD estavam abaixo do preconizado pela *American Conference of Governamental Industrial Hygienists* (ACGIH), este pode vir a ser um biomarcador para detectar a exposição ocupacional a níveis de n-hexano abaixo do preconizado até então (GOVERNA *et al.* 1994).

Outro possível biomarcador de efeito são os chamados aductos de hemoglobina. Experimentos em ratos expostos a γ-dicetonas tem mostrado que formação de aductos de hemoglobina é proporcional a ambos, tempo e dose de exposição. Aparentemente, a formação de aductos tem se mostrado casualmente relacionada com o desenvolvimento da neuropatia, por isso, pode vir a ser um indicador de efeito para exposição ao n-hexano (COSTA, 1996).

3. OBJETIVOS E PLANO DE TRABALHO

3.1. Objetivos

Este trabalho teve como objetivos:

- Padronizar e validar um método cromatográfico para determinação da 2,5-hexanodiona urinária, comparando as técnicas com e sem hidrólise prévia da urina, visando estabelecer qual a melhor forma de se avaliar este indicador biológico da exposição ocupacional ao n-hexano.

3.2 Plano de Trabalho

Foi delineado um plano de trabalho para se atingir os objetivos propostos, sendo o mesmo distribuído nos seguintes itens:

- Revisão bibliográfica de vários aspectos da exposição ao n-hexano, particularmente dos métodos analíticos propostos para a determinação da 2,5-hexanodiona.
- Padronização e validação de um método por cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama, através do estudo de sua linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação, precisão, efeito da matriz, exatidão e estabilidade.
-Determinação da 2,5-hexanodiona em urina, com e sem hidrólise ácida prévia, de indivíduos ocupacionalmente expostos ao n-hexano em indústrias de calçados.
- Avaliação dos resultados obtidos por confronto com os relatos da literatura.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Casuística

As amostras de urina (n_{total} = 87), destinadas à determinação da 2,5-hexanodiona (2,5HD), foram obtidas de trabalhadores expostos ao n-hexano, pelo manuseio direto de cola, em indústrias de calçados (n = 52) e de trabalhadores não expostos (do setor administrativo das mesmas indústrias) que constituíram o grupo controle (n= 35).

No processo de amostragem, foram incluídas sete indústrias, da cidade de São João Batista – SC, onde o número total de funcionários, variou de 15 a 130.

A forma de exposição no manuseio da cola diferiu entre as indústrias: algumas utilizavam pistola de aplicação, outras apenas um pincel, o que favorecia a absorção pela via dérmica, além da via respiratória. Em somente uma das sete indústrias, com maior proteção do trabalhador, a aplicação era feita em uma mini capela com um sistema de exaustão. Equipamentos de proteção individual não era prática aplicada em nenhuma das indústrias que fizeram parte do estudo. Quanto ao tipo de operação relativamente ao processo ao qual o trabalhador estava exposto, as indústrias foram classificadas em três tipos:

Tipo 1: aquela que possuía o sistema de exaustão, onde a aplicação era realizada em uma mini capela,

Tipo 2: aquelas que utilizavam uma pistola para manusear a cola

Tipo 3: aquelas na qual o manuseio da cola, era realizado apenas com o auxílio de um pincel.

A carga horária destes trabalhadores era de oito horas diárias, cinco dias por semana, (totalizando 40 horas semanais). O ritmo de produção variava sazonalmente, existindo períodos de alta e de baixa produção. A

coleta foi realizada no período de alta produção, no fim da jornada do quinto dia de trabalho da semana.

A urina, proveniente de única micção, foi coletada diretamente em frasco de polietileno previamente preparado (descontaminado, com hipoclorito de sódio e água destilada). Após a coleta, as amostras foram mantidas e transportadas, em geladeira de isopor, no mesmo dia, até o laboratório onde foram realizadas as medidas de densidade e determinação da creatinina. Após estas análises as amostras foram conservadas a -20°C até o momento da determinação da 2,5-hexanodiona. As amostras do grupo controle passaram pelo mesmo tratamento que as do grupo exposto.

Os trabalhadores foram submetidos a um questionário (Anexo 1) sobre itens como identificação, condições de trabalho, hábitos pessoais, presença de patologias e uso de medicamentos. Também assinaram um termo de consentimento pós informação de participação no trabalho (Anexo 2). O protocolo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências farmacêuticas da Universidade de São Paulo (Anexo 3). As Tabelas de 6 a 12 mostram a distribuição dos indivíduos envolvidos no estudo por indústrias segundo os dados obtidos no questionário, considerados de relevância para o presente estudo: hábito de fumar, hábito de beber, tempo de trabalho, e tipo de indústria (segundo a classificação descrita anteriormente).

TABELA 6: Distribuição dos trabalhadores quanto ao hábito de fumar, hábito de beber, tempo de trabalho e tipo de operação, na indústria 1 (n=16)

Paciente	Hábito de Fumar	Habito de Beber	Tempo trabalho	Tipo de operação
Grupo exposto				
A.J.S.	Não	Não	48 meses	2
A.S.G.	Sim	Sim	60 meses	2
E.C.	Não	Sim	3 meses	2
E.C.	Não	Sim	24 meses	2
E.M.S.	Não	Sim	3 meses	2
I.P.F.	Não	Não	3 meses	2
J.R.	Não	Sim	3 meses	2
M.T.S.	Não	Sim	18 meses	2
P.A.P.L.	Não	Sim	48 meses	2
R.O.	Sim	Sim	60 meses	2
Grupo controle				
C.M.P.	Não	Não	27 meses	2
E.A.S.	Não	Sim	24 meses	2
E.C.C.	Não	Não	14 meses	2
M.M.	Não	Não	60 meses	2
R.A.V.	Não	Sim	60 meses	2
S.A.M.	Não	Não	60 meses	2

TABELA 7: Distribuição dos trabalhadores quanto ao hábito de fumar, hábito de beber, tempo de trabalho e tipo de operação, na indústria 2 (n=4)

Paciente	Hábito de Fumar	Hábito de Beber	Tempo trabalho	Tipo de operação
Grupo exposto				
G.M.	Não	Sim	66 meses	2
P.J.S.	Não	Sim	----	2
Grupo controle				
E.R.	Não	Sim	48 meses	2
H.E.S.	Não	Sim	132 meses	2

TABELA 8: Distribuição dos trabalhadores quanto ao hábito de fumar, hábito de beber, tempo de trabalho e tipo de operação, na indústria 3(n=17)

Paciente	Hábito de Fumar	Hábito de Beber	Tempo trabalho	Tipo de operação
Grupo exposto				
A.M.P.	Não	Não	3 meses	3
A.P.T.	Não	Não	3 meses	3
C.T.	Não	Sim	5 meses	3
J.R.	Não	Sim	3 meses	3
M.C.S.	Não	Não	---	3
M.R.S.	Não	Não	3 meses	3
M.S.	Não	Não	3 meses	3
R.V.S.	Sim	Não	3 meses	3
S.G.	Não	Não	3 meses	3
S.P.	Não	Não	3 meses	3
T.V.	Não	Sim	14 meses	3
Grupo controle				
A.C.	Não	Não	30 meses	3
C.C.	Não	Não	48 meses	3
D.D.	Não	Não	3 meses	3
N.F.	Não	Não	21 meses	3
N.S.A.S.	Não	Não	6 meses	3
W.S.S.	Não	Não	6 meses	3

TABELA 9: Distribuição dos trabalhadores quanto ao hábito de fumar, hábito de beber, tempo de trabalho e tipo de operação, na indústria 4 (n=18)

Paciente	Hábito de Fumar	Hábito de Beber	Tempo trabalho	Tipo de operação
Grupo exposto				
A.S.	Não	Sim	—	1
A.S.	Sim	Não	6 meses	1
C.A.	Não	Não	36 meses	1
C.F.S.	Não	Não	---	1
E.S.	Não	Sim	84 meses	1
J.	---	---	36 meses	1
L.P.P.	Não	Não	48 meses	1
M.E.S.	Não	Não	54 meses	1
M.L.			84 meses	1
P.M.S.	Não	Não	72 meses	1
R.C.	Não	Sim	3 meses	1
Grupo controle				
A.C.	Não	Sim	60 meses	1
D.S.G.	Sim	Não	60 meses	1
J.S.	Não	Sim	41 meses	1
M.A.P.	Não	Sim	60 meses	1
M.D.S.S.	Não	Sim	---	1
P.K.	---	---	---	1
S.A.G.	Não	Sim	—	1

TABELA 10: Distribuição dos trabalhadores quanto ao hábito de fumar, hábito de beber, tempo de trabalho e tipo de operação, na indústria 5 (n=6)

Paciente	Hábito de Fumar	Hábito de Beber	Tempo trabalho	Tipo de operação.
Grupo exposto				
S.G.	Não	Não	3 meses	3
S.S.	Não	Não	24 meses	3
T.R.S.	Não	Não	60 meses	3
Grupo controle				
F.M.N.	Não	Não	3 meses	3
G.M.	Não	Não	120 meses	3
M.P.	Sim	Sim	6 meses	3

TABELA 11: Distribuição dos trabalhadores quanto ao hábito de fumar, hábito de beber, tempo de trabalho e tipo de operação, na indústria 6 (n=8)

Paciente	Hábito de Fumar	Hábito de Beber	Tempo trabalho	Tipo de operação
Grupo exposto				
C.N.	Não	Sim	13 meses	2
L.C.G.	Não	Não	3 meses	2
M.M.P.	Não	Sim	5 meses	2
P.R.R.	Não	Não	3 meses	2
T.A.S.	Não	Não	3 meses	2
Grupo controle				
E.T.M.	Não	---	---	2
O.A.S.	Não	Sim	24 meses	2
R.S.A.	Não	Sim	132 meses	2

TABELA 12: Distribuição dos trabalhadores quanto ao hábito de fumar, hábito de beber, tempo de trabalho e tipo de operação, na indústria 7 (n=18)

Paciente	Hábito de Fumar	Hábito de Beber	Tempo trabalho	Tipo de operação
Grupo exposto				
A.A.F.	Não	Não	3 meses	2
A.R.	Não	Sim	3 meses	2
A.V.F.	Não	Sim	4 meses	2
D.D.C.	Não	Não	72 meses	2
E.A.S.C.	Sim	Sim	96 meses	2
I.C.L.	Não	Sim	24 meses	2
J.B.F.	Não	Sim	5 meses	2
J.R.	Sim	Sim	3 meses	2
J.T.	Não	Sim	12 meses	2
S.M.S.	Não	Não	6 meses	2
Grupo controle				
A.L.S.	Não			2
C.F.P.	Não	Não		2
C.V.G.	Não		24 meses	2
D.V.	Não	Não	24 meses	2
E.C.	Não	Não	54 meses	2
M.E.V.F.	Não	Não	36 meses	2
R.H.S.	Não	Sim	3 meses	2
R.S.L.	Não	Não	10 meses	2

4.2. Material

4.2.1. Reagentes

Diclorometano (Merck), 99.5%

Ciclohexanona (Aldrich), 99.8%

2,5-hexanodiona (Merck), > 98%

Cloreto de Sódio (Merck), 99.5%

Ácido Clorídrico fumegante (Merck)

Metanol (Lichrosolv), 99.9%

Solução tampão Citrato Ácido Clorídrico pH 4,0 e Fosfato pH 7,0 (Merck)

Kit Labtest Diagnóstica para Creatinina

4.2.2. Soluções padrão

A solução padrão estoque de 2,5HD 1mg/mL foi preparada, pela dissolução de 100mg de padrão 2,5HD em 100mL de água destilada. Esta solução era preparada a cada três meses e conservada a 4°C.

A solução de ciclohexanona 0,5mg/L foi utilizada como padrão interno (PI) e preparada por dissolução de 50mg de padrão de ciclohexanona em 100mL de água destilada. Esta solução também era preparada a cada três meses e conservada a 4°C.

4.2.3. Equipamentos, acessórios e vidraria

Cromatógrafo a gás Hewlett Packard modelo HP 6890, equipado com detetor de ionização de chama (FID);

Integrador Hewlett Packard modelo 3395;

Seringa de vidro Hewlett Packard 10μL;

Coluna capilar HP 1 (15m x 530μm, e espessura do filme 1,5μm);

Agitador de tubos Phoenix, modelo AT 56

Balança analítica Sartorius® – modelo R200D;

Centrífuga clínica Spin IV;

Medidor de pH Digimed, modelo DMPH-2

Banho de água Ética;

Espectrofotômetro UV - visível - Intralab DMS 80.

Tubos de centrífuga;

Pipetas automáticas Labsystems (10-40; 40-200; 200-1000 e 1000-5000µL);

Balões volumétricos (25, 50 e 100mL);

Pipetas *Pasteur*;

Béquers afunilados (5mL)

Béqueres;

Frascos de polietileno.

4.3. Método

4.3.1. Padronização do método analítico para determinação da 2,5-hexanodiona urinária

Para a padronização do método analítico foi preparado um *pool* de urina, obtido de funcionários e alunos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. As amostras colhidas foram homogeneizadas e enriquecidas no momento de uso, com solução padrão de 2,5-hexanodiona em diferentes concentrações, para o preparo da curva de calibração e estudo dos parâmetros de validação.

Após a revisão da literatura, optou-se pela extração e identificação do analito da urina segundo o método proposto por Kawai, T *et al.* 1990; com algumas modificações que visaram otimizar a análise.

4.3.1.1. Otimização das condições cromatográficas

Para melhor separação cromatográfica da 2,5 hexanodiona nas amostras, foram estabelecidas as seguintes condições:

- Coluna HP1 (15m x 530μm) e espessura do filme 1,5μm
- Temperatura do detetor 250°C
- Fluxo He 4,2 mL/min.
- Fluxo de ar sintético 300mL/min.
- Fluxo H_2 30mL/min.
- Fluxo N_2 20mL/min.
- Temperatura do injetor 200°C
- Injeção tipo "*splitless*"
- Temperatura inicial do forno 50°C por 2min.;

1ª rampa: 5°C/min. até 100°C, por 2min.;

2ª rampa: 20°C/min. até 180°C, por 1min..

4.3.1.2. Linearidade do instrumento

Para determinar a linearidade do equipamento e estabelecer o intervalo de tempo de retenção relativo (tempo de retenção do analito em relação ao do PI), soluções de padrão de 2,5-hexanodiona nas concentrações 0,2; 2,0; 5,0 e 10mg/L contendo também, 60μL de ciclohexanona (PI) a 0,5mg/mL (0,03mg) foram submetidas ao método descrito no item 4.3.2.1.

4.3.2. Determinação da 2,5-hexanodiona urinária

Para determinar a concentração da 2,5HD urinária, foram realizados dois procedimentos:

1. Extração direta líquido - líquido da 2,5HD utilizando diclorometano como solvente extrator;
2. Tratamento prévio da urina, promovendo a hidrólise em meio ácido e em seguida extração líquido – líquido com diclorometano.

4.3.2.1. Determinação de 2,5-hexanodiona, sem e com hidrólise urinária

O procedimento analítico para determinação de 2,5-hexanodiona, sem e com hidrólise urinária diferiu no tratamento prévio da urina com ácido clorídrico concentrado. A continuidade do procedimento após a realização da hidrólise ácida, foi comum às duas formas de extração da 2,5-hexanodiona conforme descrito a seguir:

- Em tubo de centrífuga foi adicionado 5mL de urina; 1g de NaCl; 60μL de ciclohexanona (0,5mg/mL) e 2mL de diclorometano; seguido de:
- Agitação em vortex por 1min. e 30seg.;
- Centrifugação a 3000rpm (2315 g) por 12min.;
- Separação das fases aquosa e orgânica;
- Após, foi injetado 1μL da fase orgânica no cromatógrafo em fase gasosa, segundo as condições especificadas em 4.3.1.1.

As Figura 5 e 6 mostram, respectivamente, a marcha analítica da extração da 2,5HD, sem e com hidrólise urinária.

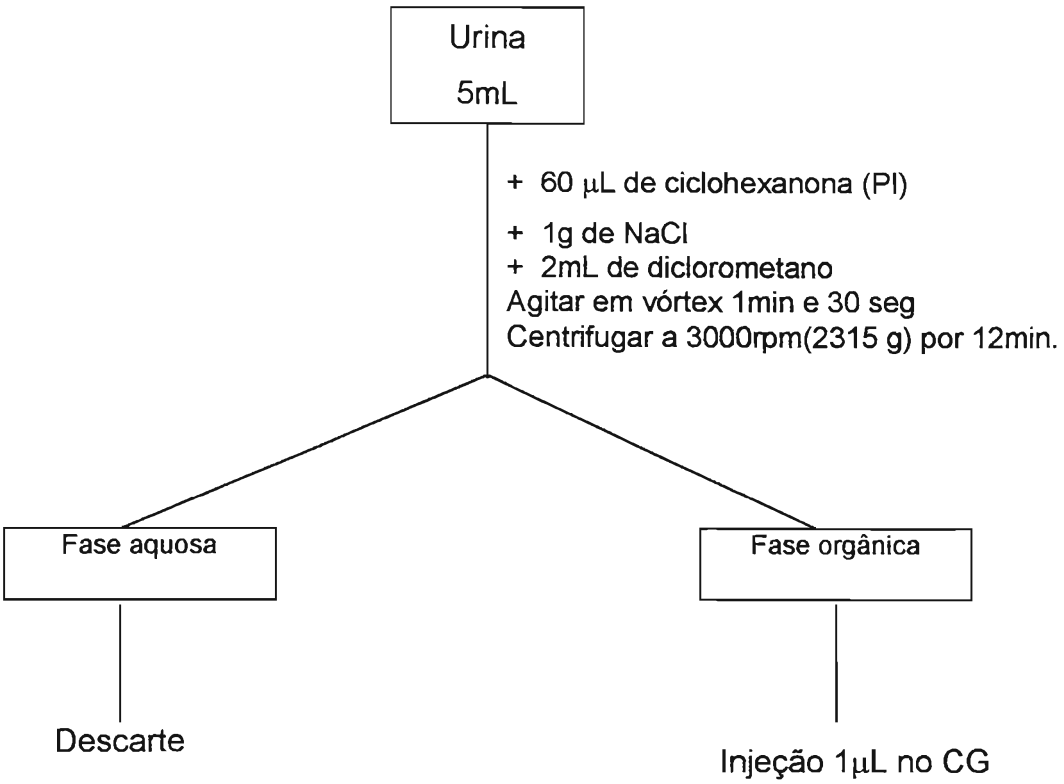

Figura 5: Marcha analítica usada na determinação da 2,5-hexanodiona sem hidrólise urinária

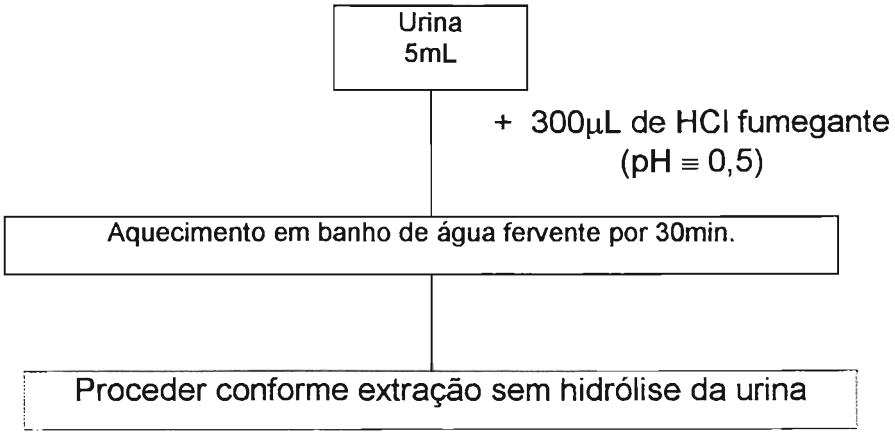

Figura 6: Marcha analítica da determinação da 2,5-hexanodiona com hidrólise urinária.

4.3.3. Validação do método analítico para determinação da 2,5-hexanodiona urinária

No processo de validação do método proposto foram avaliados os parâmetros: limite de detecção e de quantificação, efeito da matriz, com e sem hidrólise, precisão inter e intra-dias, recuperação, exatidão e estabilidade descritos a seguir.

4.3.3.1. Limite de Quantificação

O limite de quantificação do método, foi a menor concentração medida com precisão adequada, e com coeficiente de variação (CV) menor ou igual a 10%, em urina adicionada de 2,5 hexanodiona. Para a realização das análises foi usado o procedimento descrito no item 4.3.2.1. (n=10).

4.3.3.2. Limite de Detecção

O limite de detecção do método encontrado por diluições sucessivas da amostra, adicionada de 2,5-hexanodiona, foi a concentração mínima com sinal diferente de zero e com coeficiente de variação menor que 20%. Para a realização das análises foi usado o procedimento descrito no item 4.3.2.1. (n=10).

4.3.3.3. Linearidade sem hidrólise da urina

Para verificar a faixa de linearidade do método foram adicionadas ao *pool* de urina, solução padrão de 2,5HD, para se obter as seguintes concentrações 0,1; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0mg/L. As amostras e o branco de urina, foram

analisadas segundo procedimento descrito no item 4.3.2.1. (n=5).

4.3.3.4. Linearidade com hidrólise

Para verificar a linearidade do método, após hidrólise da urina, foram adicionadas ao *pool* de urina, solução padrão de 2,5HD, para se obter as seguintes concentrações 0,1; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0mg/L. As amostras e o branco de urina, foram analisadas segundo procedimento descrito no item 4.3.2.2. (n=5).

4.3.3.5. Curva de calibração

Foram adicionadas ao *pool* de urina, soluções de padrão de 2,5HD, para se obter as concentrações 0,1; 2,0; 5,0 e 10mg/L. As análises dos adicionados e do branco foram realizadas conforme os procedimentos descritos no item 4.3.2. e utilizando a equação da reta obtida através da regressão linear foram calculadas as concentrações de 2,5HD nas amostras. A curva de calibração foi preparada para análise de cada lote de amostras.

4.3.3.6. Efeito da matriz sem hidrólise da urina

Amostras de água enriquecidas nas concentrações de 0,1; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0mg/L de 2,5HD e o branco, foram analisadas conforme o método descrito no item 4.3.2.1. (n=5). Os dados deste estudo foram comparados com os do estudo de linearidade sem hidrólise da urina, para avaliar a interferência da matriz biológica na análise.

4.3.3.7. Efeito da matriz com hidrólise da urina

Amostras de água enriquecidas nas concentrações de 0,1; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0mg/L de 2,5HD e o branco, foram analisadas conforme o método descrito no item 4.3.2.2. (n=5). Os dados deste estudo foram comparados com os do estudo da linearidade com hidrólise da urina, para avaliar a interferência da matriz biológica na análise após a hidrólise em meio ácido.

4.3.3.8. Estabilidade

Amostras do "pool" de urina com 0,1 e 5,0mg/L de 2,5HD foram preparadas e armazenadas em alíquotas (≈ 16mL) até serem analisadas segundo o procedimento descrito no item 4.3.2.1., nas seguintes condições:

- Estabilidade a temperatura ambiente 0; 24 e 48h;
- Estabilidade em geladeira (4°C), análise semanal por 7 semanas;
- Estabilidade em *freezer* (-20°C), análise semanal por 15 semanas
- Estabilidade após 2 e 3 ciclos de congelamento e descongelamento.

4.3.3.9. Precisão

Amostras de urina enriquecidas nas concentrações 0,1; 5,0 e 10mg/L de 2,5HD, foram preparadas e em seguida analisadas como descrito no item 4.3.2.1. (n=6), em um dia para determinar a precisão intra-dia, e em três dias para determinar a precisão interdias.

4.3.3.10. Recuperação relativa sem hidrólise

A recuperação da 2,5 hexanodiona das amostras de urina, foi avaliada por comparação da concentração obtida, quando a amostra, contendo padrão de 2,5HD e PI, foi submetida ao processo de extração, em relação a concentração obtida quando a amostra contendo somente PI passa pela extração e depois o padrão de 2,5HD é adicionado na fração orgânica. As análises foram realizadas conforme descrito no item 4.3.2.1.(n=5).

A porcentagem de recuperação do analito foi obtida aplicando –se a equação:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração amostra}}{\text{Conc. branco adicionado}} \times 100$$

4.3.3.11. Recuperação relativa após hidrólise da urina

A recuperação da 2,5 hexanodiona das amostras de urina após a hidrólise ácida, foi avaliada por comparação da concentração obtida, quando a amostra, contendo padrão de 2,5HD e PI, foi submetida ao processo de hidrólise em meio ácido seguida de extração, em relação a concentração obtida quando a amostra contendo somente PI passa pela hidrólise seguida da extração e depois o padrão de 2,5HD é adicionado na fração orgânica. As análises foram realizadas conforme descrito no item 4.3.2.2.(n=5).

A porcentagem de recuperação do analito foi obtida aplicando –se a equação, descrita no item anterior.

4.3.3.12. Exatidão

Amostra de referência, contendo 2,5 HD em urina simulada, doada por uma instituição que utiliza o controle inter-laboratorial da Finlândia, foi tratada conforme método descrito em 4.3.2.1.. A inexatidão foi calculada pela tendenciosidade (*bias*) de acordo com a equação:

$$\text{Inexatidão } \% = \frac{\text{Conc. Obtida} - \text{Conc. esperada}}{\text{Concentração Esperada}} \times 100$$

4.3.4. Determinação da 2,5-hexanodiona em urina de trabalhadores

Amostras de urina dos trabalhadores expostos ao n-hexano em indústria de calçados, e do grupo controle foram analisadas conforme os procedimentos descritos em 4.3.2., para a determinação de 2,5-hexanodiona. A concentração de 2,5HD foi expressa em mg/g de creatinina. A determinação de creatinina foi feita por método colorimétrico padrão, utilizando Kit da "LabTest".

4.4.4. Análise Estatística dos resultados

Os resultados obtidos nas determinações da 2,5-hexanodiona em urina de trabalhadores, foram expressos por meio da média, desvio padrão, mediana e limites inferior e superior.

Para comparar os métodos com e sem hidrólise da urina foi aplicado o teste WILCOXON (Teste não paramétrico para amostras pareadas). Para avaliar as variáveis independentes, do questionário aplicado com os trabalhadores como: hábitos de fumar e de beber, tempo de trabalho e tipo de indústria foi aplicado o teste KRUSKALL-WALLIS (Teste não paramétrico para amostras não pareadas). O valor de $p<0,05$ foi estabelecido como significativo.

5. RESULTADOS

5.1. Otimização das condições cromatográficas

O perfil da separação cromatográfica da 2,5HD e da ciclohexanona, obtido da análise de *pool* de urina adicionados está mostrado na Figura 7.

O tempo de retenção relativo da 2,5 HD (trr) foi de 1,090 $\pm$ 0,002

A equação de regressão obtida neste estudo foi:

$y = 0,1039x + 0,019$ com coeficiente de determinação (r^2) = 0,9989

5.2. Limite de quantificação

O limite de quantificação do método, foi de 0,1mg/L de 2,5HD em urina, que apresentou um coeficiente de variação de 10%.

5.3. Limite de detecção

O limite de detecção do método (n=10) foi de 0,05mg/L de 2,5HD em urina, com coeficiente de variação de 13,6%.

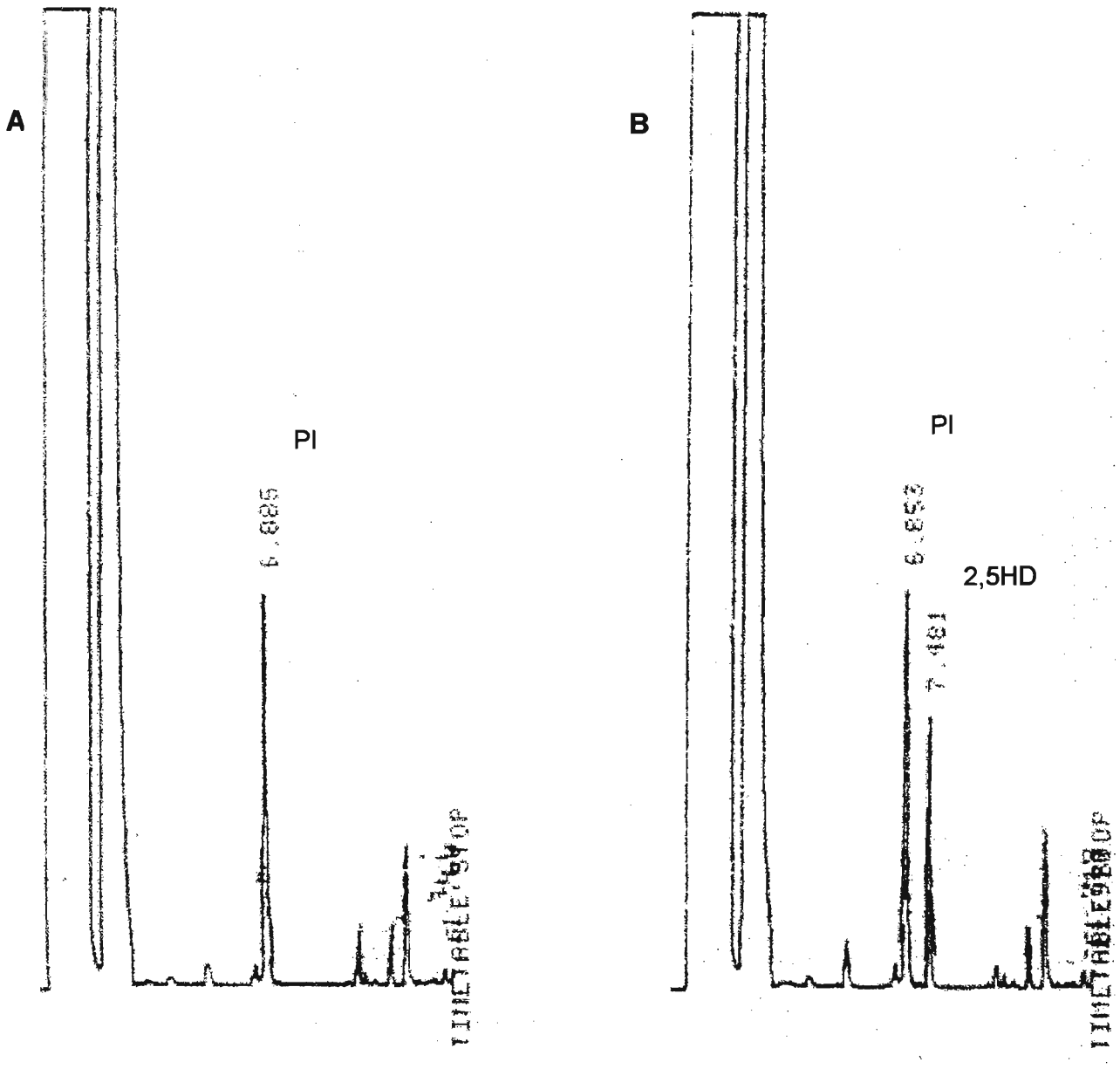

Figura 7: Perfil cromatográfico da 2,5 hexanodiona em urina e padrão interno (ciclohexanona). Cromatogramas: **(A):** branco **(B)**: padrão (5,0mg/L).

5.4. Linearidade sem hidrólise da urina

Na Figura 8 está representada a curva de linearidade de 2,5HD, em amostras de *pool* de urina, nas concentrações de 0,1; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0mg/L. Cada ponto corresponde à média dos valores encontrados na análise em quintuplicata.

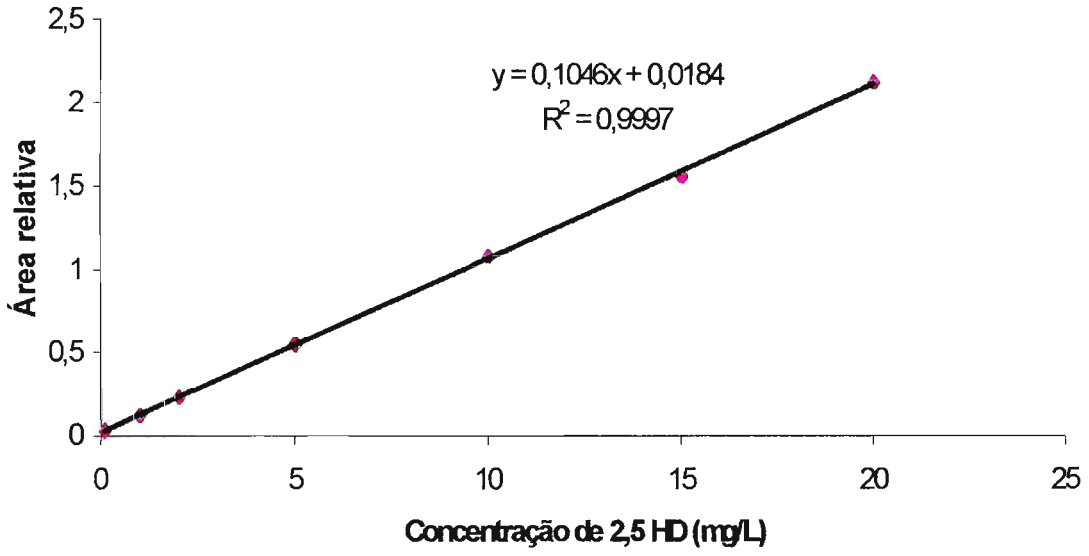

Figura 8: Curva de linearidade de 2,5-hexanodiona em urina.

5.5. Linearidade com hidrólise da urina

Na Figura 9 está representada a curva de linearidade de 2,5HD, em amostras de *pool* de urina, após terem passado pelo processo de hidrólise, nas concentrações de 0,1; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0mg/L. Cada ponto corresponde à média dos valores encontrados na análise em quintuplicata.

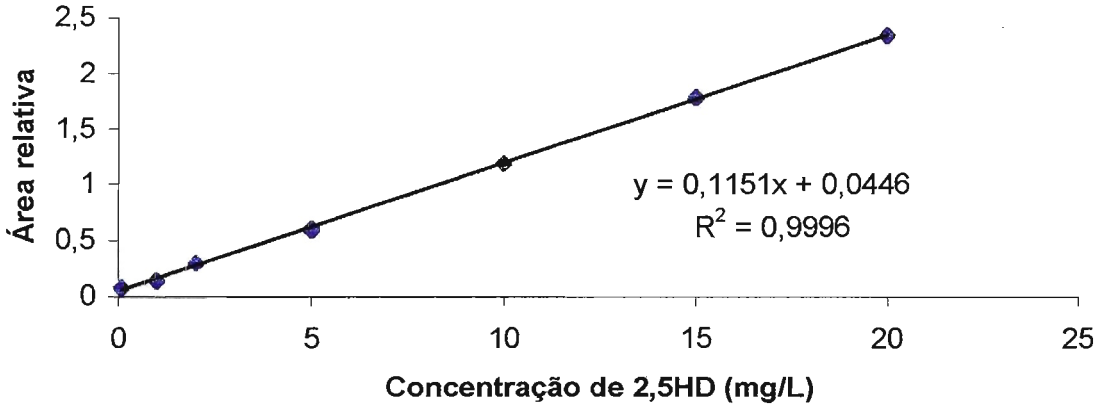

Figura 9: Curva de linearidade da 2,5-hexanodiona, com hidrólise da urina.

5.6. Efeito matriz sem hidrólise

A Figura 10 mostra as curvas obtidas de adicionados de 2,5HD em água e urina, sem hidrólise. Cada ponto corresponde à média dos valores encontrados na análise das concentrações 0,1; 1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0mg/L, em quintuplicata.

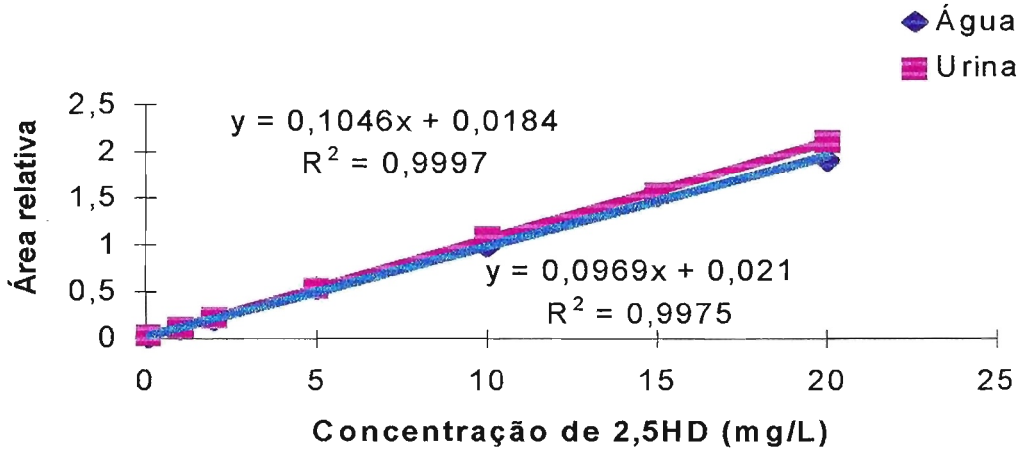

Figura 10: Curva que representam o resultado da interferência da matriz biológica sem hidrólise, na análise de 2,5 hexanodiona, p = 0,064.

5.7. Efeito matriz com hidrólise

A Figura 11 ilustra as curvas obtidas de adicionados de 2,5HD em água e urina, ambos com hidrólise. Cada ponto corresponde à média dos valores encontrados na análise, das concentrações 0,1;1,0; 2,0; 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0mg/L em quintuplicata.

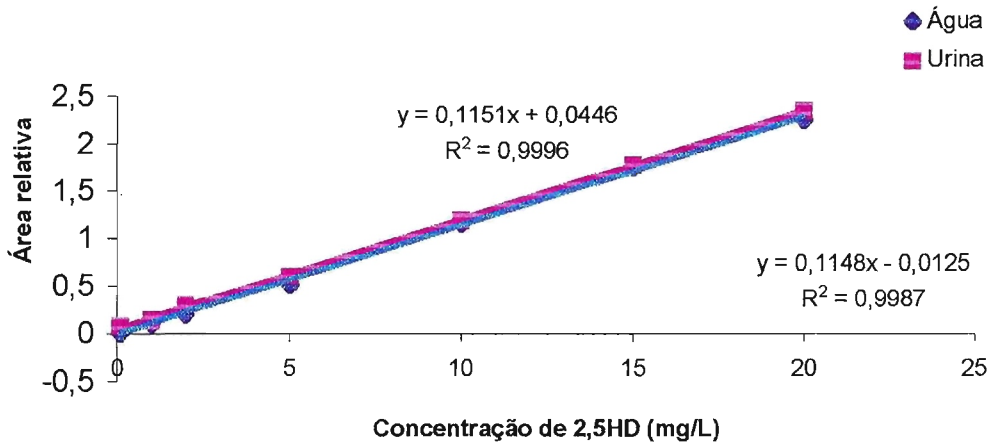

Figura 11: Curva que representa o resultado da interferência da matriz biológica com hidrólise, na análise de 2,5 hexanodiona, p = 0,092.

5.8. Estabilidade

Os resultados do estudo da estabilidade da 2,5-hexanodiona em urina, adicionadas para a concentração de 5,0mg/L, são mostrados nas Tabelas 13, 14, 15 e 16, referindo-se respectivamente a estabilidade à temperatura ambiente, mantidas em geladeira (4°C), mantidas em *freezer* (-20°C) e após 2 e 3 ciclos de congelamento/descongelamento. A concentração obtida, corresponde a média da determinação da 2,5 hexanodiona realizada em triplicata.

Tabela 13: Análise da estabilidade da 2,5HD (5,0mg/L) à temperatura ambiente, nos tempos 0, 24 e 48 horas.

Tempo (horas)	Concentração obtida (mg/L)	Variação (% em relação ao t0)
0	5,0	----
24	4,5	10%
48	4,4	12%

Tabela 14: Estudo da estabilidade da 2,5 hexanodiona (5,0mg/L) em urinas conservadas em geladeira à 4°C.

Tempo (dias)	**Concentração obtida (mg/L)**	**Variação (% em relação ao 1° dia)**
1	5,0	----
2	4.4	12%
3	4.3	14%
4	5.1	02%
5	4.2	16%
6	4.5	10%
7	4.4	12%
14	4.3	14%
21	4.8	04%
28	4.6	08%
35	4.7	06%
42	5.5	10%
49	4.6	08%

Tabela 15: Estudo da estabilidade de 2,5 hexanodiona (5,0mg/L) em urinas conservadas em *freezer* à -20°C.

Tempo (semanas)	**Concentração obtida (mg/L)**	**Variação (% em relação a t0)**
0	5,0	-----
1	4.9	02%
2	4.6	08%
3	4.4	12%
4	4.8	04%
5	4.4	12%
6	4.8	04%
7	5.5	10%
9	4.6	08%
10	4.4	12%
11	4.4	12%
13	4.0	20%
15	4.0	20%

Tabela 16: Estudo da estabilidade de 2,5 hexanodiona (5,0mg/L) em urinas, mantidas em *freezer* à -20°C, após 2 e 3 ciclos congelamento/descongelamento.

Tempo (ciclos)	**Concentração obtida (mg/L)**	**Variação (% em relação a t0)**
0	5.0	----
2	4.5	10%
3	4.8	04%

5.9. Precisão

Os coeficientes de variação obtidos no estudo intra e inter-dias para as amostras de urina adicionadas de 2,5HD para as concentrações de 0,1; 5,0 e 10mg/L são apresentados na Tabela 17.

Tabela 17: Precisão do método analítico para a determinação de 2,5HD urinária, expressa em função dos coeficientes de variação, p=0,071

Concentração de 2,5HD urinária (mg/L)	**Precisão intra dia (CV)**	**Precisão inter dias (CV)**
0,1	10%	12.4%
5,0	3.2%	4.7%
10,0	3.0%	4.1%

5.10. Recuperação sem e com hidrólise da urina

Os valores do estudo da recuperação, dos tratamentos sem e com hidrólise da urina, estão apresentados na Tabela 18, cada ponto corresponde a média de cinco alíquotas.

Tabela 18: Recuperação de 2,5HD adicionada ao *pool* de urina, sem e com hidrólise, nas concentrações de 1,0; 5,0 e 10 mg/L, p=0,071

Concentração de 2,5HD urinária (mg/L)	**Recuperação**	
	Sem hidrólise	**Com hidrólise**
1.0	97.3%	93.6%
5.0	110.0%	98.4%
10.0	97.8%	102.9%

5.11. Exatidão

A exatidão do método, verificada pela análise da amostra de referência, em triplicata, é representada pela tendenciosidade, ou seja a inexatidão, e apresentou um valor de 9,0%.

5.12. Determinação da 2,5-hexanodiona em urina de trabalhadores expostos e não expostos ocupacionalmente ao n-hexano em indústria de calçados

A Figura 12 mostra o perfil cromatográfico da determinação da 2,5HD em urina sem hidrólise (A) e com hidrólise (B), de um trabalhador exposto ao n-hexano. E a Figura 13, mostra o perfil cromatográfico da determinação da 2,5HD em urina sem hidrólise (A) e com hidrólise (B), de um trabalhador não exposto (grupo controle) ao n-hexano.

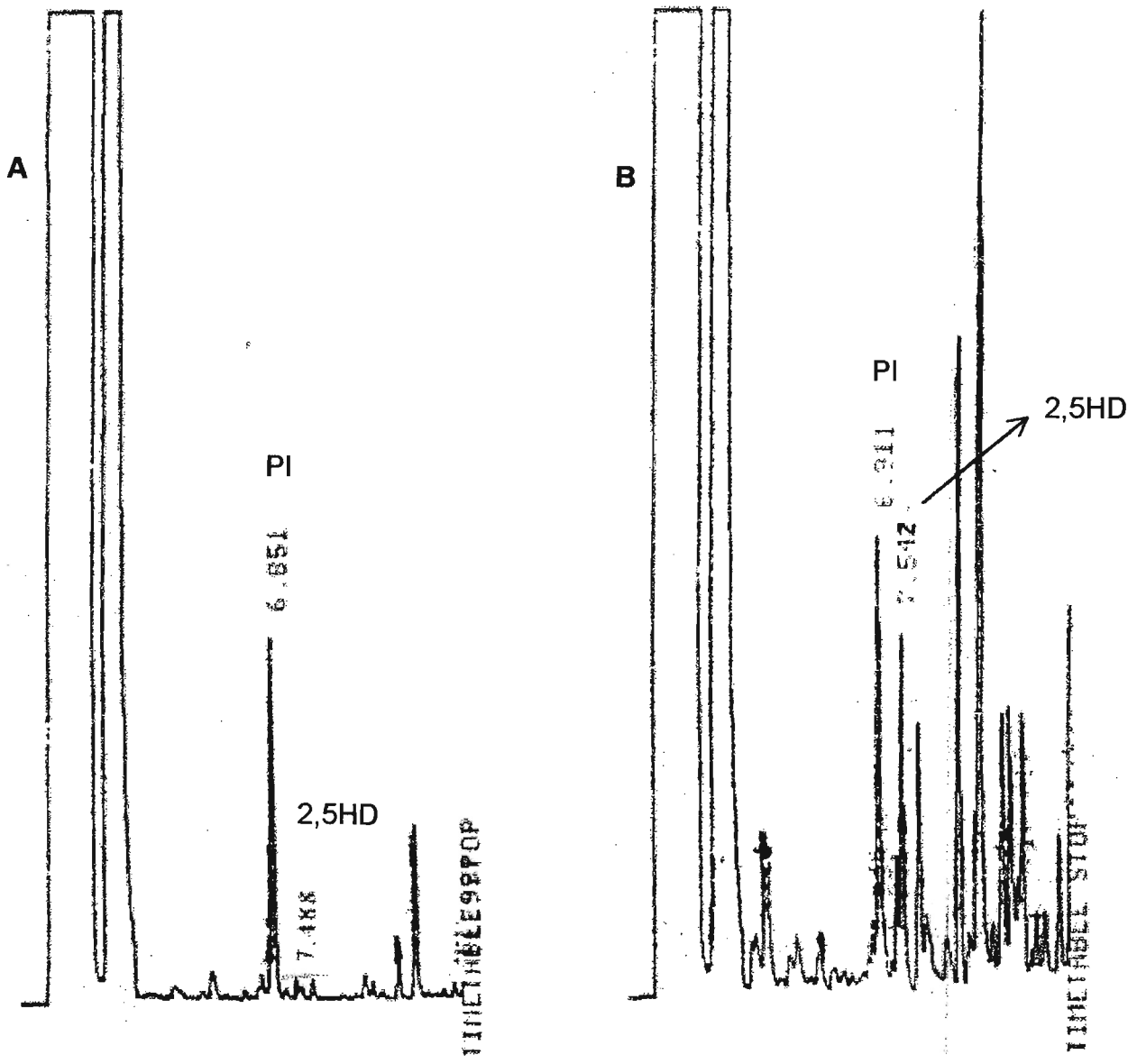

Figura 12: Perfil cromatográfico da determinação da 2,5HD em urina de um trabalhador exposto ao n-hexano. Cromatogramas: (A): urina sem hidrólise (B): urina com hidrólise.

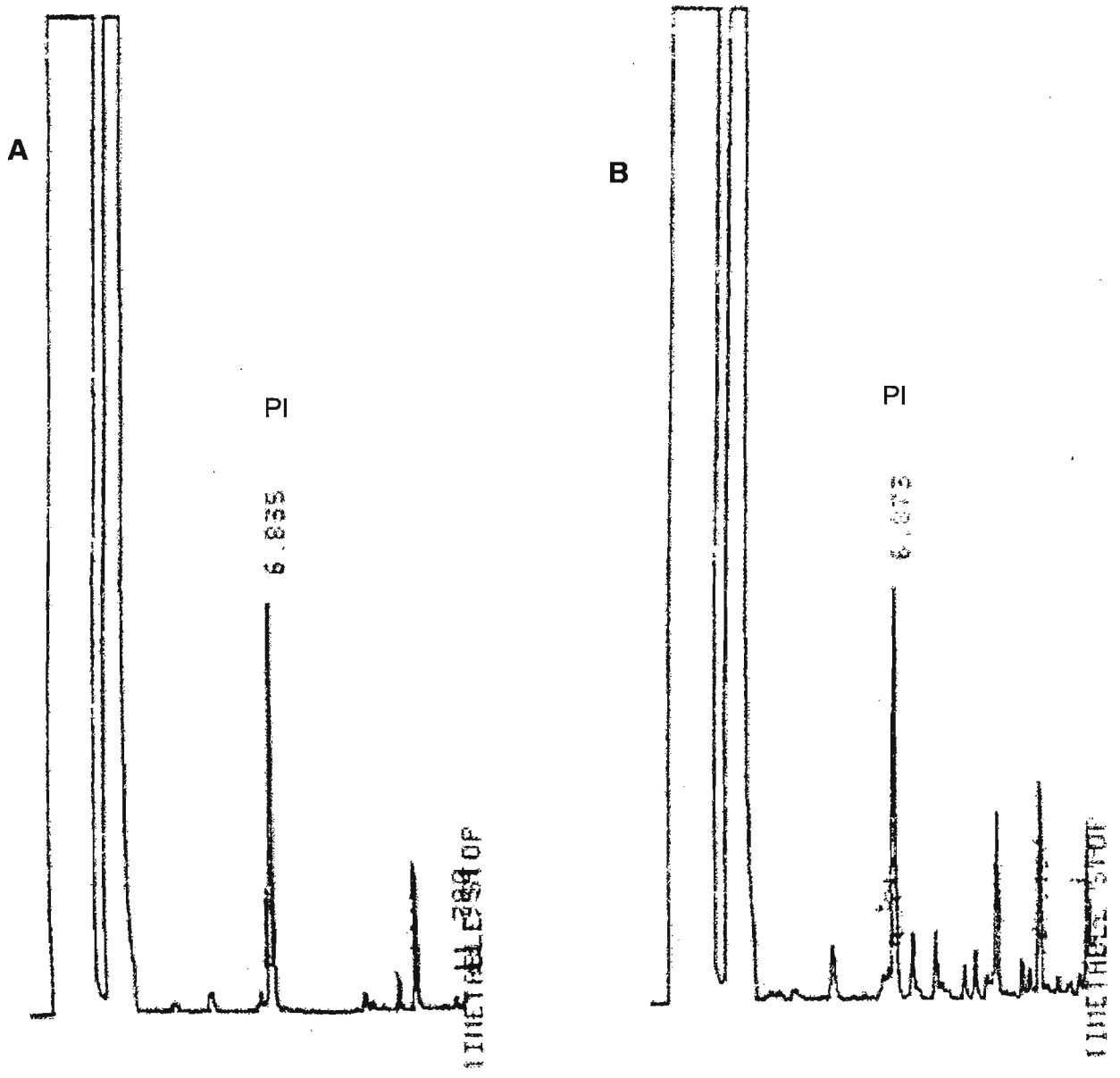

Figura 13: Perfil cromatográfico da determinação da 2,5HD em urina de um trabalhador não exposto (grupo controle) ao n-hexano. Cromatogramas: (A): urina sem hidrólise (B): urina com hidrólise.

Para os trabalhadores do grupo controle, tanto as determinações de 2,5HD com e sem hidrólise da urina, apresentaram valores abaixo do limite de detecção do método (0,05mg/L), sendo encontrados valores quantificáveis em urinas de somente dois trabalhadores do grupo controle, após a hidrólise ácida da amostra, os valores fornecidos foram respectivamente, 0,1mg/L ≈ 0,034mg/g de creatinina e 1,13mg/L ≈ 0,72mg/g de creatinina. As Tabelas de 19 a 25, apresentam os resultados descritivos da determinação da 2,5HD urinária, com e sem hidrólise, em trabalhadores expostos ao n-hexano das indústrias de calçados (1 a 7) conforme descrito na metodologia. Os resultados estão expressos em mg de 2,5HD / g creatinina urinária.

Tabela 19: Valores de 2,5HD em urinas de trabalhadores expostos ao n-hexano (sem e com hidrólise das amostras) expressos em mg/L e em mg de 2,5HD / g de creatinina urinária na Indústria 1

	2,5HD mg/L		**2,5HD mg/g de creatinina**	
Nome	**Sem hidrólise**	**Com hidrólise**	**Sem hidrólise**	**Com hidrólise**
A.J.S.	<LD	0.12	<LD	0.06
A.S.G.	<LD	1.99	<LD	0.73
E.C.	0.2	3.77	0.06	1.27
E.C.	<LD	0.13	<LD	0.04
E.M.S.	<LD	<LD	<LD	<LD
I.P.F.	<LD	1.45	<LD	0.69
J.R.	0.24	1.62	0.08	0.54
M.T.S.	<LD	<LD	<LD	<LD
P.A.P.L.	0.26	1.03	0.09	0.34
R.O.	<LD	<LD	<LD	<LD

LD = Limite de detecção = 0,05mg/L

Tabela 20: Valores de 2,5HD em urinas de trabalhadores expostos ao n-hexano (sem e com hidrólise das amostras) expressos em mg/L e em mg de 2,5HD / g de creatinina urinária na Indústria 2

	2,5HD mg/L		2,5HD mg/g de creatinina	
Nome	**Sem hidrólise**	**Com hidrólise**	**Sem hidrólise**	**Com hidrólise**
G.M.	<LD	<LD	<LD	<LD
P.J.S.	<LD	<LD	<LD	<LD

LD = Limite de detecção = 0,05mg/L

Tabela 21: Valores de 2,5HD em urinas de trabalhadores expostos ao n-hexano (sem e com hidrólise das amostras) expressos em mg/L e em mg de 2,5HD / g de creatinina urinária na Indústria 3

	2,5HD mg/L		2,5HD mg/g de creatinina	
Nome	**Sem hidrólise**	**Com hidrólise**	**Sem hidrólise**	**Com hidrólise**
A.M.P.	<LD	2.87	<LD	1.18
A.P.T.	<LD	0.89	<LD	0.81
C.T.	<LD	0.79	<LD	0.43
J.R.	<LD	1.27	<LD	0.43
M.C.S.	0.61	1.12	0.49	0.90
M.R.S.	<LD	0.18	<LD	0.07
M.S.	<LD	<LD	<LD	<LD
R.V.S.	<LD	0.87	<LD	0.33
S.G.	0.56	6.41	0.19	2.14
S.P.	0.28	1.23	0.13	0.57
T.V.	0.31	2.22	0.11	0.76

LD = Limite de detecção = 0,05mg/L

Tabela 22: Valores de 2,5HD em urinas de trabalhadores expostos ao n-hexano (sem e com hidrólise das amostras) expressos em mg/L e em mg de 2,5HD / g de creatinina urinária na Indústria 4

	2,5HD mg/L		**2,5HD mg/g de creatinina**	
Nome	**Sem hidrólise**	**Com hidrólise**	**Sem hidrólise**	**Com hidrólise**
A.S.	<LD	<LD	<LD	<LD
A.S.	<LD	<LD	<LD	<LD
C.A.	0.05	1.7	0.02	0.58
C.F.S	0.05	1.36	0.02	0.57
E.S.	0.09	1.10	0.03	0.39
J.	<LD	0.1	<LD	0.05
L.P.P.	0.14	2.84	0.06	1.12
M.E.S.	0.12	1.06	0.06	0.48
M.L.	<LD	<LD	<LD	<LD
P.M.S.	0.08	0.98	0.03	0.34
R.C.	<LD	<LD	<LD	<LD

LD = Limite de detecção = 0,05mg/L

Tabela 23: Valores de 2,5HD em urinas de trabalhadores expostos ao n-hexano (sem e com hidrólise das amostras) expressos em mg/L e em mg de 2,5HD / g de creatinina urinária na Indústria 5

	2,5HD mg/L		**2,5HD mg/g de creatinina**	
Nome	**Sem hidrólise**	**Com hidrólise**	**Sem hidrólise**	**Com hidrólise**
S. G.	<LD	0.41	<LD	0.14
S.S.	<LD	2.28	<LD	0.87
T R.S.	<LD	0.40	<LD	0.39

LD = Limite de detecção = 0,05mg/L

Tabela 24: Valores de 2,5HD em urinas de trabalhadores expostos ao n-hexano (sem e com hidrólise das amostras) expressos em mg/L e em mg de 2,5HD / g de creatinina urinária na Indústria 6

	2,5HD mg/L		**2,5HD mg/g de creatinina**	
Nome	**Sem hidrólise**	**Com hidrólise**	**Sem hidrólise**	**Com hidrólise**
C. N.	<LD	0.23	<LD	0.12
L. C. G.	<LD	0.62	<LD	0.20
M. M. P.	<LD	0.20	<LD	0.14
P. R. R.	<LD	1.18	<LD	0.40
T. A. S.	<LD	2.88	<LD	1.03

LD = Limite de detecção = 0,05mg/L

Tabela 25: Valores de 2,5HD em urinas de trabalhadores expostos ao n-hexano (sem e com hidrólise das amostras) expressos em mg/L e em mg de 2,5HD / g de creatinina urinária na Indústria 7

	2,5HD mg/L		**2,5HD mg/g de creatinina**	
Nome	**Sem hidrólise**	**Com hidrólise**	**Sem hidrólise**	**Com hidrólise**
A.A.F.	<LD	0.14	<LD	0.048
A.R.	0.048	0.83	0.016	0.28
A.V.F.	<LD	0.031	<LD	<LD
D.D.C.	<LD	0.049	<LD	<LD
E.A.S.C.	0.003	0.44	0.002	0.29
E.C.	<LD	<LD	<LD	<LD
I.C.L.	<LD	0.065	<LD	0.033
J.B.F.	0.097	0.78	0.046	0.37
J.R.	<LD	0.46	<LD	0.15
J.T.	<LD	<LD	<LD	<LD
S.M.S.	0.12	0.62	0.042	0.22

LD = Limite de detecção = 0,05mg/L

Na Tabela 26 são mostrados os dados do estudo estatístico da comparação dos resultados dos dois métodos.

Tabela 26 – Estudo estatístico da comparação dos métodos sem e com hidrólise da urina para determinação da 2,5 hexanodiona urinária (mg/L)

Método	**Média**	**Mediana**	**Desvio Padrão**	**Mínimo**	**Máximo**	**N**
Sem hidrólise	0,0883	0,025	0,1365	0,025	0,61	52
Com hidrólise	0,942	0,62	1,193	0,025	6,41	52

O estudo estatístico do hábito de fumar, do hábito de beber, do tempo de trabalho e do tipo de indústria, sobre o resultado das análises de 2,5HD urinária em cada método não foi significativo.

6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Vários são os estudos que indicam que a 2,5-hexanodiona é um bom bioindicador na avaliação da exposição ocupacional ao n-hexano, por apresentar boa correlação com os níveis de n-hexano no ambiente de trabalho, já tendo sido inclusive definido o final da jornada de trabalho como o melhor momento da coleta (BRASIL, 1994; ACGIH, 1998).

A metodologia analítica preconizada para esta análise é a cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização de chama (CG – DIC), e o modo de extração mais utilizado é a líquido-líquido com diclorometano, utilizando como padrão interno ciclohexanona ou a 3-metilciclopentanona (PERBELLINI *et al.,* 1981a, PERBELLINI *et al.* 1981b, PERBELLINI *et al.* 1981c; PERBELLINI *et al.* 1982; IWATA, *et al.* 1983; MUTTI *et al.* 1984; FEDTKE & BOLT, 1986b; PERBELLINI *et al.* 1986b, PERBELLINI *et al.* 1990b; AHONEN & SCHIMBERG, 1988, CARDONA *et al.* 1993, CARDONA *et al.* 1996).

A amostra, segundo vários trabalhos, pode passar por diferentes tratamentos prévios, na tentativa de obter resultados mais satisfatórios no que diz respeito a especificidade e sensibilidade. Uma destas, é a purificação da amostra em fase sólida, utilizando colunas de sílica SEP-PAK, C_{18}. Neste caso a amostra é eluída com metanol ou acetonitrila e posterior extração com diclorometano. Os trabalhos mostram que mesmo sendo obtida uma recuperação em torno de 80%, este resultado não justifica a necessidade do uso destas colunas de purificação, principalmente pelo custo consideravelmente elevado que este processo envolve (FEDTKE & BOLT, 1986b; PERBELLINI *et al.* 1986b, PERBELLINI *et al.* 1990; SAITO *et al.* 1991; KAWAI *et al.* 1990; KAWAI *et al.* 1991a, KAWAI *et al.* 1991b; KAWAI *et al.* 1992a, KAWAI *et al.* 1992b; VAN ENGELEN *et al.* 1995; CARDONA *et al.* 1993, CARDONA *et al.* 1996).

Há trabalhos ainda que realizaram como tratamento prévio, uma hidrólise enzimática, seguida de hidrólise ácida (PERBELLINI *et al*, 1981a; PERBELLINI *et al.* 1981b; PERBELLINI *et al.* 1981c; PERBELLINI *et al.* 1982; IWATA *et al.* 1983; MUTTI *et al.* 1984; FEDTKE & BOLT, 1986b; AHONEN & SCHIMBERG, 1988). Em outros, é realizada somente hidrólise ácida, prévia à extração, sendo sugerido um pH entre 0,5 e 0,1, considerado ótimo, melhorando muito sensibilidade da análise. Os estudos que comparam os métodos de tratamento prévio, com e sem hidrólise, mostram que após a hidrólise ácida em pH = 0,1, obtém-se valores de 2,5HD, até cerca de dez vezes mais elevados. Isso porque há a conversão *in vitro* de outros metabólitos do n-hexano, como a 5-hidróxi-2-hexanona e o 2,5-dimetilfurano, em 2,5HD. As conclusões quanto ao melhor método de tratamento prévio a ser seguido ainda são controversas. Há autores que consideram o aumento dos níveis de 2,5HD, como uma forma de aumentar a sensibilidade do método, no entanto há aqueles que considerem este aumento como uma forma de superestimar a exposição do indivíduo (SAITO *et al.* 1991; KAWAI *et al.* 1990; KAWAI *et al.* 1991a, KAWAI *et al.* 1991b; KAWAI *et al.* 1992a, KAWAI *et al.* 1992b; VAN ENGELEN *et al.* 1995).

Com base nos aspectos acima abordados, este trabalho objetivou validar um método para determinar a 2,5HD na urina, comparando as duas técnicas, com e sem hidrólise ácida, utilizando extração líquido-líquido com diclorometano, e assim verificar qual a melhor forma para avaliar a exposição ocupacional ao n-hexano.

Para tanto foi selecionado na literatura um método que tivesse características que poderiam fazer dele, um método de escolha para as análises de biomonitorização.

Como a maior parte dos trabalhos utilizam CG – DIC, e esta instrumentação existe na maioria dos laboratórios que realizam análises

toxicológicas em nosso país, optou-se por desenvolver as análises da 2,5HD urinária com este equipamento.

Para isso era necessário a escolha de uma coluna cromatográfica que permitisse obter baixo tempo de retenção e, ao mesmo tempo, boa separação entre os picos normais de urina e o pico de 2,5HD. Com base, em trabalhos que avaliavam a eficiência das colunas verificou-se que as colunas capilares apolares fornecem boa separação para 2,5HD, inclusive evitando possíveis interferências com substâncias como o 2-acetilfurano (KAWAI *et al.* 1991a; KAWAI *et al.* 1991b; KAWAI *et al.* 1992a; KAWAI *et al.* 1991b). Dentre as várias colunas testadas num estudo prévio, foi selecionada a HP1 da Hewlett Packard, (15m x 530μm com espessura do filme de 1,5μm) sendo obtida com esta boa separação entre os picos do padrão de 2,5HD, do padrão interno (ciclohexanona) e dos outros componentes endógenos da urina (SILVA *et al.* 1999).

O procedimento analítico teve por base o trabalho de KAWAI *et al.* (1990), tanto para técnica de separação e extração do analito, como para os parâmetros de identificação, tais como: rampa de temperatura, temperaturas do injetor e detetor. Foram realizadas algumas modificações com o objetivo de otimizar as condições analíticas, como por exemplo a razão de *split,* que no presente estudo foi estabelecido o uso de injeção tipo *splitless*, na tentativa de obter maior sensibilidade no método.

A escolha dos fluxos do gás de arraste He, bem como do ar sintético, do hidrogênio e do nitrogênio, foi feita com base nas indicações da própria coluna. Era necessário ainda definir a rampa de temperatura para realização da corrida cromatográfica. Optou-se por iniciar a corrida a 50°C, elevar a temperatura 5°C/min., até que a 2,5HD e o PI aparecessem, e finalmente aumentar a temperatura 20°C/min até atingir 180°C, de modo a permitir que nenhuma substância ficasse retida na coluna, interferindo na corrida subsequente. As temperaturas do injetor e do detetor foram

respectivamente, 200°C e 250°C, e desta forma foram obtidos bons resultados na validação, bem como na análise das amostras dos trabalhadores expostos ao n-hexano.

A ciclohexanona foi utilizada como padrão interno, para compensar as perdas advindas do procedimento de extração e servir como um fator de correção, visto que foi utlizada a injeção manual, desta forma pequenas variações no volume injetado implicariam em variação na área do pico obtido. Sendo assim, o cálculo com base na área relativa (área de 2,5HD/área PI) nos garante confiança dos valores extraídos dos cromatogramas obtidos.

Com as condições estabelecidas, foram feitas análises de *pool* de urina de indivíduos não expostos ao n-hexano, adicionados de ciclohexanona (PI) e 2,5HD. Os resultados mostraram resposta linear do detector, sendo o coeficiente de determinação (r^2) de 0,9989, considerado bom. Os tempos de retenção da 2,5HD e da ciclohexanona foram adequados para identificação do analito, trr = 1,092 $\pm$ 0,002, sendo cada análise realizada em cerca de 18 minutos.

Para que os resultados analíticos fossem confiáveis, o método foi validado, visando minimizar os erros e assegurar a máxima qualidade do trabalho, com base no que é proposto para as análises toxicológicas.

Os dados do estudo de linearidade demonstram que há correlação entre as concentrações de 0,1 e 20mg/L de 2,5HD, e as respectivas áreas relativas (padrão da substância/padrão interno). O coeficiente de determinação de 0,9997 encontrado, permite considerar que o método gera resultados proporcionais à concentração da substância em análise, dentro de uma faixa analítica específica, sendo possível relacionar a medida dependente da concentração (CHASIN *et al.* 1998). A faixa de linearidade estudada teve como critério principal, incluir o valor do IBMP que para 2,5HD

é de 5mg/g de creatinina urinária. Além disso a literatura mostra que vários são os trabalhos realizados cujas análises foram realizadas com concentrações semelhantes a faixa em questão, como KAWAI *et al.* (1990) cuja variação foi de 0 1 a 10mg/L; PERBELLINI *et al.* (1990b) 0,9 a 100mg/L e VOHRA & GAIND (1992) 1-10mg/L.

Os limites de quantificação (LQ) de 0,1mg/L e de detecção (LD) de 0,05mg/L, com CV respectivamente, menor ou igual a 10% e 20%, foram aceitos neste trabalho, já que alguns autores colocam que a reprodutibilidade da resposta, precisão, fornecida por CV, pode ser utilizada como critério para determinação do LD e LQ (CHASIN *et al.* 1994). Além disso, para o objetivo proposto para este tipo de trabalho é possível encontrar na literatura valores de LD que variam de 0,01 a 0,1mg/L e LQ 0,1mg/L. (KAWAI *et al.* 1990; VOHRA & GAIND 1992, VAN ENGELEN *et al.* 1995).

Os resultados da recuperação, sem e com hidrólise (Tabela 18), obtidos a partir de adicionados de padrão de 2,5HD às amostras de *pool* de urina, para se obter as concentrações de 1,0; 5,0 e 10mg/L, forneceram valores satisfatórios, sendo inclusive maiores que os 86,2% obtido por SAITO *et al.* (1991). Os valores obtidos maiores que 100% foram aceitos visto que estavam dentro de um desvio padrão de ± 10%. VAN ENGELEN *et al.* (1995) obtiveram para concentrações altas, recuperação de 106% e SORIANO *et al.*(1996) obtiveram, dentre três concentrações, recuperação média de 100,3%, sendo que para uma delas este valor chegou a 114,85%. Aplicando teste estatístico observa-se que não há diferença estatisticamente significativa entre a recuperação, sem e com hidrólise, para um valor de p = 0,071.

Os coeficientes de variação obtidos no estudo da precisão intra-dia, para as concentrações de 0,1; 5,0 e 10,0mg/L, foram respectivamente, 10%, 3,2% e 3,0%, e os da precisão interdia, foram respectivamente, 12,4%; 4,7%

e 4,1%, mostrando precisão adequada. VAN ENGELEN *et al.* (1995) adotaram como critério obter coeficiente de variação menor que 10%. A diferença observada entre o teste intra e interdias não foi estatisticamente significante ($p = 0,071$), sendo possível afirmar que a variação analítica se mantém em ambas situações: aplicando várias replicatas em um mesmo dia ou analisando-as em dias diferentes.

Considerando a possibilidade de alterações nas concentrações de 2,5HD, durante os ensaios, tornou-se importante estudar por quanto tempo a amostra permanecia estável. Sendo assim, foi utilizado como critério para determinar a estabilidade da amostra que, a variação entre concentração de 2HD na amostra no tempo zero e a concentração após passado algum tempo, em diferentes condições de armazenamento, não fosse maior que o parâmetro $\pm$ 2dp $\cong$ 20% (2 vezes o desvio padrão da primeira determinação, que neste caso foi realizada com n=3). Na Tabela 13 pode-se verificar que para concentração de 5mg/L a amostra é estável à temperatura ambiente por 48 horas, de acordo com o referido por SAITO *et al.* (1991), há uma redução nos níveis de 2,5HD, mesmo após um dia em temperatura ambiente, e em quinze dias a concentração diminui a metade em relação a inicial. No entanto, no presente estudo, o tempo de permanência em temperatura ambiente não tão foi prolongado por acreditar que em um laboratório de rotina as amostras não ficarão por quinze dias a temperatura ambiente.

Na Tabela 14, pode-se verificar que as amostras contendo 2,5HD na concentração de 5mg/L, conservadas na geladeira por sete semanas, permaneceram estáveis, estando as variações obtidas, dentro dos $\pm$ 2DP previstos como critério de aceite. Na Tabela 15, onde foi avaliado a estabilidade em *freezer,* percebe-se que por até 11 semanas a amostra permaneceu estável. Os dados relatados na literatura, com relação as condições de armazenamento, inidcam que a 2,5 hexanodiona é estável por 30 dias entre –20°C e 4°C, ou seja em *freezer* e em geladeira,

respectivamente segundo SAITO *et al.* (1991) e por até três meses, a -20°C, segundo BAVAZZANO *et al.* (1998).

Na literatura não há nenhuma referência com relação a um estudo de estabilidade frente a ciclos de congelamento/descongelamento. No entanto, considerando a possibilidade de repetição de qualquer análise, ou ainda no caso de ocorrência de desgelo da amostra durante o transporte, ou por alguma outra eventualidade, verificou-se como estas variações de estado físico da amostra poderiam deteriorá-las diminuindo as concentrações de 2,5HD. Na Tabela 15, podemos verificar que a amostra é estável quando passa por 2 e até 3 ciclos de congelamento/ descongelamento.

Os resultados obtidos no estudo da exatidão, expressa em função de porcentagem de inexatidão, foi de 9,0%, mostrando a aceitabilidade do método.

Foi avaliado ainda o efeito da matriz, sem e com hidrólise da urina, (Figuras 10 e 11, respectivamente), para saber se há alguma interferência da matriz biológica na análise. Pelo estudo estatístico percebe-se que não há diferença significativa entre as curvas em água e urina em ambas situações (curvas sem hidrólise p=0,064 e curvas com hidrólise p=0,092), no entanto visualmente é perceptível que as curvas não se sobrepuseram, sendo possível existir alguma interferência, porém que não altere o resultado significativamente. Desta forma, para garantir a confiabilidade da análise, optou-se por preparar sempre os calibradores em urina.

Foi realizado um teste, utilizando colunas C_{18} e eluição com acetonitrila, para verificar a eficiência da purificação da amostra, sem e com hidrólise da urina, visando obter cromatogramas com menos interferentes, principalmente pelo fato da análise de amostras reais tornar-se dificultada, já que a exposição simultânea a vários solventes gera muitos interferentes na análise. O resultado obtido é concordante ao referido na literatura, sendo

assim foi observado melhora considerável no cromatograma, mas não a ponto de justificar a necessidade deste tratamento, de custo bem mais elevado, do que a extração líquido-líquido direta.

O método validado foi aplicado, a amostras de urina de trabalhadores de sete indústria de calçados da região de São João Batista - SC, passando por extração, sem e com hidrólise prévia da urina. Foram avaliados 52 indivíduos expostos e 35 indivíduos não expostos ao n-hexano, das mesmas indústrias.

Os resultados obtidos, nas análises das amostras do grupo exposto (Tabelas 19 a 25) foram expressos em função de mg/L, visto que os parâmetros da validação de metodologia, inclusive o Limite de Detecção, foram definidos nesta unidade; e ainda em função de mg/g de creatinina urinária, que é o Índice Biológico Máximo Permitido (IBMP), de acordo com a NR – 7, tornando possível a comparação dos resultados visando avaliar o risco (BRASIL, 1994).

Conforme descrito na literatura as análises dos indivíduos expostos ao n-hexano, após a hidrólise forneceram resultados, aproximadamente dez vezes maiores que a análise sem hidrólise, a média obtida da análise sem hidrólise foi 0,088 mg/L enquanto que com hidrólise 0,942mg/L. Estes dados são concordantes com os descritos na literatura, e a possível explicação, é que durante a hidrólise ocorra a conversão in vitro de outros metabólitos do n-hexano como a 5-hidróxi-2-hexanona e o 2,5-dimetilfurano, em 2,5HD, sendo então é determinada a 2,5HD total (fração livre mais a que sofreu a conversão) (SAITO *et al.* 1991; KAWAI *et al.* 1990; KAWAI *et al.* 1991a; KAWAI *et al.* 1991b; KAWAI *et al.* 1992a, KAWAI *et al.* 1992b; VAN ENGELEN *et al.* 1995). Sob o ponto de vista preventivo, no qual a toxicologia ocupacional está fundamentada, avaliar os níveis de 2,5HD total, garantem maior proteção ao indivíduo exposto. No entanto a estimativa do risco e da ação tóxica só é possível determinando a fração livre de 2,5HD,

responsável pelo desencadeamento da reação, tornando-se importante inclusive para conseguir obter nexo causal e concluir possível diagnóstico. Estes são aspectos que a determinação da 2,5HD total, ou seja após hidrólise da amostra, não permite tornar precisos.

Quanto aos parâmetros avaliados no questionário, respondido pelos trabalhadores no dia da coleta da amostra de urina, as diferenças entre os métodos com e sem hidrólise não foram significantes. No entanto vale ressaltar algumas observações:

- O hábito de fumar não parece interferir na análise, sem ou com hidrólise, apesar de não ser possível estabelecer qualquer relação, visto a diferença entre o número de fumantes e não fumantes foi considerável (n=6 e n=44, respectivamente);
- Quanto ao hábito de beber os dois grupos foram mais homogêneos (26 que bebem e 24 que não bebem). Os resultados, avaliados em função da mediana, sugerem que para análise com hidrólise os indivíduos que não bebem apresentam valores mais elevados (mediana=0,935mg/L), que os indivíduos que bebem (mediana=0,335mg/L), É claro que para tentar estabelecer qualquer relação com este hábito, a frequência e a quantidade de álcool ingeridos devem estar bem estabelecida. O que aparentemente acontece com pessoas que ingerem álcool, é que há uma inibição competitva na biotrasnsformação do n-hexano de modo que os níveis encontrados se tornam menores, conforme observado. Para a análise sem hidrólise as medianas para os dois grupos foram iguais;
- O tempo de trabalho parece não interferir, visto que tanto para as análises, sem e com hidrólise, as medianas obtidas não seguem uma ordem que permitam concluir que o tempo de exposição forneça valores de 2,5HD urinária menores ou maiores. Aparentemente não é observado efeito cumulativo;

- Para os dois métodos observa-se que a condição de trabalho é fator determinante nos níveis de 2,5HD urinária, de acordo com o descrito em material e métodos. No item casuística, classificamos as indústrias em três categorias de acordo com o tipo de operação realizada para aplicação da cola. Sendo assim as indústrias foram divididas em três tipos:

  Tipo 1: aquela que possuía o sistema de exaustão, onde a aplicação era realizada em uma mini capela,

  Tipo 2: aquelas que utilizavam uma pistola para manusear a cola

  Tipo 3: aquelas na qual o manuseio da cola, era realizado apenas com o auxílio de um pincel.

  Os resultados obtidos em função de mediana mostram que os níveis nas indústria Tipo 1 são os menores (método sem hidrólise = 0,059mg/L; método com hidrólise = 0,084mg/L), seguidos pelos obtidos nas indústrias nas indústrias Tipo 2 (método sem hidrólise = 0,071mg/L; método com hidrólise = 0,696mg/L), e finalmente seguidos pelos níveis obtidos nas indústrias Tipo 3 (método sem hidrólise = 0,144mg/L; método com hidrólise = 1,500mg/L). É de se supor então, que a pior condição de trabalho favorece a maior exposição, aumentando o risco ao qual o trabalhador está exposto.

Os sintomas relatados pelos trabalhadores envolvidos no estudo foram cefaléia, parestesia, tosse, irritação nasal e na garganta, ausência de memória recente, gosto amargo, peito sufocado, irritação ocular, visão borrada, parestesia nas extremidades e tontura. Os relatos existiram tanto no grupo exposto quanto no grupo controle. Apesar destes serem os sintomas mais relatados na literatura consultada, este é um dado que não nos forneceu subsídio para avaliar a intensidade da exposição, para que isso fosse possível, um protocolo mais controlado deveria ser seguido, no entanto este não foi o objetivo do presente estudo.

A Tabela 27 mostra a análise descritiva dos sintomas relatados pelos trabalhadores no questionário aplicado no dia da coleta (grupos exposto e controle).

Tabela 27 – Análise descritiva e porcentagem dos sintomas relatados pelos trabalhadores envolvidos no estudo

Sintoma	N° Relatos Grupo Expostos n=45 (%)	N° Relatos Grupo Controle n=31 (%)
Ausência de sintoma	10 (45%)	7 (22%)
Cefaléia	29 (64%)	18 (58%)
Parestesia	17 (38%)	09 (29%)
Tosse	06 (13%)	02 (06%)
Irritação nasal	12 (27%)	03 (10%)
Irritação na garganta	13 (29%)	03 (10%)
Ausência de memória recente	01 (2%)	01 (03%)
Gosto amargo	08 (18%)	03 (10%)
Peito sufocado	13 (29%)	09 (29%)
Irritação ocular	14 (31%)	04 (13%)
Visão borrada	12 (27%)	02 (06%)
Parestesia nas extremidades	02 (4%)	0
Tontura	10 (22%)	02 (06%)

Para alguns autores os níveis entre 0,762 – 0,582mg/L, são valores encontrados em homens e mulheres, respectivamente, sadios não expostos ocupacionalemnte ao n-hexano, visto que cetonas originadas no metabolismo normal, podem ser convertidas após a hidrólise ácida à 2,5HD (FEDTKE & BOLT, 1986b; PERBELLINI *et al.* 1986b, PERBELLINI *et al.* 1993, BAVAZZANO *et al.* 1998). Nas amostras analisadas do grupo controle, o presente estudo, somente em dois indivíduos foi possível detectar 2,5HD,

após hidrólise. Provavelmente a origem, de 2,5HD, seja a conversão de cetonas do metabolismo normal nesta substância, e a formação destas talvez sofra influência de algum fator não analisado até então como por exemplo alimentação. É interessante ainda, chamar atenção para o fato de que na urina de um dos trabalhadores do grupo controle, após a hidrólise, o nível obtido foi de 1,13mg/L, ou seja acima do valor de referência anteriormente citado. Ao avaliar melhor está situação, foi observado que se tratava de um trabalhador do setor administrativo da indústria Tipo 3, localizado ao lado do setor de produção, evidenciando talvez uma possível exposição indireta.

Os resultados encontrados demonstram que as condições de exposição, nas indústrias que fizeram parte deste estudo estão aceitáveis, e os valores de 2,5HD na urina não ultrapassaram o Índice Biológico Máximo Permitido de 5mg de 2,5HD/g de creatinina, estabelecido na Legislação Brasileira, mesmo considerando que a análise seja realizada com hidrólise da urina.

Como nas indústrias estudadas, não houve nenhum tipo de controle ambiental, a monitorização biológica, realizada no presente estudo, fornece uma indicação das condições de trabalho aos quais os trabalhadores estão expostos.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados experimentais obtidos no presente trabalho, podemos concluir que:

- O método analítico validado por para análise da 2,5-hexanodiona (2,5HD) em urina, utilizando a cromatografia em fase gasosa com detecção por ionização de chama, após extração líquido-líquido com diclorometano, apresentou linearidade, exatidão, precisão, recuperação, limites de detecção e de quantificação adequados à sua aplicação na biomonitorização de trabalhadores expostos ao n-hexano;

- As concentrações de 2,5HD na urina permaneceram estáveis à temperatura ambiente por 48 horas, em geladeira por sete semanas, e em *freezer* por até onze semanas. Foi observado ainda que não houve alteração da amostra quando a mesma foi submetida até três ciclos de congelamento/descongelamento;

- Houve diferença estatisticamente significante entre os teores de 2,5-hexanodiona, quando as análises são realizadas com e sem hidrólise ácida da urina, prévia a extração. Os dados obtidos demonstraram que, após a hidrólise ácida, os teores de 2,5HD são cerca de dez vezes maiores, em relação a amostra que não passa por este tratamento, corroborando os dados da literatura.

- Não houve diferença estatisticamente significante entre os teores de 2,5HD, quando foram avaliados parâmetros que poderiam interferir na análise, como o tabagismo, o hábito de ingerir bebidas alcoólicas e o tempo de trabalho.

- A condição de trabalho parece ser fator determinante nos teores de 2,5HD urinária, visto que, as concentrações de 2,5HD encontradas nas

urinas dos trabalhadores expostos ao n-hexano em indústrias de calçados foram nas indústria classificadas como excelentes valores medianos de 0,084mg/L, nas indústrias boas 0,696mg/L, e finalmente nas indústrias regulares 1,500mg/L É de se supor então, que a pior condição de trabalho favorece a maior exposição, aumentando o risco ao qual o trabalhador está exposto.

- Nas 52 amostras de urina de trabalhadores expostos ao n-hexano, avaliadas nas 7 indústrias estudadas, as concentrações de 2,5HD, tanto com hidrólise como sem, não ultrapassaram o IBMP, estabelecido na Legislação Brasileira, de 5mg/g de creatinina.

8. ANEXOS

8.1. Anexo 1

QUESTIONÁRIO

AMOSTRA: _____

I. Identificação

1. Nome:_____
2. Nascimento: ___/___/____ Peso: ____Kg Altura:____
3. Endereço:_____
4. Até que série estudou? _____
5. Área de trabalho:_____

II. Sobre seu trabalho

1. Quantas horas trabalha por dia? _____
2. Quantas vezes por semana você entra em contato com a cola?

   ( ) 1 ( ) 2 ( ) 3 ( ) 4 ( ) Todos os dias
3. Há quanto tempo tem este emprego?_____
4. Tem algum outro emprego ou bico? ( ) sim ( ) não

   Se sim, o que faz?_____
5. Qual a profissão anterior?_____

III. Hábitos pessoais

1. Fuma? ( ) sim ( ) não ( ) Parei de fumar

   Quantos cigarros por dia?_____

   Há quantos anos?_____
2. Bebidas

   Chá ( ) sim ( ) não Quanto por dia? _____xícaras

   Café ( ) sim ( ) não Quanto por dia? _____xícaras

   Cerveja ( ) sim ( ) não Quanto por dia? _____garrafas

   Pinga ( ) sim ( ) não Quanto por dia? _____doses

   Outra bebida _____ Quanto por dia? _____

IV. Sobre sua saúde

1. Você tem alguma dificuldade para lembrar-se das coisas? ( ) sim ( ) não
2. Alguém de sua família disse que você tem memória curta?
( ) sim ( ) não
3. Você costuma escrever as coisas que deve lembrar? ( ) sim ( ) não
4. Você costuma voltar para conferir coisas que fez? ( ) sim ( ) não
5. Você tem dificuldades para entender o que lê? ( ) sim ( ) não
6. Você tem dificuldade para se concentrar? ( ) sim ( ) não
7. Você fica nervoso sem motivo? ( ) sim ( ) não
8. Você fica triste ou deprimido, sem motivo? ( ) sim ( ) não
9. Você se cansa mais do que acha normal? ( ) sim ( ) não
10. Você tem batedeira no coração sem fazer esforço? ( ) sim ( ) não
11. Você, as vezes sente o peito sufocado? ( ) sim ( ) não
12. Você transpira muito? ( ) sim ( ) não
13. Você tem dor de cabeça ao menos uma vez por semana?( ) sim ( ) não
14. Você costuma ter formigamento em alguma parte de corpo?
( ) sim ( ) não
15. Você tem dificuldade para abotoar e desabotoar a roupa?( ) sim ( ) não
16. Você já desmaiou? ( ) sim ( ) não
17. Você já tomou remédio para desmaio? ( ) sim ( ) não
18. Alguém da sua família tem doença nervosa ou desmaio? ( ) sim ( ) não
19. Você já sofreu algum acidente com pancada forte na cabeça?
( ) sim ( ) não
20. Você está tomando algum remédio? ( ) sim ( ) não
21. Você se machuca no serviço (pequenos ferimentos como martelada no dedo, cortes, deixar peças ou ferramentas caírem)? ( ) sim ( ) não
22. Você sente algum incômodo quando está trabalhando? ( ) sim ( ) não
( ) Tontura ( ) Dor de cabeça ( ) Escurecer a vista ( ) Gosto ruim na boca ( ) Arder nariz e/ou garganta ( ) Arder os olhos ( )Tosse
23. Você sente algum problema de saúde? ( ) sim ( ) não
O que sente?_____

8.2. Anexo 2

CONSENTIMENTO PÓS INFORMAÇÃO PARA PARTICIPAR DE UM PROJETO DE PESQUISA

TÍTULO DO PROJETO: Determinação de 2,5 hexanodiona urinária como indicador biológico da exposição ocupacional ao n-hexano

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Claudia Regina dos Santos

INSTITUIÇÃO: Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo

Este é um convite para você participar voluntariamente de um projeto de pesquisa. Por favor leia atentamente as informações aqui contidas antes de dar o seu consentimento para participar ou não do estudo.

1. Este estudo visa verificar a concentração urinária da 2,5 hexanodiona, indicador biológico para a exposição ao n-hexano. O n-hexano é um solvente constituinte de colas utilizadas nas indústrias de calçados.

2. Aceitando participar deste estudo, será coletado de sua pessoa uma única amostra de urina de final de jornada de trabalho, ou por ventura uma segunda amostra se for necessária uma repetição da análise. No dia da coleta de sua amostra você preencherá um questionário que tem por objetivo conhecer um pouco de seus hábitos, seu estado de saúde ou o uso de medicamentos que possam interferir no exame.

3. Em sua urina será realizada gratuitamente, a dosagem da 2,5 hexanodiona (substância em estudo), com a finalidade de verificar se a exposição ao n-hexano, presente na cola, está adequada, não representando então nenhum risco à sua saúde.

4. A sua posição no seu emprego não será prejudicada, independente de você decidir ou não pela participação neste projeto.

5. Você pode e deve fazer todas as perguntas que julgar necessárias antes de concordar em participar do projeto, e eu Claudia Regina dos Santos, pesquisadora responsável, me coloco a disposição no sentido de oferecer as informações relacionadas à sua saúde, aos seus direitos, bem como aos eventuais riscos e benefícios relacionados a sua participação neste estudo. O telefone para contato no caso de intercorrências é 11-8182197.

6. A sua identificação será mantida como informação confidencial. Os resultados do estudo serão publicados sem revelar sua identidade, entretanto estarão disponíveis para consulta pela equipe envolvida no projeto, e pelo Comitê de Ética.

CONSENTIMENTO

Eu, _____, abaixo assinado, concordo em participar voluntariamente deste projeto de pesquisa.

Declaro que após convenientemente esclarecido pela pesquisadora responsável e ter entendido o que me foi explicado consinto participar do presente protocolo de pesquisa.

Data :___/___/_____

Local:_____

_____ _____

Assinatura do sujeito de pesquisa Assinatura da pesquisadora

_____

Assinatura da testemunha

8.3. Anexo 3

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 – Bloco 13 A
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
CEP-05508-900 - São Paulo - SP
Fone (011) 818.3677 - Fax 211.8986

Assistência Acadêmica
Ofício CEP nº 24/99

São Paulo, 16 de setembro de 1999.

Prezada Senhora

Informo que o projeto "Determinação de 2,5 Heroxanodinona Urinária com Indicador Biológico da Exposicão Ocupacional ao N-Hexano", apresentado por V. Sa., foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada no dia 30 de agosto p.passado.

Atenciosamente,

Profa. Dra. Silvia Storpirtis
Coordenadora do CEP/FCF

Ilma. Sra.
Pós-Graduanda Claudia Regina dos Santos
Depto. FBF

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABOU-DONIA,M.B., LAPADULA,D.M., CAMPBELL,G., TIMMONS,P.R. The synergism of n-hexane induced neurotoxicity by methyl isobutyl ketone following subchronic (90 days) inhalation in hens: induction of hepatic microssomal cytochrome P450. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* New York, v.81, p.1-16, 1985.

2. ABOU-DONIA,M.B., HU,Z., LAPADULA,D.M., GUPTA,R.P. Mechanisms of joint neurotoxicity of n-hexane, methyl isobutyl ketone and O-ethyl O-4-nitrophenyl phenylphosphonothioate in hens. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* Baltimore, v.257, n.1, p.282-289, 1991.

3. ANDREOLI, R., MANINI, P., MUTTI, A., BERGAMASCHI, E., NIESSEN, W.M.A. Determination of n-hexane metabolites by liquid chromatography/mass spectrometry 1. 2,5-hexanedione and other phase 1 metabolites in untreated and hydrolyzed urina samples by atmospheric pressure chemical ionization. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* v.12, p. 1410-1416, 1998.

4. AHONEN,I., SCHIMBERG,R.W. 2,5-hexanedione excretion after occupational exposure to n-hexane. *Br. J. Ind. Med.* London, v.45, p.133-136, 1988.

5. ALTENRICH,H., WAGNER,H.M., STOLTENBURG,G.,SPENCER,P.S. Nervous system responses of rats to subchronic inhalation of n-hexane and n-hexane plus methyl ethyl ketone mistures. *J. Neurol. Sci.* 57:209-219, 1982. Apud: CARVALHO,W.A. *Toxicologia do n-hexano: exposição ocupacional e riscos para saúde.* Série Técnica em Toxicologia e Saúde Ocupacional - Número 1, Salvador, 1993.

6. AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS. *Threshold limit values for chemical substances and physical agents. Biological exposure indices.* p.179, Cincinatti, ACGIH, 1998.

7. ANTHONY,D.C., BOEKELHEIDE,K., ANDERSON,C.W., GRAHAM,D.G. The effect of 3,4-dimetysubstitution of the neurotoxicty of 2,5-hexanedione. II. Dimethyl substitution accelerates pyrrole formation and protein crosslinking. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* New York, v.71, p.372 - 382, 1983.

8. BÄCKSTROM,B., SHIBATA,E., NYLÉN,P., COLLINS,V.P. 2,5-hexanediona concentrations and morphological changes within the eye of albino rat. *Arch. Toxicol.* Berlin, v.72, p.597-600, 1998.

9. BASTONE,A., FRONTALI,N., MALLOZZI,C., SBRACCIA,M., SETTIMI,L. Cholinesterases in blood plasma and tissue of rats treated with n-hexane or with its neurotoxic metabolite 2,5-hexanedione. *Arch. Toxicol.* Berlin, v.61, p.138 - 144, 1987.

10. BAVAZZANO, P., APOSTOLI, P., BATTISTA, BARTOLUCCI, BIRATTI, M., DUCA, P., GORI, G., DONNI, V.L., PERBELLINI, L., PERICO, A., MINOIA. Determination of urinary 2,5-hexanedione in the general Italian population. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* Berlin, v.71, p.284 - 288, 1998.

11. BRASIL, Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho. Portaria n°24, de 29 de dezembro de 1994. Diário Oficial, n° 248, 30 de dezembro de 1994, Brasília, Seção 1, p.21.278 - 21.282,[NR-7 - *Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional*]

12. CARDONA,A., MARHUENDA,D., MARTI,J., BRUGNONE,F., ROEL,J., PERBELLINI,L. Biological monitoring of occupational exposure to n-hexane by measurement of urinary 2,5-hexanodione. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* Berlin, v.65, n.1, p.71 – 74. 1993.

13. CARDONA,A., MARHUENDA,D., PRIETO,M.J., MARTI,J., PERIAGO,J.F., SÁNCHEZ,J.M. Behavior of urinary 2,5-hexanodione on occupational co-exposure to n-hexane and acetone. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* Berlin, v.68, n.2, p.88-93, 1996.

14. CARVALHO,W.A. Neurotoxicidade do n-hexano: revisão das principais alterações neurofisiológicas em trabalhadores expostos e medidas de avaliação da exposição ambiental. *Rev. Bras. Saúde Ocup.* São Paulo, v.19, n.72, p.21 - 37, 1991.

15. CARVALHO,W.A. *Toxicologia do n-hexano: exposição ocupacional e riscos para saúde.* Série Técnica em Toxicologia e Saúde Ocupacional - Número 1, Salvador, 1993.

16. CHANG,Y.C. Patients with n-hexane induced polyneuropathy a clinical follow up. *Br. J. Ind. Med.* London, v.47, p.485 - 489, 1990.

17. CHAPIN,R.E., NORTON,R.M., POPP,J.A., BUS,J.S. The effects of 2,5-hexanedione on reproductive hormones and testicular enzyme activities in the F344 rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* New York, v.62, p.262-272, 1982.

18. CHAPIN,R.E., MORGAN,K.T., BUS,J.S. The morphogenesis of testicular degeneration induced in rats by orally administred 2,5-hexanedione. *Exp. Mol. Pathol.,* New York, v.38, p.149 - 169, 1983.

19. CHASIN,A.A.M., CHASIN,M., SALVADORI,M.C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. *Rev. Farm. Bioquím. Univ. São Paulo*, São Paulo, v.30, n.2, p.49 - 53,1994.

20. CHASIN,A.A.M., NASCIMENTO,E.S., RIBEIRO-NETO,L.M., SIQUEIRA,M.E.P.B., ANDRAUS,M.H., SALVADORI,M.C., FERNÍCOLA,N.A.G., GORNI,R., SALCEDO,S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. *Rev. Bras. Toxicol.* São Paulo, v.11, n.1, p.1-6, 1998.

21. COLOMBINI,P.M., CARRAI,P., FUOCO,R., ABETE,C. Rapid and sensitive determination of urinary 2,5 HD by reversed phase high performance liquid. *J. Chromatog.* Amsterdam, v.592, p.255 – 260, 1992.

22. COSTA,L.G. Biomarker research in neurotoxicology the role of mechanistic studies to bridge the gap between the laboratory and epidemiological investigations. *Environ. Health Perspec. Suppl.* Washington, v.104, n.1, p.55 – 67, 1996.

23. COURI,D., ABDEL-RAHMAN,M.S., HETLAND,L.B. Biotransformation of n-hexane and methyl n-butyl ketone in guinea pigs and mice. *Am. Ind. Hyg. Ass. J.* Ohio, v.39, n.4, p.295 - 300, 1978.

24. COURI,D., MILKS,M. Toxicity and metabolism of the neurotoxic hexacarbons n-hexane, 2-hexanone and 2,5-hexanedione. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* v.22, p.145 – 66, 1982.

25. CROSBIE,S.J., BLAIN,P.G., WILLIAMS,F.M. Metabolism of n-hexane by rat liver and extrahepatic tissues and the effect of cytochrome P450 inducers. *Hum. Exp. Toxicol.* Basingstoke, v.16, n.3, p.131 – 137, 1997a.

26. CROSBIE,S.J., BLAIN,P.G., WILLIAMS,F.M. An investigation into the role of rat skeletal muscle as a site for xenobiotic metabolism using microsomes and isolated cells. *Hum. Exp. Toxicol.* Basingstoke, v.16, n.3, p.138 – 145, 1997b.

27. DECAPRIO,A.P., OLAJOS,E.J., WEBER,P. Covalent binding of a neurotoxic n-hexane metabolite: conversion primary amines to substituted pyrrole aducts by 2,5-hexanedione. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* New York, v.65, p.440 - 450, 1982.

28. DECAPRIO,A.P., STROMINGER,N.L., WEBER,P. Neurotoxicity and protein binding of 2,5-hexanedione in the hen. *Toxicol. Appl. Pharmacol,* New York, v. 68, p.297 - 307, 1983.

29. DECAPRIO,A.P., BRIGGS,R.G., JACKOWSKI,S.J., KIM,J.C.S. Comparative neurotoxicity and pyrrole-forming potential on 2,5-hexanedione and perdeuterio 2,5-hexanedione in rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* New York, v.92, p.75 – 85, 1988.

30. DUNNICK,J.K., GRAHAM,D.G., YANG,R.S.H., HABER,S.B., BROWN,H.R. Thirteen-week toxicity study of n-hexane in B6C3F mice after inhalation exposure. *Toxicology.* Shanon, v.57, p.163 - 172, 1989.

31. FEDTKE,N., BOLT,H.M. Detection of 2,5-hexanedione in urine of persons not exposed to n-hexane. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* Berlin, v.57, p.143 - 148, 1986a.

32. FEDTKE,N., BOLT,H.M. Methodological investigations on the determination of n-hexane metabolites in urine. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* Berlin, v.57, p.149 - 158, 1986b.

33. FILSER,J.G., PETER,H., BOLT,H.M., FEDTKE,N. Pharmacokinetics of the neurotoxin n-hexane in rat and man. *Arch Toxicol.* Berlin, v.60, n.1-3, p.77-80, 1987.

34. FILSER,J.G., CSANADY,GY.A., DIETZ,W., KESSLER,W., KREUZER,P.E., RICHTER,M., STÖRMER,A. Comparative estimation of the neurotoxics risks of n-hexane and n-heptane in rats and humans based on the formation of the metabolites 2,5-hexanodione and 2,5-heptanodione. *Adv. Exp. Med. Biol.,* New York, v.387,p.411 - 427, 1996.

35. GILLIES,P.J., NORTON,R.M., BUS,J.S. Effect of 2,5-hexanedione of lipid biosynthesis in sciatic nerve and brain of the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* New York, v.54, p.210 – 216, 1980.

36. GILLIES,P.J., NORTON,R.M., BAKER,T.S., BUS,J.S. Altered lipid metabolism in 2,5-hexanedione-induced testicular atrophy and peripheral neuropathy in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, New York, v.59, p.293 – 299, 1981.

37. GORI,G., BARTOLUCCI,G.B., STURARO,A., PARVOLI,G., DORETTI,L., TROIANO,R., CASETTA,B. High-performance liquid chromatographic determination of urinary 2,5-hexanedione as mono-2.4-dinitrophenilhidrazone using ultraviolet detection. *J. Chromatog. B*, Amsterdam, v.673, p.165 – 172, 1995.

38. GOTO,T., KIMURA,T., ZHAO,W., MISUMI,J. Does the exposure to 2,5-hexanedione hasten the onset of peripheral neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats? *J. Occup. Health.* Short Communication, v.39, p.156 –157, 1997.

39. GOVERNA,M., VALENTINO,M., VISONA,I., MONACO,F. Human polymorphonuclear leucocyte chemotaxis as a tool in detecting biological early effects in workers occupationally exposed to low levels of n-hexane. *Hum. Exp. Toxicol.* Basingstoke, v.13, n.10, p.663 – 670, 1994.

40. GRAHAM,D.G. Hexane neuropathy: a proposal for pathogenesis of a hazard of occupational exposure and inhalant abuse. *Chem. - Biol. Interact.,* Shanon, v.32, p.339 – 345, 1980.

41. GRAHAM,D.G., AMARNATH,V., VALENTINE,W.M., PYLE,S.J., ANTHONY,D.C. Pathogenetic studies of hexane and carbon disulfide neurotoxicity. *Cri. Rev. Toxicol.,* Cleveland, v.25, n.2, p.91 – 112, 1995.

42. HALL,E.S., EVELETH,J., BOEKELHEIDE,K. 2,5-hexanedione exposure alters the rat sertolli cell cytoskeleton II. Intermediate filaments and actin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* New York, v.111, p.443 – 453, 1991.

43. HUANG,J., SHIBATA E., KATO,K., ASAEDA,N., TAKEUCHI,Y. Chronic exposure to n-hexane induces changes in nerve-specific marker proteins in the distal peripheral nerve of the rat. *Hum. Exp. Toxicol.* Basingstoke, v.11, n.5, p.323 – 327, 1992.

44. IKEDA,M. Exposure to complex mixtures: implications for biological monitoring. *Toxicol. Lett.* Amsterdam, v.77, p.85 – 91, 1995.

45. IMBRIANI,M., GHITTORI,S., PEZZAGNO,G., CAPODAGLIO,E. N-hexane urine elimination and weighted exposure concentration. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* Berlin, v.55, p.33 - 41, 1984.

46. ISHIDATE,M., SOFUNI,T.Primary mutagenicity creening of food additives currently used in Japan. *Food. Chem. Toxicol.* 22(8): 623-636, 1984. Apud: CARVALHO,W.A. *Toxicologia do n-hexano: exposição ocupacional e riscos para saúde.* Série Técnica em Toxicologia e Saúde Ocupacional - Número 1, Salvador, 1993.

47. IWATA,M., TAKEUCHI,Y., HISANAGA,N., ONO,Y. A study an biological monitoring of n-hexane exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* Berlin, v.51, p.253 – 260, 1981.

48. IWATA,M., TAKEUCHI,Y., HISANAGA,N., ONO,Y. Changes of n-hexane metabolites in urine of rats exposed to various concentrations of n-hexane and to its mixture with toluene or MEK. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* Berlin, v.53, p.1 - 8, 1983.

49. JACKSON,J.R. Some immunological parameters in workers occupationaly expose to n-hexane. Comments. *Hum. Exp. Toxicol,* Basingstoke, v.16, n.5, p.284 – 285, 1997.

50. JOHNSON,K.J., HALL,E.S., BOEKELHEIDE,K. 2,5-hexanedione exposure alters the rat sertolli cell cytoskeleton II. Microtubules and seminiferous tubule fluid secretion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, New York, v.111, p.432 –442, 1991.

51. JOHNSON,D.J., LACK,L., IBRAHIM,S., ABDEL-RAHMAN,S.M., ABOU-DONIA,M.B. Protein-bound pyrroles in rat hair following subchronic intraperitoneal injection of 2,5-hexanedione. *J. Toxicol. Environ. Health.* Washington, v.45, p.313 - 324, 1995.

52. JORGENSEN,N.K., COHR,K-H. N-hexane and its toxicologic effects. *Scan. J. Work Environ. Health.* Helsinki, v.7, p.157 – 168, 1981.

53. JORTNER,B.S., ELRICH,M. Comparison of toxicities of acrylamide and 2,5-hexanedione in hns and rats on 3-week dosing regimens. *J. Toxicol. Environ. Health.* Washington, v.39, p.417 – 428, 1993.

54. KARAKAYA,A., YUCESOY,B., BURGAZ,S., SABIR,H.U., KARAKAYA,A.E. Some immunological parameters in workers occupationaly expose to n-hexane. *Hum. Exp. Toxicol.* Balsingstoke, v.15, n.1, p.56 – 58, 1996.

55. KAWAI,T., MIZUNUMA,K., YASUGI,T., UCHIDA,Y., IKEDA,M. The method of choice for the determination of 2,5-hexanedione as an indicator of occupational exposure to n-hexane. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* Berlin, v.62, p.403 – 408, 1990.

56. KAWAI,T., YASUGI,T., MIZUNUMA,K., HORIGUCHI,S., UCHIDA,Y., IWAMI,O., IGUCHI,H., IKEDA,M. 2-acetylfuran a confounder in urinalysis for 2,5-hexanedione as an n-hexane exposure indicator. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* Berlin, v.63, p.213 - 219, 1991a.

57. KAWAI,T., YASUGI,T., MIZUNUMA,K., HORIGUCHI,S., UCHIDA,Y., IWAMI,O., IGUCHI,H., IKEDA,M. Dose-dependent increase in 2,5-hexanodione in the urine of workers exposed to n-hexane. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* Berlin, v.63, n.4, p.285 - 291, 1991b.

58. KAWAI,T., YASUGI,T., MIZUNUMA,K., HORIGUCHI,S., IGUCHI,H., UCHIDA,Y., IWAMI,O., IKEDA,M. Comparative evaluation of urinalysis and blood analysis as means of detection exposure to organic solvents at low concentrations. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* Berlin, v.64, n.4, p.223 – 234, 1992a.

59. KAWAI,T., YASUGI,T., MIZUNUMA,K., HORIGUCHI,S., IKEDA,M. Urinalysis x blood analysis as a tool for biological monitoring of solvent exposure. *Toxicol. Lett.* Amsterdam, v.63, n.3, p.333 – 343, 1992b.

60. KESSLER,W., HEILMAIER,H., KREUZER,P., JIAN,H.S., FILSER,M., FILSER,J.G. Spectrophotometric determination or pyrrole-like substances in urine of rat and man: an assay for the evaluation of 2,5-hexanedione formed from n-hexane. *Arch. Toxicol.* Berlin, v.64, p.242- 246, 1990.

61. KÉZIC,S., MONSTER,A.C. Determination of 2,5-hexanedione in urine and serum by gas chromatography after derivatization with o-(pentafluorobenzyl) hydroxylamine and solid-phase extraction. *J. Chromatog.* Amsterdam, v.563, p.199 – 204, 1991.

62. KIMURA,T., MISUMI,J., GOTO,T., ZHAO,W., AOKI,K. Electrophysiological and biochemical effects of exposure to 2,5-hexanedione on peripheral nerve in experimental diabetic rats. ? *J. Occup. Health*, v.40, p.148 – 153, 1998.

63. KURITA, H. (1974) [Experimental studies on the effects of n-hexane on albino rats] *Ind. Health*, 9 (8):24-29 (in japanese). Apud: WORLD HEALTH ORGANIZATION, *Environmental health criteria n° 122*, Geneva, 1991.

64. LAPADULA,D.M., HABIG,C., GUPTA,R.P., ABOU-DONIA,M.B. Induction of cytochrome P450 isozymes by simulyaneous inhalation exposure of hens to n-hexane and methyl isobutyl ketone (MIBK). *Biochem. Pharmacol.* Oxford, v.41, n.6-7, p.877 - 883, 1991.

65. LAUWERYS,R.R. *Toxicologie industrielle et intoxication professionelles.* Chapitre II - Les hidrocarbures non substitués. Troisiéme edition 2ª tirage. Masson, Paris, 1992.

66. LUNGARELLA,G., BARNI-COMPARINI,I., FONZI,L. Pulmonary changes induced in rabbits by long-term exposure to n-hexane. *Arch. Toxicol.* Berlin, v. 55, p.224 - 228, 1984.

67. MADEJA,M., BINDING,N., MUBHOFF,U., WITING,U., SPECKMANN,E.J. Effects of n-hexane and its metabolites on cloned voltage-operated neuronal potassium channels. *Arch. Toxicol.* Berlin, v.71, n.4, p.238 - 242, 1997.

68. MAESTRI,L., GHITTORI,S., IMBRIANI,M., CAPODAGLIO,E. Determination of 2,5-hexanedione by high-performance liquid chromatographic after derivatization with dansylhydrazine. *J. Chromatog. B.* Amsterdam, v.657 p.111 – 117, 1994.

69. MALORNI,W., IOSI,F., FORMISIANO,G., ARANCIA,G. Cytoskeletal changes induced in vitro by 2,5-hexanedione: an immunocytochemical study. *Exp. Mol. Pathol.* New York, v.50, p.50-68, 1989.

70. MORTELMANS, K., HAWORTH,S., LAWLOR,T., SPECK,W., TAINER,B., ZEIGER,E. Salmonella mutagenicity tests II. Results from the testing of 270 chemicals. *Environ. Mutagen.* 8 (Suppl 7): 1-119, 1986. Apud: CARVALHO,W.A. *Toxicologia do n-hexano: exposição ocupacional e riscos para saúde.* Série Técnica em Toxicologia e Saúde Ocupacional - Número 1, Salvador, 1993.

71. MUTTI,A., CAVATORTA,A., LUCERTINI,S., ARFINI,G., FALZOI,M., FRANCHINI,I. Neurophysiological changes in workers exposed to organic solvents in a shoe factory. *Scand. J. Work Environ. Health.* Helsinki, v.8, Suppl 1, p.136 – 141, 1982.

72. MUTTI,A., FALZOI,M., LUCERTINI,S., ARFINI,G., ZIGNANI,M., LOMBARDI,S., FRANCHINI,I. N-hexane metabolism in occupationally exposed workers. *Br. J. Ind. Med.* London, v.41, p.533 – 538, 1984.

73. MUTTI,A., BERGAMASCHI,E., GHITTORI,S., IMBRIANI,M., FRANCHINI,I. On the need of sampling strategy in biological monitoring: the example of hexane exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* Berlin, v.65, Suppl 1, p.S171 - S175, 1993.

74. NAKAJIMA,T., ELOVAARA,E., OKINO,T., GELBOIN,H.V., KLOCKARS,M., RIIHIMÄKI,V., AOYAMA,T., VAINIO,H. Different contributions of cytochrome P450 2E1 and P450 2B1/2 to chloroform hepatotoxicity in rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* New York, v.133, p.215 – 222, 1995.

75. NOMEIR,A.A. , ABOU-DONIA,M.B. Analysis of n-hexane, 2-hexanone, 2,5-hexanedione, and related chemicals by capillary gas chromatography and high performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* Baltimore, v.151, p.381 – 388, 1985.

76. NOMIYAMA and NOMIYAMA, 1974. Apud: COURI,D., MILKS,M. Toxicity and metabolism of the neurotoxic hexacarbons n-hexane, 2-hexanone and 2,5-hexanedione. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* v.22, p.145 – 66, 1982.

77. NYLÉN,P., EBENDAL,T., ERIKSDOTTER-NILSSON,M., HANSSON,T., HENSCHEN,A., JOHNSON,A.-C., KRONEVI,T., KVIST,U., SJÖSTRAND,N., HÖGLUND,G., OLSON,L. Testicular atrophy and loss of nerve growth factor immunoreactive germ cell line in rats exposed to n-hexane and protective effects of simultaneous exposure to toluene or xylene. *Arch. Toxicol.* Berlin, v.63, p.296 – 307, 1989.

78. OGATA,M., IWAMOTO,T., TAGUCHI,T. Determination of urinary 2,5 hexanedione by its conversion to 2,5-dimetilpyrrole. *Ind. Health.* Kawasaki, v.28, p.125 – 131, 1990.

79. OLLE,R.D. Toxicologia do n-hexano. *Rev. Bras. Saúde Ocup.*, São Paulo, v.14, n.56, p.12 - 18, 1986.

80. ONO,Y., TAKEUCHI,Y., HISANAGA,N.A comparative study on the toxicity of n-hexane and its isomers on the peripheral nerve. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* Berlin, v.48, n.289 – 294, 1981.

81. ONO,Y., TAKEUCHI,Y., HISANAGA,N., IWATA,M., KITOH,J., SUGIURA,Y. Neurotoxicity of Petroleum benzine compared with n-hexane. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* Berlin, v.50, p.219 - 229, 1982.

82. *OSHA. Occupational safety and health guideline for n-hexane.* [Online]. Available:"http://www.osha-slc.gov.80/SLCT/healthguidelines/n-hexane/recognition.html" – [16/04/1999].

83. PERBELLINI,L., GRANDIS,D., SEMENZATO,F., RIZZUTO,N., SIMONATI,A. An experimental study on the neurotoxicity of n-hexane metabolites hexanol 1 and 2-hexanol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, New York, v.46, p.421 – 427, 1978.

84. PERBELLINI,L., BRUGNONE,F., PAVAN,I. Identification of the metabolites of n-hexane, cyclohexane and their isomers in men's urine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* New York,v.53, p.220 - 229, 1980.

85. PERBELLINI,L., BRUGNONE,F., FAGGIONATO,G. Urinary excretion of the metabolites of n-hexane and its isomers during occupational exposure. *Br. J. Ind. Med.,* London, v.38, p.20 – 26, 1981a.

86. PERBELLINI,L., BRUGNONE,F., GAFFURI,E. Neurotoxic metabolites of "commercial hexane" in the urine of shoe factory workers. *Clin. Toxicol.* New York, v.18, n.12, p.1377 - 1385, 1981b.

87. PERBELLINI,L., BRUGNONE,F., SILVESTRI,R., GAFFURI,E. Measurement of the urinary metabolites of n-hexane, ciclohexane and their isomers by gas chromatography. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* Berlin, v.48, p.99 - 106, 1981c.

88. PERBELLINI,L., AMANTINI,M.C., BRUGNONE,F., FRONTALI,N. Urinary excretion of n-hexane metabolites - A comparative study in rat, rabbit and monkey. *Arch. Toxicol.* Berlin, v.50, p.203 - 215, 1982a.

89. PERBELLINI,L., LEONE,R., FRACASSO,M.E., BRUGNONE,F., VENTURINI,M.S. Metabolic interactions between n-hexane and toluene in vivo and in vitro. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* Berlin, v.50, p.351 – 358, 1982b.

90. PERBELLINI,L., BARTOLUCCI,G.B., BRUGNONE,F., DE ROSA,E., VALENTINI,F.. Il 2,5 esandione nel controllo biologico dell' esposizione professionale a n-esano. *Med. Lav.* Milan, v.76, n.1, p.35 - 43, 1985.

91. PERBELLINI,L., MOZZO,P., BRUGNONE,F., ZEDDE,A. Physiologicomathematical model for studying human exposure to organic solvents: kinetics of blood/tissue n-hexane concentrations and of 2,5-hexanedione in urine. *Br. J. Ind. Med.* London, v.43, p.760-768, 1986a.

92. PERBELLINI,L., TAGLIARO,F., MACHIO,S., ZEDDE,A , BRUGNONE,F. Dosagio gas cromatografico del 2,5 esandione nelle urine. *Med. Lav.* Milan, v.77, n.6; p.628 - 634, 1986b.

93. PERBELLINI, L., MOZZO,P., OLIVATO,D., BRUGNONE,F. "Dynamic" Biological Exposure Indexes for n-hexane and 2,5hexanedione, suggested by a physiologically based pharmacokinetic model. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* v.51, n.7, p.356-361 , 1990[a]

94. PERBELLINI,L., AMOROS,D.M., LLORENS,A.C., GIULLIARI,C., BRUGNONE,F. An improved method of analysing 2,5-hexanedione in urine. *Br. J. Ind. Med.* London, v.47, p.421 – 424, 1990b.

95. PERBELLINI,L., PEZZOLI,G., BRUGNONE,F., CANESI,M. Biochemical and phisiological aspects of 2,5-hexanodione: endogenous of exogenous product? *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* Berlin, v.65, n.1, p.49 – 52, 1993.

96. PERIAGO,J.F., CARDONA,A., MARHUENDA,D., ROEL,J., VILLANUEVA,M., MARTI,J., LUNA,A. Biological monitoring of occupational exposure to n-hexane by exhaled air analysis and urinalysis. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* Berlin, v.65, n.4, p.275 – 278, 1993.

97. POTTS,A.M. Toxic responses of the eye. IN: KLASSEN, C. D.; AMADUR, M. O.; and DOULL'S, J. (eds). *Cassarett and Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons*, 5th ed. Mc Millan Publishing Company, New York, p.583-615. 1996.

98. QUE HEE,S. Biological exposure indices IN: *Biological monitoring an introduction.* Van Nostrand Reinhold, United States of America, 1993.

99. RIZZUTO,N., GRANDIS,D., TRAPANI,G., PASINATO,E.. N-hexane polyneuropathy. *Eur. Neurol.* Basel, v.19, p.308 – 315, 1980.

100. ROBERTSON,P.JR., WHITE,E.L., BUS,J.S. Effects of methyl ethyl ketone pretreatment on hepatic mixed-function oxidase activity and on in vivo metabolism of n-hexane. *Xenobiotica.* London, v.19, n.7, p.721 – 729, 1989.

101. SAITO,I., SHIBATA,E., HUANG,J., HISANAGA,N., ONO,Y., TAKEUCHI,H. Determination of urinary 2,5-hexanedione concentration by an improved analytical method as an index of exposure to n-hexane. *Br. J. Ind. Med.* London, v.48, p.568 - 574, 1991.

102. SANAGI,S., SEKI,Y., SUGIMOTO,K., HIRATA,M. Peripheral nervous system functions of workers exposed to n-hexane at a low-level. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* Berlin, v.47, p.69 - 79, 1980

103. SAVOLAINEN,H. Some aspects of th mechanisms by industrial produce neurotoxic effects. *Chem. Biol. Interact.* 18:1-10, 1977. Apud: CARVALHO,W.A. Neurotoxicidade do n-hexano: revisão das principais alterações neurofisiológicas em trabalhadores expostos e medidas de avaliação da exposição ambiental. *Rev. Bras. Saúde Ocup.* São Paulo, v.19, n.72, p.21 - 37, 1991.

104. SCELSI,R., POGGI,P., FERA,L., GONELLA,G. Industrial neuropathy due to n-hexane. Clinical and morphological findings in three cases. *Clin. Toxicol.* New York, v.18, n.12, p.1387 – 1393, 1981.

105. SCHOENTAL,R., CAVANAGH,J.B. Mechanisms involved in the dying back process – an hypothesis implicating coenzymes. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 3: 145-150, 1977. Apud: CARVALHO,W.A. Neurotoxicidade do n-hexano: revisão das principais alterações neurofisiológicas em trabalhadores expostos e medidas de avaliação da exposição ambiental. *Rev. Bras. Saúde Ocup.* São Paulo, v.19, n.72, p.21 - 37, 1991.

106. SEPPÄLÄINEN,A.M., RAITTA,C., HUUSKONEN,M.S. N-hexane induced changes in visual evoked potential and electroretinograms of industrial workers. *Electroencephalogr. Clin. Neurophisiol.* Shanon, v.47, p.492 – 498, 1979.

107. SHAU,S.C., LOWTHER,D.E., JONES,S.L. Biochemical response of rat lung to inhaled n-hexane. *Toxicol. Lett.* Amsterdam, v.12, p.13 - 17, 1982.

108. SHIBATA,E., HUANG,J., HISANAGA,N., ONO,Y., SAITO,I., TAKEUCHI,Y. Effects of MEK on kinetics of n-hexane metabolites in serum. *Arch Toxicol.* Berlin,. v.64, n.3, p.247 – 250, 1990a.

109. SHIBATA,E., HUANG,J., ONO,Y., HISANAGA,N., IWATA,M., SAITO,I., TAKEUCHI,Y. Changes in urinary n-hexane metabolites by co-exposure to various concentrations of methyl ethyl ketone and fixed n-hexane levels. *Arch Toxicol.* Berlin, v.64, n.2. p.165 – 8, 1990b.

110. SILVA,L.G.F., PASSARELLI,M.M., MACHADO,E.A., NASCIMENTO,E. S., DELLA ROSA,H.V.. Validação de um método cromatográfico em fase gasosa para a determinação da 2,5-hexanodiona urinária como indicador biológico da exposição ocupacional ao n-hexano. *Rev. Bras. Toxicol.* São Paulo, v.12, n.1, p.41 - 45, 1999.

111. SILVA,M.R.M.S., BOMBARDI,S.M.J., OLLE,R.D., FAGÁ,I., POSSEBON,J., BUSCHINELLI,J.T.P. Toxicidade da fração volátil de colas – projeto estudo da exposição ocupacional ao hexano – parecer técnico. *Fundacentro Atualidades em Prevenção de Acidentes*. São Paulo, v.22, n.258, p.6 - 10, 1991.

112. SIMONSEN,L., JOHNSEN,H., LUND,S.P., MATIKAINEN,E., MIDTGARD,U., WENNBERG,A. Methodological approach to the evaluation of neurotoxicity data and the classification of neurotoxic chemicals. *Scan. J. Work Environ. Health*. Helsinki, v.20, n.1, p.1 – 12, 1994.

113. SORIANO,T., MENÉNDEZ,M., SANZ,P., REPETTO,M. Method for simultaneous quantification of n-hexane metabolites: application to n-hexane metabolism determination. *Hum. Exp. Toxicol.* Basingstoke, v.15, n.6, p.407 – 503, 1996.

114. SPENCER,P.C., SCHAUMBURG,H.H., SABRI,M.I., VERONESI,B.. The enlarging view of hexacarbon neurotoxicity. *Crit. Rev. Toxicol.* Cleveland, v.7, n.4, p.279 - 356, 1980

115. STURARO,A., PARVOLI,G., ZANCHETTA,S., DORETTI,L., GORI,G., BARTOLUCCI,G.B.. Mass spectrometric and gas high-performance liquid chromatographic behaviour of an impurity in 2,5-hexanedione. J. Chromatogr. Amsterdam, v.590, p.223 – 233, 1992.

116. STURARO,A., PARVOLI,G., DORETTI,L. High-performance liquid chromatographic determination of urinary 2,5-hexanedione. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, v.628, p.316 – 318, 1993.

117. TAIRA, M. (1975) Experimenatl studies on pathomorphological changes of lung produced by aliphatic and aromatic hydrocarbons and gasoline. *J. Tokio Med. Univ.* 33(4):597-607 (in japanese). Apud: WORLD HEALTH ORGANIZATION, *Environmental health criteria n° 122*, Geneva, 1991.

118. TAKEUCHI,Y., ONO,Y., HISANAGA,N., KITOH,J., SUGIURA,Y.. A comparative study of the neurotoxicity of n-pentane, n-hexane and n-heptane in the rat. *Br. J. Ind. Med.* London, v.37, p.241 – 247, 1980.

119. TAKEUCHI,Y., ONO,Y., HISANAGA,N.. An experimental study on the combined effects of n-hexane and toluene on the peripheral nerve of the rat. *Br. J. Ind. Med.* London, v.38, p.14 – 19, 1981.

120. TAKEUCHI,Y., ONO,Y., HISANAGA,N., IWATA,M., AOYAMA,M., KITOH,J., SUGIURA,Y.. An experimental study of the combined effects of n-hexane and methyl ethyl ketone. *Br. J. Ind. Med.,* London, v.40, p.199 – 203, 1983.

121. TAKEUCHI,Y., HISANAGA,N., ONO,Y., SHIBATA,E., SAITO,I., IWATA,M. Modification of metabolism and neurotoxicity of hexane by co-exposure of toluene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* Berlin, v.65, p.S227 - S230, 1993.

122. TOFTGARD,R., HAAPARANTA,T., ENG,L., HALPERT,J. Rat lung and liver microssomal cytochrome P450 isozymes involved in the hydroxilation of n-hexane. *Biochem. Pharmacol.* Oxford, v.35, n.21, p.3733 - 3738, 1986.

123. UPETRI,R.K., SINGH,K.P., SAXENA,A.K., SHANKER,R.. Effect of 2,5-hexanedione on lymphoid organs of rats, a preliminary report. *Environ. Res.* New York, v.39, p.188 - 198, 1986.

124. UPRETI,R.K., SHANKER,R. 2,5-hexanedione induced immunomodulatory effect in mice. *Environ. Res.* New York, v.43, p.48-59, 1987.

125. VALENTINO, M. Residual electroneurographic modifications in subjects with n-hexane induced polyneuropathy: a follow-up study. *Med. Lav.* Milan, v.87, n.4, p.289 - 296, 1996.

126. VAN ENGELEN,J.G.M., KEZIC,S., HAAN,W., OPDAM,J.J.G., WOLFF,F.A. Determination of 2,5-hexanodione, a metabolite of n-hexane, in urine evaluation and application of three analytical methods. *J. Chromatogr. B.* Amsterdam, v.667, n.2, p.233 – 240, 1995.

127. VAN ENGELEN,J.G.M., HAAN,W., OPDAM,J.J.G., MULDER,G.J. Effect of coexposure to methyil ethyl ketone (MEK) on n-hexane toxicokinetics in human volunteers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.,* New York,v.144, p.385 - 395, 1997

128. VEULEMANS,H., VLEM,E.V., JANSSENS,H., MASSCHELEIN,R., LEPLAT,A. Experimental human exposure to n-hexane. Study of the respiratory uptake and elimination, and of n-hexane concentrations in peripheral venous blood. *Int. Arch. Occup. Environm. Health.* Berlin, v.49, p.251 – 263, 1982.

129. VOHRA,K., GAIND,V.S.. Gas Chromatography determination of 2,5-hexanodione in urine as an indicator of exposure to n-hexane. *J. Anal. Toxicol.* Niles, v.16, n.3, p.176-178, 1982.

130. YOKOYAMA,K., ARAKI,S., MURATA,K., NISHIKITANI,M., NAKAAKI,K., YOKOTA,J. ITO,A., SAKATA,E.. Postural sway frequency analysis in workers exposed to n-hexane, xylene and toluene: assessment of subclinical cerebellar dysfunction. *Environ. Res.* New York, v.74, p.110 – 115, 1997.

131. YU,X., JOHANSON,G., ICHIHARA,G., SHIBATA,E., KAMIJIMA,M., ONO,Y.,TAKEUCHI,Y. Physiologically based pharmacokinetic modeling of metabolic interactions between n-hexane and toluene in humans. *J. Occup. Health,* v.40, p.293 – 301, 1998.

132. WAHLBERG,J.E.. Erythema-inducing effects of solvent following apicutaneous administration to man: studied by laser doopler flowmetry. *Scan. J. Work Environ. Health.* Helsinki, v.10, p.159 - 162, 1984.

133. WALSH,D., THOMAS,I., ALLEN,R., KIDD,H., LYONS,G., TEMPLER,S., HANNANT,M.. Chemical safety data sheets, volume 1: solvents. The Royal Society of Chemistry, Loughborough, Leics, UK, p.184 - 185,1992.

134. WANG,J., CHANG,Y., KAO,K., HUANG,C., LIN,C., YEH,W.. An outbreak of n-hexane induced polyneuropathy among press proofing workers in Taipei. *Am. J. Ind. Med.* New York, v.10, p.111 - 118, 1986.

135. WORLD HEALTH ORGANIZATION, *Health and safety guide n° 59*, Geneva, 1991.

136. WORLD HEALTH ORGANIZATION, *Environmental health criteria n° 122*, Geneva, 1991.