UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Farmácia

Áreas Toxicologia e Análises Toxicológicas

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DOS ÁCIDOS HIPÚRICO E
METIL HIPÚRICO URINÁRIOS POR CROMATOGRAFIA EM
FASE GASOSA VISANDO A BIOMONITORIZAÇÃO DE
TRABALHADORES EXPOSTOS AO TOLUENO E AO XILENO**

ALESSANDRA FERREIRA DOS SANTOS

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:

Prof^a. Dr^a. MARIA ELISA P. B. SIQUEIRA

São Paulo

2001

Alessandra Ferreira dos Santos

**DETERMINAÇÃO SIMULTÂNEA DOS ÁCIDOS HIPÚRICO E
METIL HIPÚRICO URINÁRIOS POR CROMATOGRAFIA EM FASE
GASOSA VISANDO A BIOMONITORIZAÇÃO DE
TRABALHADORES EXPOSTOS AO TOLUENO E AO XILENO**

Comissão Julgadora

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Prof.^a Dr.^a Maria Elísa Pereira Bastos Siqueira
Orientador/ Presidente

1º Examinador

2º Examinador

São Paulo, 2001.

Dedico este trabalho

À **Nalda**, minha mãe...e ao **Moacir**, meu pai, que me ajudaram a construir o que sou hoje.

E com todo amor,
à **Licka** e ao **Neto**, meus irmãos, por todo carinho, estímulo e incentivo em todas as horas.

Ao Maurício

pelo apoio, ajuda, compreensão e carinho,
que foram imprescindíveis no momento
final deste trabalho.

À prof. Dra. **Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira**

todo meu carinho, por ter sido muito mais que apenas minha orientadora. Agradeço pela compreensão e paciência.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas do curso de pós-graduação Adriano, Daniela, Eliane, Fábio, Isarita, Jussara, Paulo, Maurício, Michela, Miriam e Vanessa pela saudável e divertida convivência, em especial a Claudinha e Fernanda que me ajudaram muito nesta etapa.

À amiga sempre presente Denise.

À professora Elizabeth de Souza Nascimento, minha admiração e carinho pela ajuda, idéias, incentivo e pelas conversas descontraídas.

Aos Coordenadores do Curso de Pós-Graduação em Farmácia, programa de Toxicologia e Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, da Universidade de São Paulo, pela oportunidade.

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

Aos professores Miriam Salvadori, Henrique Della Rosa e Elizabeth de Souza Nascimento, pelas sugestões no exame de qualificação.

~~Às funcionárias Helena, Roseli, Dalva e Luzia pela efetiva ajuda na rotina de trabalho;~~

À equipe do Centro de Controle de Intoxicações da Unicamp, em especial a Sueli pelo incentivo e amizade;

Ao Dr. Boris, da Medic-Prev de São Paulo, pela ajuda preciosa que permitiu a coleta das amostras.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL.....	06
2.1 Propriedades físico-químicas	06
2.2 Usos e fontes de exposição	08
2.3 Toxicocinética.....	13
2.4 Efeitos tóxicos	32
2.5 Monitorização biológica.....	38
2.5.1 Biomarcadores de dose interna da exposição ao tolueno	38
2.5.2 Biomarcadores de dose interna da exposição aos xilenos	45
2.6 Aspectos analíticos	48
3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO	52
4. MATERIAL E MÉTODO.....	54
4.1 População estudada e ambiente de trabalho.....	54
4.2. Material.....	58
4.2.1 Soluções-padrão.....	58
4.2.2 Reagentes e solventes	58
4.2.3 Aparelhos, vidraria e acessórios.....	59
4.3 Método	60
4.3.1 Validação do procedimento analítico para a determinação simultânea dos ácidos hipúrico e metil hipúrico urinários	60
4.3.1.1 Otimização das condições cromatográficas	60
4.3.1.2 Linearidade	61
4.3.1.3 Curva de calibração	61
4.3.1.4 Limite de detecção	62
4.3.1.5 Limite de quantificação.....	62
4.3.1.6 Precisão do método analítico	62
4.3.1.7 Recuperação	63
4.3.1.8 Exatidão	63

4.3.1.9 Interferência de matriz.....	64
4.3.1.10 Estabilidade do analito na amostra.....	64
4.3.2 Procedimento de extração simultânea dos ácidos hipúrico e metil hipúrico em urina.....	64
4.3.3 Determinação da creatinina e da densidade urinária	66
4.3.4 Análise estatística.....	67
5.RESULTADOS	68
5.1 Validação do procedimento analítico para a determinação simultânea dos ácidos hipúrico e metil hipúrico urinários	68
5.1.1 Otimização das condições cromatográficas.....	68
5.1.2 Linearidade	70
5.1.3 Limite de detecção.....	71
5.1.4 Limite de quantificação	71
5.1.5 Precisão.....	71
5.1.6 Recuperação.....	72
5.1.7 Exatidão	72
5.1.8 Interferência da matriz	73
5.1.9 Estabilidade do analito na amostra.....	74
5.2 Ácido hipúrico e ácido metil hipúrico em amostras de urina de trabalhadores expostos ocupacionalmente a solventes (Grupo 1) e não-expostos (Grupos 2).....	75
6. DISCUSSÃO	83
7. CONCLUSÕES.....	96
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
9. ANEXOS	112

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.	Propriedades físico-químicas do tolueno e dos isômeros do xileno.....	08
TABELA 2.	Tolueno e xileno: produção e produtores nos anos 1998-99 (toneladas/ano).....	09
TABELA 3.	Interações toxicocinéticas entre solventes orgânicos industriais em estudos realizados com humanos.....	25
TABELA 4.	Interações toxicocinéticas após exposições simultâneas ao etanol e a um solvente orgânico (em humanos).....	29
TABELA 5.	Reagentes usados na derivação dos AH e <i>m</i> -AMH.....	51
TABELA 6.	Características da população avaliada, exposta a solventes nos setores de funilaria e pintura.....	56
TABELA 7.	Tempo de retenção do ácido hipúrico e do <i>m</i> -metil hipúrico com os respectivos desvios padrão e tempos de retenção relativos ao ácido heptadecanóico (PI), nas condições cromatográficas padronizadas.....	69
TABELA 8.	Precisão do método analítico para a determinação simultânea de ácido hipúrico (AH) e ácido <i>m</i> -metil hipúrico (AMH) urinários, expressa em função dos coeficientes de variação (CV).....	71
TABELA 9.	Recuperação do método para os ácidos hipúrico (AH) e <i>m</i> -metil hipúrico (AMH) adicionados em <i>pool</i> de urina.....	72
TABELA 10.	Inexatidão do método de determinação simultânea dos ácidos hipúrico (AH) e <i>m</i> -metil hipúrico (AMH) em urina, expressa em função de porcentagem.....	72
TABELA 11.	Valores do AH e do AMH em amostras de urina do grupo de trabalhadores não expostos.....	76

TABELA 12.	Valores dos ácidos hipúrico (AH) e metil hipúrico (AMH) em urina de trabalhadores expostos a solventes, no setor de funilaria e pintura.....	77
TABELA 13.	Medidas descritivas para as concentrações de ácido hipúrico (g/L e g/g de creat.) em trabalhadores expostos do setor de funilaria e pintura e grupo controle.....	80
TABELA 14.	Medidas descritivas para as concentrações de ácido hipúrico urinário em (g/g de creatinina) em trabalhadores expostos a solventes de acordo com o uso de equipamento de proteção individual (E.P.I.).....	81
TABELA 15.	Medidas descritivas para as concentrações de ácido hipúrico urinário, em g/g de creatinina em trabalhadores expostos a solventes no setor de funilaria e pintura de acordo com o hábito de fumar.....	81
TABELA 16.	Medidas descritivas para as concentrações de ácido hipúrico (g/g de creat.) em trabalhadores do setor de funilaria e pintura de acordo com a ingestão de bebidas alcoólicas.....	82

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Estrutura química do tolueno.....	06
FIGURA 2.	Estrutura química dos isômeros do xileno.....	07
FIGURA 3.	Aplicação industrial do tolueno no Brasil em 1999.....	11
FIGURA 4.	Aplicação industrial do xileno no Brasil em 1999.....	12
FIGURA 5.	Principais vias de biotransformação do tolueno.....	16
FIGURA 6.	Principais vias de biotransformação do <i>m</i> -xileno.....	19
FIGURA 7.	Fluxograma do procedimento analítico para a determinação simultânea dos ácidos hipúrico e metil hipúrico urinários.....	66
FIGURA 8.	Cromatogramas do branco de urina com ácido heptadecanóico (PI) (a) ; do <i>pool</i> de urina enriquecida com soluções dos ácidos hipúrico (AH) e <i>m</i> -metil hipúrico (AMH) na concentração de 2,5 g/L e (PI) (b)	69
FIGURA 9.	Curva de linearidade do ácido hipúrico (AH) em urina.....	70
FIGURA 10.	Curva de linearidade do ácido <i>m</i> -metil hipúrico (AMH) em urina.....	70
FIGURA 11.	Representação gráfica da curva de calibração do ácido hipúrico (AH) em água e em urina nas concentrações de 0,1 a 5,0 g/L.....	73
FIGURA 12.	Representação gráfica da curva de calibração do ácido <i>m</i> -metil hipúrico (AMH) em água e em urina nas concentrações de 0,2 a 5,0 g/L.....	73
FIGURA 13.	Estabilidade do ácido hipúrico (2,0 g/L) em amostra de urina, após 3 ciclos de congelamento/descongelamento..	74
FIGURA 14.	Estabilidade do ácido <i>m</i> -metil hipúrico (2,0 g/L) em amostra de urina, após 3 ciclos de congelamento/descongelamento.....	74

- FIGURA 15.** Cromatogramas relativos às amostras urina do trabalhador 24 do grupo 2 **(a)**; do trabalhador 63 do grupo 1 **(b)** e do trabalhador 1 do grupo 1 **(c)**..... 79
- FIGURA 16.** Representação gráfica das concentrações de ácido hipúrico (g/g creatinina) encontradas no grupo de trabalhadores expostos e no grupo controle..... 80

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Tempo de profissão (TP), sintomas relatados (*) e total de sintomas por pintor.....	92
--	----

SUMMARY

Toluene and the xylene, among others substances, are solvents used in several products, such as inks, thinners and glues, and are responsible for mixed exposure in workers. Thus, the aim of this work was to develop a simple, fast and reliable gas chromatographic method to allow the simultaneous detection and quantitation of hippuric acid (HA) and methyl-hippuric acid (MHA) in urine, which are internal dose bioindicators in the monitoring of occupational exposure to toluene and the xylene, respectively. After liquid-liquid extraction and derivation with trimethylphenylammonium, the chromatographic analysis was accomplished using capillary column 100% methylsiloxane, and heptadecanoic acid as internal standard. 69 workers exposed to inks in activities such as vehicles painting and 31 non-exposed workers were evaluated. The method showed linearity range between 0,1 (quantitation limit) and 5,0 g/L for HA and 0,2 (quantitation limit) and 5 g/L for MHA. The recovery was 81% and the inaccuracy of approximately - 8,0% (bias) for both analytes. The mean variation coefficients for the concentrations of 0,5; 2,0 and 4,0 g/L were, for the intra-assay precision, of 3,5% for HA and of 3,7% for MHA, and for the inter assay, 10,5% for HA and 10,7% for MHA. The analytes were stable for 3 freezing cycles of the urine samples. The medium value obtained in the exposed workers' samples was of 0,55 creatinina g/g (medium = 0,36 creatinina g/g). In spite of the observed statistical significant differences (test t Student, $p \leq 0,05$) among the medium values of HA in the exposed workers and the control groups, this difference was not detected when it was analyzed the respective median values. Smoking and drinking alcoholic beverages habits did not significantly alter the excretion of these bioindicators in the studied group.

RESUMO

O tolueno e o xileno são substâncias presentes, ao lado de outras, em vários produtos, entre eles as tintas, tóneres e colas, provocando exposição combinada dos trabalhadores a diversas substâncias químicas. Assim, foi objetivo deste trabalho desenvolver um método simples, rápido e confiável de cromatografia em fase gasosa que permitisse análise simultânea do ácido hipúrico (AH) e ácido metil-hipúrico (AMH) em urina, bioindicadores de dose interna utilizados na monitorização da exposição ocupacional ao tolueno e xileno respectivamente. Após extração líquido-líquido e derivação com trimetilfenilamônio, foi realizada análise cromatográfica em coluna capilar 100% polidimetilsiloxano, usando-se o ácido heptadecanóico como padrão interno. Foram avaliados 69 trabalhadores que manipulavam tintas em atividades de repintura de veículos e 31 trabalhadores não-expostos (controle). O método mostrou-se linear entre 0,1 (limite de quantificação) e 5,0 g/L para o AH e 0,2 (limite de quantificação) e 5 g/L para o AMH. A recuperação média foi de 81% e a inexatidão de aproximadamente – 8,0% (bias) para ambos os analitos. Os coeficientes de variação médios para as concentrações de 0,5; 2,0 e 4,0 g/L foram, para a precisão intra-ensaio, de 3,5% para o AH e de 3,7% para o AMH, e para a interensaio, de 10,5% para o AH e de 10,7% para o AMH. Os analitos permaneceram estáveis em até 3 ciclos de congelamento/descongelamento das amostras de urina. O valor médio obtido nas amostras de trabalhadores expostos foi de 0,55 g/g de creatinina (mediana = 0,36 g/g de creatinina). Apesar de diferença estatisticamente significativa (teste t Student, $p \leq 0,05$) ter sido observada entre os valores médios de AH nos trabalhadores expostos e nos do grupo controle, esta diferença não foi detectada quando analisou-se as medianas. O hábito de fumar e de ingerir bebidas alcoólicas também não mostrou alterar significativamente a excreção dos bioindicadores no grupo avaliado.

1 INTRODUÇÃO

O tolueno e o xileno são hidrocarbonetos aromáticos utilizados em diferentes processos industriais com significativo risco à saúde do trabalhador. Apesar disto o uso destes compostos como solventes aumentou nos últimos anos como uma opção mais segura em substituição ao benzeno.

Da mesma forma que outros hidrocarbonetos aromáticos, o tolueno e o xileno são produzidos a partir do petróleo e do óleo leve proveniente da destilação do carvão a altas temperaturas ²².

Na produção do coque em usinas siderúrgicas, quando o carvão mineral é destilado a alta temperatura, há formação de uma fração de óleos leves designada BTX, constituída de mistura de benzeno, tolueno e xileno. A destilação fracionada do BTX separa os três componentes e fornece os respectivos produtos comerciais: benzol, toluol e xilol. Esta denominação pode ser tanto dos solventes relativamente puros como das misturas dos três em diferentes proporções ^{22,39}.

A produção de tolueno e xileno no setor petroquímico se dá a partir das frações petrolíferas que passam por destilação para separação dos hidrocarbonetos e formam a denominada fração naftênica. A partir desta fração os hidrocarbonetos aromáticos são extraídos por solventes seletivos e os xilenos separados do benzeno e tolueno por destilação fracionada. A mistura de xilenos, que também incorpora o etilbenzeno, passa a sofrer tratamento especial que leva à separação individual dos xilenos. Primeiramente, é separado o *orto*-xileno por destilação fracionada; e em seguida, o etilbenzeno em uma série de três colunas de fracionamento, restando a mistura de *meta* e *para*-xilenos. Ambos os xilenos da mistura têm

pontos de ebulição muito próximos, não podendo ser separados por destilação. Processos especiais são então utilizados, sendo o mais usual o da cristalização. A mistura é submetida a resfriamento, sendo o *para*-xileno recuperado em centrífugas refrigeradas^{22,39}.

O xileno apresenta outro processo de formação que é a transalquilação do tolueno e aromáticos C₉. O tolueno, sob forma de vapor em alta temperatura e pressão, reage em presença de um catalisador metálico²².

O tolueno e o xileno são empregados no Brasil como solventes em diversos segmentos industriais do mercado, destacando-se principalmente os de tintas, tineres, vernizes, adesivos e colas, borrachas e resinas, indústria gráfica e de impressão^{22,26,27,30,38,39}. A composição das tintas e tineres não é bem especificada nos rótulos que os acompanham, os quais contêm somente a classe química dos solventes orgânicos presentes, sendo omitidas as informações sobre as proporções utilizadas de cada substância.

Em trabalho desenvolvido por LEPERA (1996)⁵⁹ no Brasil, o tolueno e o xileno foram os solventes qualitativamente predominantes na atmosfera de oficinas de repintura, aparecendo em 100% das amostragens, embora não fossem os de concentração mais elevada.

As oficinas de reparo e repintura automotiva estão entre os muitos processos que incorporam a pintura. De acordo com os pintores, para cada litro de tinta utilizada em repintura é consumido um litro de tiner para as diluições. O tiner é usado também na limpeza das peças a serem repintadas, na limpeza do revólver usado na aplicação da tinta e na lavagem das mãos.

Essa forma de utilização promove uma exposição simultânea dos trabalhadores a múltiplos solventes, podendo ocorrer uma interação na biotransformação das substâncias químicas, especialmente quando as estruturas químicas são similares, como é o caso do tolueno e do xileno. Relatos na literatura mostram que esta possível interação metabólica depende da intensidade da exposição ^{41,42,55,72,73,74,89,90}.

Os possíveis efeitos da mistura de solventes na saúde do trabalhador implicam em alterações no sistema nervoso central ^{12,31,73,74,83, 91,92}.

Os efeitos agudos são caracterizados por euforia, desorientação, vertigem e evoluem conforme o aumento da exposição para inconsciência, paralisia, convulsão e parada cardio-respiratória, além de irritação nos olhos e nas vias aéreas superiores ^{12,25,31,37,39,83,85}.

Os efeitos crônicos manifestados pelo sistema nervoso central são fadiga, distúrbios do sono, disfunção na visão das cores, irritabilidade, dificuldade de concentração, problemas de memória recente, disfunções psicomotoras e cefaléia ^{12, 31,37,39, 85,88}.

As discussões internacionais sinalizam a tendência de se estudar as interações toxicocinéticas e toxicodinâmicas nas exposições combinadas ^{2,16,25,38,42,89,90,92}. A *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) propõe que quando duas ou mais substâncias que atuam sobre o mesmo sistema orgânico estiverem presentes, devem ser considerados sobretudo seus efeitos combinados, mais do que os individuais. Os *Threshold Limit Values* (TLVs) podem ser ajustados para exposição às misturas, considerando principalmente os efeitos adversos aditivos, destacando-se em particular compostos que apresentam toxicodinâmica similar ^{2,6,7,89}. Porém, não há dados citados com relação a ajustes dos *Biological Exposure Index* (BEIs).

Segundo CHEN *et al.* (1994)²⁵ o perfil dos sintomas detectados nos trabalhadores expostos concomitantemente ao tolueno e xileno são similares aos encontrados após exposição ao tolueno e xileno isoladamente, como a depressão do sistema nervoso central (SNC) e a irritação local, sugerindo efeitos aditivos.

A ACGIH recomenda um valor limite média ponderada pelo tempo (TLV-TWA) de 50 ppm para o tolueno e de 100 ppm para o xileno ^{6,7}. No Brasil, a Norma Regulamentadora nº 15 (NR-15), Portaria 3214 estabelecida pelo Ministério do Trabalho, recomenda o Limite de Tolerância (LT) de 78 ppm para ambos os compostos ¹⁴.

A biomonitorização do trabalhador é outra medida importante na prevenção das intoxicações ocupacionais. Os bioindicadores são estabelecidos segundo as informações disponíveis sobre absorção, excreção e biotransformação de agentes químicos e suas correlações com a intensidade de exposição e/ou com efeitos nos trabalhadores ^{6,7}. A legislação brasileira recomenda como bioindicadores para as exposições ao tolueno e ao xileno, seus principais produtos de biotransformação excretados na urina, os ácidos hipúrico (AH) e metil hipúrico (AMH), respectivamente ¹⁵. A ACGIH propõe a determinação do tolueno no sangue além do AH na urina, e a partir de sua publicação de 1999 propõe, juntamente com os citados acima, a análise do *orto*-cresol urinário, produto secundário de biotransformação do tolueno ⁷.

O tolueno e o xileno passam por oxidação na cadeia lateral seguida por conjugação com a glicina, portanto, pode ocorrer interferência mútua na toxicocinética provocada pela exposição concomitante ^{25,38,42,44,89,90}.

O Índice Biológico Máximo Permitido (IBMP) adotado no Brasil para estes bioindicadores são de 2,5 g/g de creatinina para o ácido hipúrico e de 1,5 g/g de creatinina para o ácido metil hipúrico, em amostras de urina coletadas no final da jornada de trabalho ¹⁵.

No Brasil é usual a situação de exposição concomitante de trabalhadores ao tolueno e ao xileno e, portanto, é de interesse desenvolver métodos que permitam a quantificação dos ácidos hipúrico e metil hipúrico simultaneamente. É importante que o método desenvolvido seja simples, rápido, preciso, exato e exeqüível, sendo assim a validação do método etapa fundamental para permitir a obtenção de resultados fidedignos.

2 EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO TOLUENO E AO XILENO

2.1 Propriedades físico-químicas

O conhecimento das propriedades físico-químicas de um composto é importante para se inferir sua disponibilidade química e biodisponibilidade no organismo.

O **tolueno** é um líquido incolor, volátil, de odor doce e penetrante. É inflamável, muito pouco solúvel em água (0,8 g/100 mL a 20°C) e solúvel em solventes orgânicos (acetona, éter, metanol, etanol, clorofórmio, bissulfeto de carbono e benzeno). Os sinônimos mais freqüentes do tolueno são toluol (produto comercial, no Brasil), metilbenzeno, fenilmetano e metacide. Sua estrutura química (Figura 1) consiste de sete átomos de carbono e oito átomos de hidrogênio. O tolueno comercial pode apresentar traços de benzeno como impurezas e outros hidrocarbonetos aromáticos^{26,39}.

FIGURA 1. Estrutura química do tolueno.

Os **xilenos** são geralmente encontrados como mistura dos isômeros *orto*, *meta* e *para*. A mistura é um líquido incolor, volátil, de odor adocicado, característico dos hidrocarbonetos aromáticos. É inflamável, praticamente insolúvel em água e miscível com solventes orgânicos (álcool, éter, acetona e benzeno). Os sinônimos mais comuns são xilol (produto comercial, no Brasil), metiltolueno e dimetilbenzeno. A sua estrutura química consiste de

oito átomos de carbono e dez átomos de hidrogênio (Figura 2); o isômero *meta*-xileno é o mais importante do ponto de vista ocupacional, constituindo cerca de 75% do produto de grau técnico^{26,38,39}.

O produto de grau técnico, representado pela mistura dos três isômeros em diferentes proporções, apresenta impurezas como etilbenzeno, tolueno, trimetilbenzeno, fenol, piridina e benzeno. Tanto os isômeros como as impurezas aparecem em quantidades variadas, dependendo do produto comercial, sendo o etilbenzeno, quantitativamente, o principal contaminante desta mistura^{26,39,56}.

FIGURA 2. Estrutura química dos isômeros do xileno.

Algumas propriedades físico-químicas relativas ao tolueno e ao *m*-xileno são descritas a seguir na Tabela 1.

TABELA 1. Propriedades físico-químicas do tolueno e dos isômeros do xileno ^{26,39}.

propriedades físico-químicas	tolueno	m-xileno	p-xileno	o-xileno
ponto de ebulição (°C)	110,6	139,1	138,4	144,1
ponto de fusão (°C)	-95	-47,9	13,3	-25,2
densidade específica (a 20°C)	0,867	0,864	0,861	0,880
pressão de vapor (mmHg/25°C)	28,4	8,3	8,9	6,8
fórmula molecular	C ₇ H ₈	C ₈ H ₁₀	C ₈ H ₁₀	C ₈ H ₁₀
peso molecular	92,12	106,18	106,18	106,18
fator de conversão (ppm→mg/m ³)	1 = 3,76	1 = 4,34	1 = 4,34	1 = 4,34

2.2 Usos e fontes de exposição

O uso do tolueno e do xileno no Brasil vem crescendo progressivamente em virtude da substituição ao benzeno, como solventes industriais. Mesmo oferecendo menor risco ocupacional estes dois hidrocarbonetos precisam ser monitorizados a fim de reduzir ao máximo os danos que podem provocar na saúde do trabalhador exposto.

Os maiores produtores mundiais de tolueno e xileno são os Estados Unidos, o Japão e os países do oeste da Europa, sendo a produção mundial estimada em 10 milhões de toneladas por ano, de cada um dos solventes ^{10,39}. O Brasil passou a exportador destes produtos no início da década de 80; até então, o país importava cerca de 20% do que consumia. No Brasil, a produção de tolueno e xileno em 1998-99 foi de 212.950 toneladas e 259.200 toneladas, respectivamente ^{10,22}. A Tabela 2 descreve a produção de tolueno e xileno no Brasil, segundo seus principais produtores (1998-99).

TABELA 2. Tolueno e xileno: produção e produtores nos anos 1998-99 (toneladas/ano)^{10,22}.

empresa	local	tolueno produzido (t/ano)	xileno produzido (t/ano)
Cia. Brasileira de Estireno (CBE)	SP	3.500	-
Petroquímica do Nordeste (COPENE)	BA	40.000	94.000
Cia. Petroquímica do Sul (COPE SUL)	RS	24.000	61.000
EDN-Poliestireno do Sul Ltda. (EDN-Sul)	BA	6.750	-
Petrobrás Petróleo Brasileiro S.A	SP	62.700	24.200
(Petrobrás)		76.000	80.000
Petroquímica União S.A (PQU)	SP		
total		212.950	259.200

O **tolueno** é produzido durante as operações de refinamento do petróleo, manufatura do estireno e coque. Através dos processos de transformação catalítica e quebra pirolítica de mistura de hidrocarbonetos. A transformação catalítica é responsável por 87% do tolueno produzido nos EUA. Sua fonte secundária é a queima da gasolina, na qual é formado durante a quebra pirolítica apresentando-se na forma de hidrocarbonetos pesados para manufatura de óleos. É obtido também durante a manufatura do estireno, quando o etilbenzeno é desidrogenado. O tolueno isolado dos outros hidrocarbonetos é utilizado na produção do benzeno e na mistura de gasolina. Menos de 10% vem do coque de óleo leve^{22,39}.

O tolueno possui uma multiplicidade de aplicações como solvente nas indústrias de tintas e revestimento. Quantidades significativas são usadas na fabricação de tintas de escrever ou imprimir, adesivos, produtos formulados, indústrias farmacêutica e de couro^{10,22,39}.

Quando isolado, sua principal utilização nos EUA é na produção do benzeno. Está presente em domissanitários, aerossóis caseiros, tintas e vernizes, tineres e anticorrosivos ³⁹.

A mistura contendo tolueno, benzeno e xilenos, que nunca são separados nas refinarias, pode ser encontrada na gasolina automotiva, ampliando o problema de exposição ³⁹.

O tolueno é usado na produção do tolueno diisocianato (produção de poliuretanas), ácido benzóico para manufatura de conservantes de alimentos e cosméticos, viniltolueno, trinitrotolueno, benzaldeído, sacarina e manufatura do *para*-cresol ^{22,39}.

Na Europa, o principal derivado do tolueno é o fenol seguido pelo tolueno diisocianato, e no Japão é usado principalmente para produção do benzeno e *para*-cresol ³⁹.

No Brasil, o tolueno é usado como solvente ou diluente, em particular na elaboração de tintas e vernizes e como matéria prima básica na fabricação do tolueno diisocianato (fabricação de espuma). Como solvente é usado ainda em diversos produtos, como adesivos e colas, borrachas e resina, lacas e tineres, herbicidas, indústria gráfica e de impressão, de calçados e metalúrgica. Além disso, o tolueno serve como base para diversos produtos, tais como: sacarina, aspirina, metilestireno, viniltolueno e trinitrotolueno ²². A Figura 3 mostra o destino do tolueno produzido no Brasil.

Figura 3. Aplicação industrial do tolueno no Brasil em 1999 ¹⁰.

A mistura de **xilenos** é produzida a partir do petróleo, principalmente pela transformação catalítica de naftas. Para a separação dos isômeros são utilizados processos de extração e destilação, em diferentes pontos de ebulição. Outra fonte da mistura de xilenos é a quebra da gasolina, que resulta da manufatura de óleos e é menos eficiente para a separação dos isômeros e das impurezas; neste caso, a quantidade de etilbenzeno é alta. As operações de refinamento de petróleo produzem principalmente benzeno e tolueno; os xilenos, obtidos a partir desta fonte, são livres de etilbenzeno. Menos de 1% da mistura de isômeros é derivada do carvão. O óleo leve contém 3-6% da mistura de xilenos ^{22,39}.

O uso da mistura de xilenos como solvente é muito amplo: para colas e resinas, borrachas, óleos de rícino e linhaça e dibenzilcelulose; como constituinte de tintas, vernizes, lacas, corantes, tintas de escrever e imprimir, formulações de limpeza e adesivos. É carreador na produção de resinas e também agente desengraxante e de limpeza; é constituinte de combustíveis de motores automotivos e de aviação; utilizado na síntese química, na manufatura de cristais de quartzo e em perfumes e repelentes de insetos ^{22,39}.

Os xilenos são ainda utilizados como material bruto para a produção de ácido benzóico e de outros ácidos, cujos dimetilésteres são usados no processo de manufatura de fibras de poliéster, de tintas coloridas e outros solventes orgânicos e em técnicas de microscopia ²².

No Brasil, a mistura de xilenos é destinada ao mercado de solventes pesados. Os isômeros, obtidos a partir da mistura, são utilizados como matéria prima básica de outros produtos petroquímicos: anidrido ftálico empregado na produção de plastificantes, resinas alquílicas, ácido tereftálico e dimetiltereftalato, os quais servem como matéria prima para produção de fibras de poliéster ²². A Figura 4 mostra o destino do xileno produzido no Brasil.

Figura 4. Aplicação industrial do xileno no Brasil em 1999 ¹⁰.

Qualquer que seja o ambiente de trabalho, onde se use tolueno e xilenos ou mistura de ambos, pode ocorrer volatilização parcial destes solventes nas temperaturas usuais destes locais. Assim, os indivíduos que neles permanecem podem se expor através de seus vapores ou ainda pelo contato do líquido com a pele.

2.3 Toxicocinética

Tolueno

A absorção do tolueno nas exposições ocupacionais ocorre pelas vias cutânea e pulmonar. Considerando a sua volatilidade, a principal via de introdução é a respiratória, sendo este composto absorvido através da inalação de seus vapores. O risco de intoxicação no ambiente de trabalho como resultado da exposição por via dérmica é pequeno, embora a absorção cutânea deva ser considerada quando combinada com a absorção pelas vias aéreas^{26,27,33,39,57,65,86}.

Em humanos, a velocidade de absorção do tolueno pela pele íntegra varia de 14 a 23 mg/cm²/h³⁹. MONSTER *et al.* (1993)⁶⁵ cita este valor como sendo 0,5 mg/cm²/h. O contato direto com o tolueno líquido resulta em retenção 25 vezes menor do que a retenção representada pela absorção pulmonar do tolueno na forma de vapor^{27,86}.

A quantidade de tolueno absorvida pelos pulmões é estimada como sendo de 40 a 60% da quantidade inalada e depende de variáveis como: concentração no ar inalado, extensão da exposição, ventilação pulmonar, gradiente de concentração no espaço alveolar, coeficiente de distribuição sangue/ar e em menor proporção da circulação através dos alvéolos^{26,27,33}.

Qualquer que seja a quantidade de tolueno inalada, as suas concentrações no ar alveolar e no sangue arterial aumentam rapidamente durante os primeiros 10-15 min de exposição, continuando lentamente até alcançar nível constante em torno de 25-30 min. Neste período, a retenção pulmonar é de 75-80%. A retenção vai diminuindo a medida que vai sendo atingido o estado de equilíbrio e após 2-3 horas de exposição os valores são constantes e em torno de 40-50%^{17,26,27,33,39}.

Alguns casos relacionados com a ingestão acidental e a tentativa de suicídio demonstraram que o tolueno é também absorvido pelo trato gastrointestinal²⁷.

A solubilidade do tolueno no sangue é indicada pelo coeficiente de partição sangue/ar que é aproximadamente 15 a 37°C, e este valor é um dos fatores que determina a absorção pulmonar^{27,33,57}. Outros autores citaram este valor como sendo 23³² e 36¹⁹.

A dinâmica do tolueno no organismo humano é definida pela solubilidade nos fluidos biológicos, indicada pelo seu coeficiente de distribuição tecido/sangue e pela vascularização tecidual. Em humanos, os coeficientes de distribuição tecido/sangue para a maioria dos tecidos são entre 1 e 3, com exceção do tecido adiposo e medula óssea que é aproximadamente de 8; por esta razão o tolueno alcança rapidamente altos níveis nestes dois últimos tecidos. Nos experimentos feitos em coelhos os coeficientes de partição tecido/sangue são: tecido adiposo 113, medula óssea 35, sendo que em outros tecidos este número é igual para os humanos 1-3^{26,27}.

A saída do tolueno da corrente sangüínea ocorre em três fases. A fase inicial ou α , com $t_{1/2}$ igual a 3 minutos, a segunda denominada rápida

ou fase β , $t_{1/2}$ de 40 minutos e a última, fase lenta ou γ com $t_{1/2}$ igual a 738 minutos^{8,67}.

O tolueno é biotransformado principalmente no fígado pelas enzimas oxidases de função mista que formam o sistema enzimático citocromo P450 localizado no retículo endoplasmático liso^{9,26,27,94}.

A principal via de biotransformação é a oxidação do grupamento metila da cadeia lateral. Primeiramente ocorre a formação do álcool benzílico, mediado pelo citocromo P450, seguindo-se a oxidação a benzaldeído, pela ação da álcool desidrogenase e, finalmente, a formação do ácido benzóico catalizada pela aldeído desidrogenase. No homem, o tolueno é quase que exclusivamente convertido a ácido benzóico, em torno de 75 a 80% da quantidade absorvida. O ácido benzóico conjuga-se com a glicina formando o ácido hipúrico (62-80%) e em menor proporção com o ácido glicurônico, produzindo benzoilglicuronídeos^{9,26,27,29,39,57,79,94}. A capacidade de conjugação do ácido benzóico com a glicina parece ser uma etapa saturável quando as concentrações de tolueno no ar são de 780 ppm durante trabalho leve (ventilação pulmonar 10 L/min) e 270 ppm durante trabalho pesado (ventilação pulmonar 30 L/min), quando ocorre a conjugação com o ácido glicurônico^{26,27,57,76}.

Outra via de biotransformação é a oxidação aromática, formando compostos fenólicos pela arilmonoxidase, dando origem a um epóxido e posteriormente aos isômeros *orto*, *meta* e *para*-cresol, que serão conjugados com o ácido glicurônico e sulfatos. Cerca de 1% do tolueno absorvido é biotransformado em *para*-cresol e 0,1% em *orto*-cresol^{9,26,27,29,57,79}.

FIGURA 5. Principais vias de biotransformação do tolueno ⁷⁹.

A maior parte do tolueno é eliminada na urina na forma de ácido hipúrico que representa 60 a 75% da quantidade absorvida. A excreção deste metabólito é rápida, aproximadamente 18 a 20 horas após a exposição e elevada nos primeiros 30 minutos. Cerca de 80% do ácido benzóico são excretados como ácido hipúrico e 20% como benzoilglicuronídeo. A meia-vida biológica do ácido hipúrico é em torno de 3 horas e sua completa eliminação se dá em 18 horas ^{9,26,27,39,57,76,79}.

Somente uma proporção reduzida do tolueno é excretada inalterada na urina, cerca de 0,06% ^{47,52,76}.

Em estudos com humanos, nos quais o tolueno foi absorvido pela inalação de seus vapores, a eliminação pulmonar variou de 15 a 20% da quantidade absorvida. A concentração de tolueno no ar expirado decresce rapidamente durante os primeiros 10 minutos após a exposição e 5 horas após encontra-se muito baixa^{26,27,29,33,76}.

Menos de 2% do tolueno absorvido é excretado inalterado ou como metabólitos através da bile. Entretanto, sofre reabsorção e somente proporção muito pequena é eliminada nas fezes²⁷.

Xileno

A toxicocinética dos isômeros do xileno em humanos já vem sendo citada na literatura desde a década de setenta. Sabe-se que as vias de absorção cutânea e, principalmente, a pulmonar são as de maior importância quando se trata de exposição ocupacional ao xileno. O *m*-xileno é o isômero predominante no produto de grau técnico; conseqüentemente este isômero terá maior destaque que os outros dois, *para* e *orto*, para refletir as condições do ambiente de trabalho^{39,50,63,81,83}.

O xileno líquido é absorvido pela pele íntegra com velocidade que varia de 3 a 4 mg/cm²/h e aumenta cerca de 3 vezes se a pele estiver lesada. Durante a exposição aos vapores de xileno a taxa de absorção pela via cutânea corresponde a 3% da proporção absorvida pelos pulmões através da inalação^{26,56}.

CLARK (1983)²⁶ citou estudos da ECETOC - *European Chemical Industry Ecology e Toxicology Centre* sobre a absorção cutânea do isômero *m*-xileno em voluntários expostos a esse solvente. Os autores descreveram que, após 15 minutos de imersão das duas mãos no *m*-xileno líquido, os

valores de sua concentração no ar exalado foram semelhantes aos observados após 15 minutos de exposição a 100 ppm desse solvente no ar.

Nos primeiros 5 a 10 minutos de exposição aos vapores do *m*-xileno a absorção é intensa e ocorre rápido equilíbrio da concentração sangüínea. Durante esse período a retenção pulmonar é de 60%^{39,50,60,81,82,83}.

O coeficiente de partição entre o ar e o sangue, um dos fatores mais importante que determina a absorção pulmonar e indica a solubilidade do xileno no sangue, foi reportado com sendo aproximadamente 35^{81,83}.

O xileno é distribuído rapidamente para os tecidos, concentrando-se naqueles que apresentam maiores concentrações de lipídeos e, após alguns dias, pode ser redistribuído para o sangue⁸¹. A distribuição do *m*-xileno se dá em função da solubilidade do composto no tecido, do volume do tecido e da perfusão tecidual. O *m*-xileno é muito solúvel no sangue e o equilíbrio ocorre em aproximadamente 3 horas; este solvente liga-se às proteínas plasmáticas, principalmente com a albumina, e pequenas quantidades fixam-se nas células^{26,56,81,83}.

Cerca de 10% do *m*-xileno absorvido pelos pulmões é distribuído para o tecido adiposo, sendo a eliminação deste local lenta, mais ou menos 58 horas podendo resultar em baixas concentrações de *m*-xileno no sangue. Em humanos, os coeficientes de distribuição tecido adiposo/sangue é 90-100 e lipídeo/ar é 3,6. São citados, em coelhos, os seguintes coeficientes de partição sangue/rins: 1,7; sangue/fígado 3,0 e sangue/cérebro 3,3^{56,81,82,83}.

RIIHIMAKI *et al.* (1979)⁸¹ observaram que a absorção, assim como a eliminação de *m*-xileno dos tecidos, dá-se em poucos minutos nos órgãos parenquimais, em poucas horas nos músculos e em poucos dias no tecido adiposo.

Em organismos humanos, 95% do *m*-xileno absorvido por inalação é biotransformado e excretado como metabólitos urinários, quase que exclusivamente como ácido *m*-metil hipúrico e 1-2% como xilenóis. A biotransformação dos xilenos acontece na fração microssômica do fígado. Primeiramente ocorre uma hidroxilação com formação do derivado alcoólico - álcool metilbenzílico. Este derivado sofre oxidação no citosol produzindo o metilbenzaldeído por ação da enzima álcool desidrogenase. O metilbenzaldeído formado sofre interferência da enzima aldeído desidrogenase e forma o ácido metilbenzóico que por sua vez conjuga-se com a glicina e produz os ácidos metil-hipúricos correspondentes. Ocorre também oxidação no anel aromático com formação de metabólitos fenólicos, (xilenóis) que são excretados pela urina na forma inalterada ou conjugados com o sulfato e ácido glicurônico. Existem diferenças nas proporções dos metabólitos formados de acordo com os isômeros do xileno e das espécies envolvidas^{26,39,50,56,57,81,83}.

FIGURA 6. Principais vias de biotransformação do *m*-xileno¹⁹.

O xileno pode também ser biotransformado em outras partes do organismo. O trato respiratório é reconhecido como sendo sítio de biotransformação deste xenobiótico^{26,56}.

Os produtos de biotransformação do xileno são excretados em maior parte pelos rins, numa fase lenta e numa fase rápida. Este fenômeno indica que o xileno é distribuído nos compartimentos teciduais com diferentes velocidades de eliminação: a primeira fase ocorre nas primeiras 10h ($t_{1/2}$ 2 a 5h) e a segunda em torno de 2 dias ($t_{1/2}$ 16 a 48h)^{39,56,81}.

Em humanos, aproximadamente 36% do xileno absorvido é excretado no final da jornada de trabalho. Cerca de 70-80% dos metabólitos são eliminados dentro de 24h após cessada a exposição. Parte do solvente acumulado no tecido lipídico é removida lentamente durante um período de dias. Somente 5% é eliminado inalterado pelos pulmões, com o ar exalado^{39,50,57,81}.

Fatores que interferem na toxicocinética do tolueno e do xileno

O efeito tóxico de um solvente orgânico depende da dose que atinge o órgão alvo e da magnitude deste efeito. No caso de dose externa fixa, a dose no órgão alvo pode aumentar ou diminuir devido às mudanças na absorção, distribuição, biotransformação ou excreção. Estudos que visam estabelecer os fatores que modificam a toxicocinética são importantes para avaliação do risco, bem como no desenvolvimento de métodos para monitorização biológica da exposição. Alguns dos muitos fatores que alteram a biodisponibilidade dos solventes e que podem ocorrer no ambiente de trabalho, são:

Via de introdução

A maioria dos solventes são altamente voláteis e por isto a principal via de introdução é a respiratória. A extensão da absorção pulmonar depende da concentração no ar inalado e da duração da exposição, em adição à velocidade de ventilação, o coeficiente de partição sangue/ar, a perfusão de sangue nos pulmões e os vários coeficientes de partição tecido/sangue ².

A absorção percutânea ocorre principalmente através de difusão passiva. A taxa de absorção depende da área da pele que é exposta, do tempo de exposição, das condições e espessura da pele, do estado de hidratação, temperatura e do fluxo sanguíneo da pele. Substâncias lipofílicas têm alta permeabilidade neste tecido que é barreira mais eficiente contra compostos hidrofílicos. No contexto ocupacional, devido à alta volatilidade da maioria dos solventes, a pele é exposta mais freqüentemente aos vapores do que ao líquido, sendo os mesmos os fatores que determinam a absorção destas formas ^{62,80}.

A absorção percutânea de vapores de solventes é usualmente considerada desprezível quando comparada à absorção pulmonar. Entretanto, em locais onde se trabalha com grande quantidade de solventes, pode ocorrer derramamento na pele e a absorção dérmica torna-se significativa ^{62,80}.

Atividade física

As diversas tarefas realizadas no local de trabalho correspondem a diferentes níveis de atividade física, e a carga de trabalho passa a ser uma variável no processo fisiológico e toxicológico. Na avaliação do risco toxicológico muitas vezes esta variável é subestimada. Além do aumento da

ventilação pulmonar e alveolar, a atividade física também influencia grande número de outros fatores fisiológicos que determinam a toxicocinética, como por exemplo: mudanças hemodinâmicas, pH, temperatura corporal, função gastrointestinal, redução do fluxo sanguíneo no fígado e biotransformação⁶².

A atividade física é associada ao aumento da ventilação pulmonar e da frequência cardíaca aumentando conseqüentemente a absorção pela via inalatória^{13,62,75,82}.

RIIHIMAKI *et al.* (1979)⁸² realizaram um estudo no qual compararam a absorção pulmonar do *m*-xileno em voluntários em repouso e submetidos a exercícios físicos (100 W). A média das concentrações de *m*-xileno no ar (100 ppm) foi idêntica nas duas situações de exposição. Os autores constataram que a absorção do *m*-xileno foi aproximadamente 50% maior quando coincidiu com as sessões de exercícios.

A proporção absorvida dos vapores de solvente também depende da sua solubilidade no sangue e da capacidade do organismo de eliminá-lo. Para solventes como o xileno que são altamente solúveis no sangue e/ou rapidamente biotransformados, a taxa de absorção é limitada pelo fluxo de ar nos pulmões. Em conseqüência, é aproximadamente proporcional à ventilação pulmonar e alveolar e aumenta quase que linearmente com a carga de trabalho. No caso do xileno, a absorção foi cinco vezes maior quando a carga de trabalho é próxima de 150W do que em repouso. O mesmo ocorre com o tolueno mas com menor proporcionalidade entre absorção e carga de trabalho^{62,82}.

Os solventes orgânicos tendem a se acumular no tecido adiposo. Este fato é confirmado em experimento feitos com voluntários, nos quais a concentração de tolueno em tecido subcutâneo é 10 vezes maior após atividade física leve em relação ao repouso. Neste mesmo estudo, os níveis

de tolueno no ar exalado e no sangue, quando coincidiram com a prática de exercícios, foram o dobro dos níveis apresentados no repouso ⁶².

A excreção de solvente inalterado através do ar exalado aumenta durante a atividade física da mesma maneira que a absorção por inalação ^{13,82}. BAEUM *et al.* (1987)¹¹ notaram que a concentração de tolueno medido no ar exalado de trabalhadores que fizeram esforço físico leve (50 W) era duas vezes maior do que a concentração de tolueno no ar exalado daqueles que estavam em estado de repouso.

Constituição corpórea

Pessoas que possuem maior quantidade de tecido adiposo, quando expostas a solventes orgânicos solúveis em gordura, podem apresentar baixas concentrações destes solventes no sangue e no ar exalado coletados durante a exposição. Entretanto, após a exposição, as concentrações sanguíneas poderão estar relativamente altas pois os solventes armazenados nos lipídeos vão sendo lentamente liberados ¹⁶.

Biotransformação

A toxicidade dos solventes orgânicos é largamente dependente da extensão da biotransformação que ocorre, principalmente, no fígado mas também em outros tecidos, como rins, pulmões, cérebro, intestino, pâncreas e pele. As reações de fase I, realizadas pelo sistema citocromo P450 são consideradas passo limitante na transformação de muitos solventes. Este sistema é subdividido em famílias. A família CYP2 inclui CYP2B e CYP2E, enzimas responsáveis pela indução provocada pelo fenobarbital e etanol respectivamente. Estas enzimas são também envolvidas na biotransformação de alguns solventes. O CYP2E1 e alguns outros citocromos P450, além dos substratos específicos, biotransformam

solventes com estruturas químicas diversas, como benzeno, tolueno, xileno, hexano, clorofórmio e tricloretileno ⁶².

Exposição à mistura de solventes

No local de trabalho é comum que haja exposição simultânea a diversos solventes. Apesar disso, pouco se conhece sobre os efeitos adversos causados pela exposição múltipla no homem. Alguns estudos descritos na literatura com animais de experimentação e voluntários humanos, avaliaram a interação entre solventes, em particular a indução e inibição de sistemas enzimáticos envolvidos na biotransformação de substâncias. As interações são geralmente esperadas quando um solvente é biotransformado pelo mesmo sistema enzimático que outro e a enzima é limitante no passo da biotransformação ^{38,39,41,42,72,75,89,90,92,94}. A Tabela 3 mostra as interações ocorridas entre os solventes orgânicos.

TABELA 3. Interações toxicocinéticas entre solventes orgânicos industriais em estudos realizados com humanos.

solventes (níveis de exposição)	efeitos da interação	referência
Benzeno + tolueno (exposição ocupacional)	Inibição metabólica mútua expressa como redução na excreção de fenol, ácido hipúrico e o-cresol.	Inoue <i>et al.</i> , 1988 b
Benzeno + tolueno (25 + 100 ppm)	Nenhum efeito nos níveis dos solventes no sangue e no ar exalado.	Sato e Nakajima, 1979
Dimetilformamida + tolueno (exposição ocupacional)	Indução na excreção de monometilformamida.	Kawai <i>et al.</i> , 1992b
Etilbenzeno + tolueno (exposição ocupacional)	Impedimento da formação de fenol a partir do <i>m</i> -xileno e não a partir do etilbenzeno	Angerer e Lehnert, 1979
Etilbenzeno + <i>m</i> -xileno (150 + 150 ppm)	Inibição metabólica mútua ocorrendo redução na excreção urinária dos ácidos mandélico, fenilglioílico e <i>m</i> -metil hipúrico.	Engström <i>et al.</i> , 1984
n-Hexano + tolueno (exposição ocupacional)	Tendência em reduzir a excreção da 2,5-hexanodiona na urina.	Cardona <i>et al.</i> , 1993
Metiletilcetona + tolueno (exposição ocupacional)	Nenhum efeito observado na excreção urinária do ácido hipúrico.	Ukai <i>et al.</i> , 1994
Metiletilcetona + tolueno (100 + 50 ppm)	Nenhum efeito na concentração de solvente no ar exalado e no sangue.	Dick <i>et al.</i> , 1984 Tolos <i>et al.</i> , 1987
Metiletilcetona + <i>m</i> -xileno (200 + 100 ppm)	Aumento nos níveis de xileno no sangue e diminuição da excreção de ácido <i>m</i> -metil hipúrico na urina. Não observados efeitos para metiletilcetona no sangue e nem para 2,3-butanodiol na urina.	Liira <i>et al.</i> , 1988
Metilisobutilcetona + tolueno (25 + 20 ppm)	Nenhum efeito na concentração sangüínea de metilisobutilcetona.	Wigaeus Hjelm <i>et al.</i> , 1990
Isopropanol + tolueno (exposição ocupacional)	Sem efeito observado na excreção de ácido hipúrico urinário.	Ukai <i>et al.</i> , 1994
Tolueno + <i>p</i> -xileno (54 + 22 ppm)	Decréscimo nas concentrações de ar exalado e de sangue para ambos os solventes.	Wallén <i>et al.</i> , 1985
Tolueno + xileno (exposição ocupacional)	Nenhum efeito na excreção dos ácidos hipúrico e metil hipúrico em urina.	Huang <i>et al.</i> , 1994

Continuação da TABELA 3

solventes (níveis de exposição)	efeitos da interação	referência
Tolueno + xileno (95 + 80 ppm)	Aumento nos níveis dos solventes no sangue. Atraso na excreção urinária de ácido hipúrico mas não na de ácido metil hipúrico.	Tardif <i>et al.</i> , 1991
Tolueno + xileno (50 + 40 ppm)	Nenhum efeito nos níveis dos solventes no sangue, nem na excreção dos metabólitos ácidos urinários.	Tardif <i>et al.</i> , 1991
1,1,1 –Tricloroetano + <i>m</i> -xileno (400 + 200 ppm)	Nenhum efeito observado nos níveis dos solventes no sangue.	Savolainen <i>et al.</i> , 1981
<i>m</i> -xileno + (<i>n</i> - acetato de butila, <i>n</i> - álcool butílico, <i>n</i> -hexano, metil isobutil cetona ou tolueno) (min. 120 ppm e máx. 340 ppm)	Aumento na excreção urinária de ácido metil benzóico somente observado após co-exposição com o <i>n</i> -acetato de butila.	Jakubowski e Kostrzewski, 1989
<i>m</i> -xileno + (butanol, acetato de butila e metilisobutilcetona) (100 + 100 mg/m ³)	Decréscimo na excreção do ácido metil hipúrico em urina após exposição à mistura de solventes.	Tarkowski, 1983

Fonte: LOF A. & JOHANSON G., (1998)⁶² - modificado

O tolueno e o xileno são compostos presentes no local de trabalho, muitas vezes em combinação. Os mesmos sofrem biotransformação por via metabólica similar – oxidação da cadeia lateral seguida por conjugação com a glicina. A ocorrência da interação toxicocinética entre o tolueno e o xileno tem sido confirmada em estudos com ratos e com voluntários humanos. Este fato é caracterizado pelo aumento das concentrações dos solventes inalterados no sangue e no ar exalado e também pela diminuição e atraso na excreção dos seus metabólitos urinários^{38,41,42,72,89,90,94}.

TARDIFF *et al.* (1991)⁸⁹, em estudos realizados com voluntários expostos concomitantemente ao tolueno e ao *m*-xileno, observaram que em baixas concentrações dos solventes no ar (50 e 40 ppm, respectivamente) não surgem efeitos de interação metabólica. Já nas exposições a altas concentrações de ambos (95 ppm de tolueno e 80 ppm de *m*-xileno) estes

autores descreveram aumento das concentrações dos solventes no sangue e no ar exalado, seguida da diminuição e atraso na eliminação dos produtos de biotransformação através da urina.

Estudos em ratos de exposições combinadas tolueno e xileno, resultam em importantes interações metabólicas, sugerindo inibição mútua na biotransformação destes solventes. A intensidade da exposição combinada em experimentos animais geralmente é bem maior que nos estudos realizados com humanos, e isto nem sempre irá refletir o ambiente de trabalho. Deve-se ressaltar que as doses administradas em animais não podem ser extrapoladas para humanos ^{42,89,90,94}.

As interações metabólicas dependem das quantidades dos solventes inalados simultaneamente. Altas doses destes solventes podem saturar a capacidade da enzima envolvida na biotransformação e ocasionar interações. A exposição simultânea pode afetar os valores dos parâmetros biológicos usados na monitorização ocupacional. Dependendo do parâmetro selecionado pode-se hiper ou hipoestimar o risco para a saúde do trabalhador ^{2,38,41,42,72,89,90,94}.

Etanol

Em geral o efeito do etanol na biotransformação dos solventes varia de acordo com a concentração do solvente na exposição, a dose de álcool, o tempo de consumo do álcool em relação à exposição ao solvente, a depuração metabólica em relação ao fluxo de sangue no fígado e as espécies estudadas ^{39,62,89,91}.

A absorção de álcool etílico em quantidades moderadas tem efeito inibitório marcante na biotransformação de alguns solventes orgânicos. Numa exposição ocupacional a solventes, quando o consumo de bebidas alcoólicas é vasto e a dose ingerida abundante, o etanol comporta-se como inibidor competitivo relativamente fraco^{39,49,62,93}.

Dependendo da quantidade de álcool e da velocidade de ingestão da bebida, os efeitos na biotransformação dos solventes orgânicos podem ser opostos. Durante ou logo após a ingestão de altas doses de etanol, quando este ainda está presente no organismo em quantidades apreciáveis, o efeito predominante é de inibição competitiva, principalmente se as enzimas que fazem parte da biotransformação tiverem alta afinidade pelo segundo solvente. O efeito inibitório na biotransformação diminui em paralelo com o desaparecimento de álcool do organismo e assim é substituído pelo efeito estimulante^{39,46,53,62}.

Algumas interações toxicocinéticas entre solventes e etanol são mostradas na Tabela 4.

TABELA 4. Interações toxicocinéticas após exposições simultâneas ao etanol e a um solvente orgânico (em humanos).

solvente adicional (níveis de exposição)	efeitos	referências
Tolueno (75-100ppm)	Níveis aumentados de tolueno no sangue e no ar exalado. Diminuição da absorção respiratória e da depuração metabólica do tolueno. Atraso e diminuição na excreção urinária do ácido hipúrico e o-cresol.	Waldron <i>et al.</i> , 1983; Døssing <i>et al.</i> , 1984; Wallén <i>et al.</i> , 1984
Tolueno (exposição ocupacional)	A ingestão de etanol induz a conversão de tolueno a ácido hipúrico.	Inoue <i>et al.</i> , 1993a ; 1993b; Huang <i>et al.</i> , 1994
Xileno (exposição ocupacional)	O etanol ingerido induz a conversão dos isômeros de xileno a ácido hipúrico.	Inoue <i>et al.</i> , 1993a ; 1993b; Huang <i>et al.</i> , 1994
<i>m</i> -Xileno (140 e 280 ppm)	Diminuição do xileno e pequena diminuição de acetaldeído no sangue. Decréscimo na excreção de ácido <i>m</i> -metil hipúrico mas não de 2,4-xilenol em urina.	Riihimäki <i>et al.</i> , 1982a ; 1982b

Fonte: LOF A. & JOHANSON G., (1998)⁶² - modificado

FOO *et al.* (1991)³³ mostraram, em estudo realizado com coelhos, com altas doses de tolueno e etanol, que a biotransformação de ambos é inibida. O efeito inibitório do solvente na biotransformação do álcool etílico é desprezível, com exceção dos estudos que usam altas doses de ambos os solventes.

Num estudo feito com voluntários, foi dada uma dose moderada de álcool (0.8 g/Kg) 4h antes da exposição a 100 ppm de xileno. Foi observado aumento nos níveis do xileno no sangue e diminuição de 50% nos níveis do ácido metil hipúrico urinário. O álcool pode inibir o metabolismo do xileno causando permanência dos níveis elevados deste solvente no sangue⁵⁶.

Quantidades moderadas de etanol produzem efeito inibitório marcante na biotransformação de tolueno e *m*-xileno^{38,44,46,49}.

O álcool é biotransformado por três vias no organismo humano. A principal via de biotransformação envolve a enzima álcool desidrogenase presente no fígado. No caso dos roedores a via mais importante é a catalase. As diferenças entre as espécies dificultam a extrapolação de dados entre roedores e humanos com respeito aos efeitos inibitórios e estimulantes possivelmente causados por exposição combinada a etanol e solventes orgânicos^{53,91}. Quando a administração de etanol em ratos é feita por um período prolongado (algumas semanas) o efeito é de indução do metabolismo do tolueno e do xileno. O efeito de inibição do metabolismo destes solventes é verificado na administração de dose única e em quantidades moderadas de etanol⁹¹.

Hábito de fumar

Uma das maiores dificuldades para separar os efeitos provocados na toxicocinética de solventes pelo hábito de fumar e pelo consumo de bebidas alcóolicas é que a maioria dos voluntários participantes destes estudos que fumam e fazem uso concomitante do álcool^{38,44,45,46,93}.

Estudos que avaliaram a influência do tabaco e álcool juntos apresentaram resultados diferentes. Alguns deles sugerem que a supressão metabólica é provocada pelo hábito de fumar e outros suspeitam que a interferência deva-se ao hábito de consumir bebidas alcóolicas^{38,44,45,93}. Diversos autores demonstram que quando os dois hábitos estão presentes em combinação os efeitos de supressão são muito mais evidentes^{39,44,93}.

ALVAREZ-LEITE *et al.* (1999)⁵ avaliaram voluntários não-expostos ocupacionalmente ao tolueno quanto à interferência da bebida e do fumo na

excreção do ácido hipúrico (composto presente normalmente na urina de não-expostos). Os autores concluíram que os dois hábitos, determinados juntos ou separados, não alteram os valores de referência do ácido hipúrico.

O uso do cigarro constitui um fator de interferência na eliminação de um dos produtos de biotransformação do tolueno, o *o*-cresol, que é excretado na urina em maior quantidade em indivíduos fumantes⁵³.

Medicamentos

O principal efeito de interação entre fármacos e solventes é provavelmente a interação metabólica quando estes são biotransformados pelas mesmas enzimas⁶².

LOF & JOHANSON (1998)⁶², mostraram que a administração de paracetamol aumenta a concentração de tolueno no sangue de voluntários expostos a vapores deste solvente, enquanto que o ácido acetilsalicílico, quando administrado nestas condições de exposição, somente tende a aumentar as concentrações sangüíneas de tolueno.

CAMPBELL *et al.* (1988)¹⁹, demonstraram que o ácido acetilsalicílico diminui a biotransformação de *m*-xileno a ácido metil hipúrico. Os metabólitos urinários do *m*-xileno, bem como os do ácido acetilsalicílico, diminuíram cerca de 50% após exposição simultânea a ambos os agentes, devido à inibição da conjugação com a glicina.

A clorzoxazona é biotransformada pelo sistema enzimático CYP2E1, o mesmo do etanol e de outros solventes orgânicos. Após administração oral deste fármaco, juntamente com exposição a vapores de tolueno, foi observada tendência de elevação na concentração sangüínea deste solvente. Contudo, o tolueno promove um pequeno atraso na excreção

urinária de clorzoxazona. Em geral, somente raros efeitos têm sido observados na cinética dos solventes após ingestão de fármacos ⁶².

Outros fatores

A gravidez, as diferenças étnicas, a idade, a dieta em geral, algumas patologias como doenças no trato gastrointestinal, no sistema excretor e no fígado têm grande efeito no metabolismo orgânico ^{53,62}.

2.4 Efeitos tóxicos

No ambiente de trabalho a exposição dos indivíduos não ocorre usualmente a um único agente químico e, portanto, o potencial de interação possibilita o aparecimento de efeitos imprevisíveis ^{25,31,39,55,88,91}. É interessante observar que os rótulos encontrados em tintas para repintura e seus tíneres são um tanto incompletos pois não fornecem as quantidades dos solventes constituintes da mistura, citando apenas as suas classes químicas.

Alguns estudos estabelecem a relação da exposição a solventes orgânicos e seus possíveis efeitos na saúde do trabalhador. As alterações provocadas por estes solventes no organismo humano, como as do Sistema Nervoso Central (SNC), enfocando a exposição por inalação têm sido as mais citadas pelos autores ^{12,25,27,31,39,56,75,83,91}.

Na exposição aguda, os distúrbios no SNC são caracterizados por euforia, desorientação e vertigem; com a elevação da dose e/ou do tempo de exposição segue-se inconsciência, paralisia, convulsão e parada cardio-respiratória ^{12,31,39,88}. Outro efeito comum aos solventes, associado a altas

concentrações de exposição, é a irritação das mucosas e das vias aéreas^{27,39,56}. A atividade depressora do sistema nervoso central é variável entre os solventes. Em indivíduos com sintomas agudos de intoxicação pelos solventes orgânicos, dificilmente os efeitos permanecem ao serem afastados da exposição^{39,56,83}.

Sugere-se que a narcose produzida por solventes deva-se a uma interação dos mesmos com as células nervosas, pois eles têm estruturas químicas diversificadas e o efeito é muito similar e rapidamente instalado^{39,88}.

Nas exposições crônicas, os efeitos manifestados sobre o SNC são fadiga, distúrbios do sono, disfunção na visão das cores, irritabilidade, dificuldade de concentração, problemas de memória recente, disfunções psicomotoras e cefaléias. Estas manifestações têm sido designadas como “encefalopatia tóxica crônica”, “polineuropatia tóxica” e “síndrome dos pintores”^{2,31,39,91}.

Alguns sintomas subjetivos fazem parte dos testes neurocomportamentais aplicados em trabalhadores expostos a solventes orgânicos no ambiente de trabalho. A avaliação neurocomportamental e neuropsicológica de indivíduos tem sido estudada e mostra resultados que apontam tendência de pior desempenho dos trabalhadores expostos ocupacionalmente a solventes orgânicos em relação aos indivíduos não-expostos^{12,25,27,31,55,56,75,83,91,92}.

BAKER (1994)¹² relatou 16 estudos envolvendo mais de 1000 trabalhadores expostos ocupacionalmente a solventes orgânicos; os ambientes de trabalho estudados foram majoritariamente indústrias gráficas e de tintas e funilarias. Foram aplicados testes para avaliação da exposição crônica e os resultados revelaram razoável concordância entre os estudos,

demonstrando decréscimo da função psicomotora e diminuição da memória recente.

UKAI *et al.* (1994)⁹² pesquisaram sintomas manifestados durante o trabalho: irritação ocular e nasal, cheiro e gosto estranhos, dor de garganta, sensação de flutuação e de embriaguez, e também fora do horário e do ambiente de trabalho: tontura, vertigem, confusão mental, tontura ao levantar-se rapidamente, melancolia, dormência nas extremidades, perda de peso, redução na sensação olfativa e pele áspera. Os autores compararam os sintomas relatados pelo grupo exposto e pelo grupo não-exposto, sendo as queixas de todos os sintomas tanto durante o trabalho quanto fora dele, mais prevalentes nos expostos.

Efeitos agudos do tolueno e do xileno

Os sintomas que caracterizam as exposições aos solventes orgânicos nos centros nervosos são, de maneira geral, inespecíficos. A bainha de mielina é constituída principalmente de lipídeos que absorvem substâncias altamente lipofílicas produzindo danos reversíveis e/ou irreversíveis no sistema nervoso.

Os efeitos tóxicos relacionados ao tolueno e ao xileno são muito semelhantes em estudos envolvendo a exposição múltipla e/ou isolada. O tolueno e xileno líquidos são potentes irritantes das mucosas e causam dermatite por contato na pele íntegra³⁹. Altas concentrações de seus vapores no ambiente causam irritação nos olhos e nas vias aéreas superiores^{25,27,39,56}.

De acordo com a quantidade absorvida e os diferentes níveis de concentração do tolueno têm-se os principais efeitos agudos: cefaléia, tontura, fadiga, fraqueza muscular, incoordenação, midríase, tremores, náusea, ataxia, prostração, confusão mental, vertigem, alucinações, convulsões e coma. Nas intoxicações mais severas permanecem por alguns dias, após cessada a exposição, fadiga muscular, irritação e insônia mas os sintomas são transitórios e reversíveis^{27,37,39,85}.

O tolueno apresenta efeito bifásico no SNC: em baixa concentração produz efeitos excitatórios (euforia e excitação) e em alta concentração leva à depressão, ataxia e coma^{39,85}.

O xileno de grau técnico em exposição aguda promove sensações como cefaléia, fadiga, sonolência, irritabilidade, tontura, vertigem, dispepsia, náusea, anorexia^{39,83}. Em concentrações muito elevadas (1000-3000 ppm) provoca convulsões, narcose, hemorragia alveolar e morte³⁹. O efeito anestésico aparece em concentrações acima de 5000 ppm^{83,94}.

Os efeitos derivados do uso abusivo de solventes (*cheiradores de cola*) em exposições a altos níveis e por tempo prolongado são a ataxia e a encefalopatia. Os sinais cerebelares e os efeitos no sistema nervoso periférico são apontados em relação aos solventes orgânicos em geral e não a um solvente específico^{37,39}.

Efeitos crônicos do tolueno e do xileno

As alterações neurocomportamentais ou neuropsicológicas, crônicas ou agudas, têm sido relatadas em exposições à mistura de solventes, mais do que com a substância isolada^{27,55,83,91}.

O tolueno pode produzir danos neurológicos reversíveis ou irreversíveis, incluindo degeneração cerebelar e cortical, além de perda auditiva, neuropatia periférica e atrofia ótica com evidência de disfunção do hipotálamo. Em exposições crônicas, o mecanismo proposto para a ação neurotóxica é a atrofia cerebelar irreversível, o que explicaria os efeitos sobre a atividade motora nos indivíduos intoxicados^{27,85}.

Os trabalhadores expostos ao tolueno têm desempenho deficiente em testes das habilidades cognitivas e visuais, relacionadas à atrofia ocular bilateral, com redução da percepção de cores e do campo visual, perda de memória recente, oscilação de humor, dificuldade de concentração, atrofia cerebelar e cortical, distúrbios do sono, alterações no tempo de reação, desordem de personalidade e deficiência no aprendizado e na obtenção de novas informações^{27,37, 39,85,91}.

RIIHIMAKI & SAVOLAINEN (1979)⁸³ em estudo com pintores de automóveis, operários da fabricação de tintas e da produção de xilenos, sugerem que possa haver efeitos adversos crônicos ao nível do sistema nervoso central: o uso prolongado de xilenos causa depressão do SNC, redução da vigilância e o do equilíbrio corpóreo e provoca distúrbios de memória recente. Exposição experimental a 304 mg/m³ da mistura de xilenos não provocou alterações do desempenho em testes de memória recente e tempo de reação; e em concentração de 434 mg/m³ ocorreram alterações na coordenação manual, no tempo de reação e ligeira ataxia³⁹.

BAKER (1994)¹² selecionou artigos sobre os possíveis efeitos da exposição aos solventes orgânicos no sistema reprodutivo, incluindo o tolueno e os xilenos. Pareceu existir associação entre exposição materna a solventes e aumento do risco de aborto espontâneo. Nos casos em que foi avaliado o efeito na prole após exposição paterna e materna, as conclusões foram dificultadas devido à falta de outras pesquisas para se fazer

comparação. Quanto à genotoxicidade do tolueno e do xileno não existem ainda estudos conclusivos.

A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) classifica os solventes tolueno e xileno como pertencentes ao grupo 3, *agentes sob suspeita de serem carcinogênicos do ser humano; porém, os dados existentes são insuficientes para se chegar à esta conclusão* ³⁹. A literatura não apresenta evidências consistentes de efeito carcinogênico do tolueno e dos xilenos, para o homem e animais.

A maioria das investigações mostram aumento no risco de glomerulonefrites em exposições prolongadas ao tolueno e aos xilenos. Outros tipos de danos renais podem ser associados à exposição excessiva a solventes, demonstrados pelo aumento de proteína e sedimentos na urina ^{12,39}.

Trabalhadores expostos ao tolueno e ao xileno apresentam pequena evidência de dano hepático, avaliado pelas atividades das enzimas transaminases (AST e ALT) e as S-glutamil transferase (γ -GT) ²⁵. As concentrações dos ácidos biliares, que muitas vezes mostram-se aumentadas, levam a crer que este parâmetro poderá ser um marcador mais precoce de disfunção hepática ^{34,35,55,61,92}.

As alterações hematológicas associadas às exposições no ambiente de trabalho são devidas ao benzeno, que até algum tempo atrás era contaminante do tolueno e dos xilenos comercializados no Brasil ^{27,39}.

2.5 Monitorização Biológica

A avaliação exata da exposição humana ao tolueno e xilenos é muito complicada pois usualmente o trabalhador se expõe à mistura de solventes. Uma maneira indireta é a monitorização ambiental, mas a que melhor expressa a exposição individual é a biomonitorização. Este procedimento permite a medida integral da exposição sem a variação ambiental, considerando também a absorção do solvente através da pele e os fatores individuais, sendo o trabalhador seu próprio monitor. Para escolher e interpretar os indicadores biológicos é necessário conhecer a toxicocinética e/ou toxicodinâmica das substâncias químicas^{40,67,68,76}.

2.5.1 Biomarcadores de dose interna da exposição ao tolueno

Para realizar a biomonitorização de trabalhadores expostos tem sido propostos indicadores biológicos que se correlacionem com as concentrações de tolueno no ambiente ocupacional, ou seja, com a concentração de exposição/absorção: ácido hipúrico na urina, ácido benzóico na urina, *orto*-cresol na urina, ácido hipúrico no soro, tolueno no sangue, tolueno no ar exalado, tolueno na urina^{3,4,9,17,30,33,40,52,57,65,76,79}.

Ácido hipúrico na urina

A maior utilização do ácido hipúrico como indicador biológico é em interações de exposição elevada ou moderada ao tolueno, avaliado para grupos de trabalhadores, sendo sua concentração urinária correlacionada à exposição média durante a jornada de trabalho^{3,9,29,30,38,57,65,76,92}.

O ácido hipúrico urinário é biomarcador da exposição ao tolueno muito utilizado apesar de todas as suas limitações, pois é um constituinte

normal da urina. Em indivíduos não-expostos ao tolueno sua concentração na amostra biológica varia de não detectado a 1,6 g/g de creatinina ^{3,9,29,30,32,33,56,76}. Entretanto, é de pouco valor em exposições ocupacionais leves e monitorizadas individualmente ^{3,9,29,30}.

KAWAI *et al.* (1992)⁵¹ encontraram níveis de ácido hipúrico na urina distinguíveis dos valores de referência em exposições ocupacionais acima de 30 ppm de tolueno por 8 horas. PIERCE *et al.* (1998)⁷⁹ notaram elevação significativa apenas em exposições ao tolueno que excederam 120 ppm por 8 horas. A ACGIH estabeleceu um valor de referência de até 1,6 g/g de creatinina para o ácido hipúrico urinário, devido às diferenças nos estudos relatados ^{6,7}.

O ácido hipúrico pode originar-se de dietas ricas em alimentos que contenham ácido benzóico e/ou seu precursores. Dentre eles destacam-se as frutas (ameixa e pêssago), grãos de café e especialmente bebidas e alimentos conservados com benzoatos (peixes e produto feitos com ovos) ^{3,9,30,53,57,76,79,84}. A ingestão de sucos concentrados de frutas, alguns tipos de pães e derivados, mostarda, refrigerantes e *ketchup*, medicamentos que contenham femprobamato, isocarboxazida, dietilpropiona, assim como outros fármacos (cocaína), aumentam a excreção do ácido hipúrico na urina ⁹.

LAUWERYS (1983)⁵⁷, DE ROSA *et al.* (1987)²⁹, FOO *et al.* (1991)³³, citaram diversos trabalhos realizados por diferentes autores e compararam os resultados com seus próprios estudos, sendo suas conclusões idênticas em relação à exposição ao tolueno e à excreção do ácido hipúrico. Em exposições, nas quais as concentrações de tolueno no ar foram em torno de 100 ppm, foi encontrada concentração média de ácido hipúrico urinário por volta de 2,5 g/g de creatinina, em amostras coletadas no final da jornada de trabalho. As correlações existentes entre os níveis de tolueno no ambiente

de trabalho e as concentrações do ácido hipúrico na urina foram todas estatisticamente significativas, podendo este indicador ser usado na biomonitorização ao tolueno. Os autores reconheceram que as flutuações das concentrações de tolueno no ar foram possíveis causas da larga variação dos valores individuais de ácido hipúrico excretados⁵⁷, além da alimentação, absorção pela pele, ingestão de álcool e outras^{29,33,57}. Nestes mesmos estudos, os indivíduos não-expostos ocupacionalmente, apresentaram concentração de ácido hipúrico urinário raramente excedendo o valor de 1,5 g/g de creatinina^{29,33,57,76}.

Exposições ocupacionais a 200 ppm de tolueno resultam em concentrações de ácido hipúrico em torno de 5 g/g de creatinina, em amostras de urina coletadas no final da jornada de trabalho. PAGNOTTO & LIEBERMAN (1967)⁷⁶ verificaram ser o ácido hipúrico urinário indicador adequado para avaliar a exposição ao tolueno, quando a concentração ambiental apresenta flutuações entre 20 e 200 ppm.

No Brasil, a Norma Regulamentadora (NR-7) – Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (107.000-2) do Ministério do Trabalho, Quadro I estabeleceu um valor de referência (VR) de até 1,5 g AH/g de creatinina e como índice biológico máximo permitido (IBMP) 2,5 g AH/g de creatinina em amostras coletadas no final da jornada de trabalho¹⁵.

Ácido benzóico na urina

LAUWERYS (1983)⁵⁷ considera que teoricamente seria preferível a determinação da concentração de ácido benzóico total na urina como biomarcador de exposição ao tolueno. Este metabólito pode ser conjugado com a glicina e também com o ácido glicurônico, o que seria uma vantagem em relação ao ácido hipúrico, proveniente da conjugação somente com a

glicina. Porém são poucos os trabalhos que estudam este indicador, talvez por não ter apresentado diferença quando comparado ao ácido hipúrico na urina.

Orto-cresol na urina

Somente pequena porção (1%) do tolueno inalado na forma de vapor é oxidada no anel aromático com a produção de cresóis, predominando o *orto* e *para*-cresol^{8,29}. O isômero *para* é excretado normalmente na urina de pessoas não-expostas ao tolueno, originado da degradação da tirosina, e a excreção do *meta*-cresol é muito limitada sob baixa e média exposição ao solvente^{8,79}. O *orto*-cresol não é um constituinte normal da urina, o que levou alguns autores a estudá-lo como indicador biológico na exposição ao tolueno^{8,29,33,57,65,79}. Entretanto, existem relatos que o *orto*-cresol está presente em urina de pessoas não-expostas ao tolueno numa concentração menor do que 0,2 mg/g de creatinina, e é influenciada pelo hábito de fumar^{9,29,79}. Em indivíduos não-fumantes sua excreção urinária fica em torno de 0,06 mg/g de creatinina^{9,29,79}.

Uma concentração de tolueno no ar igual a 100 ppm deverá corresponder a concentração de *orto*-cresol na urina de 1,0 mg/L⁵⁷.

A quantidade de o-cresol excretado em urinas coletadas no final da jornada de trabalho se correlaciona significativamente com as concentrações de tolueno no ar^{9,29}. Entretanto, esta correlação parece ser menor de que a encontrada entre AH urinário e tolueno no ar^{29,79}.

As maiores diferenças encontradas na determinação do o-cresol urinário estão relacionadas ao hábito de fumar (que aumenta até 3 vezes o seu valor na urina)^{8,29,33,53,65,79}. Na ACGIH de 1999, o o-cresol urinário foi

incluído como bioindicador de dose interna utilizado para avaliar a exposição ocupacional ao tolueno ⁷.

Ácido hipúrico no soro

LAUWERYS (1983)⁵⁷ relatou haver boa correlação entre o ácido hipúrico no soro, na urina e a intensidade de exposição ocupacional ao tolueno. No entanto, o coeficiente de correlação entre a concentração do ácido hipúrico no soro e na urina mostrou-se muito baixo ($r=0,37$).

Tolueno no sangue

Apesar de ser um indicador adequado para biomonitorização, porque expressa a intensidade da exposição e representa uma estimativa mais próxima da carga corpórea, a concentração de tolueno no sangue pode variar dentro de segundos, devido à sua rápida saída da corrente circulatória, implicando uma desvantagem deste parâmetro. Para obter um valor o mais próximo da realidade é necessária uma rigorosa padronização da coleta de amostra ou determinações consecutivas durante algum tempo ^{9,17,32,67}.

A coleta de amostras durante a jornada de trabalho reflete apenas a exposição recente e não a exposição média ocorrida ao longo do dia ⁶⁷. A análise do sangue coletado após o final da jornada é limitada pela rápida distribuição do solvente para os tecidos, mas tem boa correlação com as concentrações ambientais medidas durante a jornada de trabalho ^{32,67,79}.

O tempo de meia-vida do tolueno no tecido adiposo é de aproximadamente 1,5 dias e portanto pode haver liberação de tolueno no sangue por um certo tempo, mesmo após cessada a exposição ⁶⁷.

Alguns biomarcadores para exposição ao tolueno foram avaliados em sangue e urina e os autores notaram que tolueno no sangue é o marcador mais sensível e específico para detecção de exposição em baixas concentrações. Entretanto encontraram dificuldades no momento da coleta da amostra por ser um processo invasivo ^{7,32,33,52,79}.

ANGERER & KRAMER (1997) ⁹ descreveram que em exposição a 65 ppm de tolueno no ar há correlação significativa ($r=0,8$) com a concentração média de tolueno no sangue, expressa pelo valor de 0,91 mg/L. Esta concentração sangüínea de tolueno é muito próxima das concentrações encontradas por FOO *et al.* (1988)³², 0,74 mg/L, e BRUGNONE *et al.* (1986)¹⁷, 0,69 mg/L, em condições de exposição similares.

Para exposição média de trabalhadores a 100 ppm de tolueno por 8h FOO *et al.* (1988)³² detectaram concentrações deste composto no sangue entre 1,0 e 1,9 mg/L. A ACGIH propõe a coleta da amostra ao final da exposição, adotando como limite biológico de exposição o valor de 0,05 mg/L ^{6,7}.

WANG *et al.* (1993)⁹⁵ confirmaram que as concentrações de tolueno no sangue de indivíduos fumantes são altas em relação aos não-fumantes, e que esta concentração pode ser afetada pelo tempo decorrido entre o último cigarro fumado e o tempo da coleta da amostra, principalmente quando a exposição ocupacional é baixa.

Tolueno no ar exalado

A concentração de tolueno no ar expirado representa cerca de 15 a 20% da concentração ambiental do solvente. Esse parâmetro já foi proposto pela ACGIH como bioindicador de exposição (hoje está suspenso para reavaliação e a tendência é de não se usar mais), e adotava como BEI o

valor de 20 ppm, sugerindo a coleta da amostra durante a jornada de trabalho. Estudos continuam sendo feitos objetivando estabelecer o melhor horário para a coleta do ar exalado^{9,33,79}.

MONSTER *et al.* (1993)⁶⁵ relataram boa correlação entre as concentrações de tolueno no ar exalado e as quantidades de tolueno no ambiente de trabalho ($r=0,99$)^{17,65,79}. O tolueno no ar exalado em amostra coletada imediatamente após cessada a exposição (dentro de 5 minutos) reflete exposição recente. Porém, as variações que pode apresentar este tipo de amostragem têm sido muito discutidas: podem ser ocasionadas por contaminação ambiental, ingestão de bebida alcoólica e atividade que o trabalhador exerce no trabalho^{9,65,79}.

PIERCE *et al.* (1998)⁷⁹ para estimar a concentração de tolueno no ar exalado que expressasse exposição ambiental 50 ppm por 8h, usaram um modelo farmacocinético a fim de minorar as interferências que afetam a toxicocinética. Foram estabelecidos valores de 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^3$ para tolueno no ar exalado, se coletado 5 minutos após a jornada, e 150 $\mu\text{mol}/\text{L}$, para amostras pós-exposição.

Tolueno na urina

Cerca de 0,06% do tolueno pode ser excretado inalterado na urina e parece haver uma tendência em utilizar o tolueno urinário como bioindicador em trabalhadores expostos a este solvente^{47,52}. KAWAI *et al.* (1996)⁵² realizaram um estudo comparativo entre o tolueno no ar do ambiente de trabalho, ácido hipúrico e *orto*-cresol urinários e tolueno inalterado na urina. O objetivo dos autores foi verificar a possibilidade do uso do próprio solvente na urina como bioindicador de exposição. Devido à pequena porcentagem excretada, os mesmos encontraram algumas dificuldades analíticas para detecção e informaram que é essencial a seleção de

condições apropriadas para coleta destas amostras. O coeficiente de correlação entre tolueno inalterado na urina (coletada após a jornada) com tolueno no ar foi 0,8 e os outros dois indicadores AH e o-cresol apresentaram correlação significativa com as concentrações de tolueno no ar e na urina⁵².

O hábito de fumar e de consumir bebidas alcoólicas poderá afetar as concentrações do tolueno eliminado na urina após exposição. A quantidade da substância excretada inalterada na urina é pequena, sendo necessários mais estudos, principalmente com relação ao tempo de excreção e coleta da amostra, para tornar este parâmetro um indicador biológico rotineiro^{36,47,52}.

2.5.2 Biomarcadores de dose interna da exposição aos xilenos

Para a biomonitorização da exposição ocupacional ao xileno o indicador usado é o seu principal metabólito, o ácido metil hipúrico em urina; há ainda a possibilidade de avaliar o xileno inalterado no sangue e no ar exalado com esta finalidade.

Ácido metil hipúrico na urina

O ácido metil hipúrico não é um produto de biotransformação presente normalmente em urina de não-expostos^{3,45,57,63}, o que representa uma vantagem quando utilizado para avaliação individual da exposição aos xilenos^{45,57,63}. Cerca de 75% do xileno de grau técnico é formado por seu meta isômero, levando ao predomínio da concentração do ácido *meta*-metil hipúrico na urina que se correlaciona bem com o nível de xileno no ar e com a quantidade total de xileno absorvida^{3,38,45,50,57,63}. A maioria dos trabalhos selecionados na literatura utilizam o isômero *meta* como o bioindicador da exposição aos vapores de xileno.

Existe uma correlação estatisticamente significativa ($r=0,8$), relatada em vários trabalhos, entre as concentrações de xileno no ar e a quantidade de AMH excretado na urina. Para o AMH recomenda-se coletar as amostras de urina no segundo período da jornada de trabalho, ou seja, nas 4 últimas horas, posto ser a excreção deste metabólito muito rápida. A avaliação de diversos grupos de indivíduos expostos aos vapores de tolueno em concentrações em torno de 100 ppm, apresentou concentrações de AMH variando de 1,5 a 2,0 g/g de creatinina, quando as urinas foram coletadas na segunda parte da jornada de trabalho^{3,38,45,50,57,63}.

LUNDBERG & SOLLENBERG (1986)⁶³ estabeleceram um coeficiente de correlação de 0,99 entre AMH na urina do final da jornada de trabalho e xileno no ar. Este biomarcador foi extensivamente estudado e até os dias de hoje tem sido utilizado para estimar a exposição ao xileno no ambiente de trabalho^{45,57}.

INOUE *et al.* (1993)⁴⁵ reportaram um estudo realizado com voluntários expostos ocupacionalmente a baixos níveis de xilenos no ar, em torno de 15 ppm, e encontraram uma correlação significativa ($r=0,87$) entre os níveis ambientais e as concentrações de ácido *m*-metil hipúrico excretada na urina, coletada no final da jornada de trabalho. Os resultados descritos mostraram que a medida do ácido *m*-metil hipúrico (*m*-AMH) representa a exposição relativa aos isômeros do xileno, pois este se encontra em maior quantidade na urina.

É importante lembrar a interferência da ingestão de álcool na excreção urinária do AMH. Alguns estudos sugerem que o etanol reduz à metade a depuração do xileno inalado^{45,57,69}.

No Brasil, a Norma Regulamentadora nº 7 (NR-7) - PCMSO – Quadro I, do Ministério do Trabalho, estabeleceu que o ácido metil hipúrico urinário é o indicador para avaliar exposição ocupacional ao xileno. A coleta da

amostra deve ser feita durante as últimas 4 horas da jornada de trabalho, em frasco de polietileno ou vidro âmbar. O índice biológico máximo permitido (IBMP) é de 1,5 g/g de creatinina ¹⁵.

Xileno no sangue

As concentrações de xileno no sangue, coletado durante a exposição, refletem exposição recente ⁵⁷.

O xileno no sangue pode ser biomarcador adequado quando os níveis de exposição ambiental estão em torno de 100 ppm que resulta em concentração média do xileno no sangue venoso foi torno de 0,5 mg/100 mL ⁵⁷.

RIIHIMAKI *et al.* (1979)⁸¹, ao estudarem voluntários expostos a 90 ppm de vapores de xileno, mostraram que as concentrações deste solvente em amostras de sangue coletadas no final da exposição variaram com a carga de trabalho. No estado de repouso, a média da concentração sangüínea foi de 0,13 mg/100mL e no trabalho leve (50 W) foi de 0,21 mg/L. As concentrações foram determinadas novamente 18h após o término da exposição e apresentaram-se muito inferiores aos valores obtidos acima. Estes autores também encontraram aumento na concentração do xileno no sangue quando foi administrado etanol antes da exposição.

Xileno no ar exalado

A amostragem de ar exalado feita durante o período de trabalho pode ser usada para estimar a exposição no momento da coleta ⁵⁷.

2.6 Aspectos analíticos

As exposições ao tolueno e xileno são estimadas pela determinação quantitativa dos seus produtos de biotransformação, ácido hipúrico e ácido metil hipúrico. O principal isômero conjugado com a glicina e excretado em maior proporção na urina é o ácido *m*-metil hipúrico. Os dois metabólitos (AH e *m*-AMH) podem ser analisados em única amostragem e mesma técnica analítica. O que torna-se vantagem pois o tolueno e o xileno são usados quase sempre como mistura.

O tempo de coleta das amostras requer cuidado na sua escolha e devem ser levados em consideração o comportamento cinético do agente químico e seus produtos de biotransformação. O final da jornada de trabalho é indicado como o horário adequado de coleta da amostra para substâncias que são eliminadas rapidamente^{3,6,7,15,30}.

Alguns autores analisaram os ácidos hipúrico e *m*-metil hipúrico em urina de trabalhadores expostos ao tolueno e xileno em diferentes períodos do dia. Os resultados mostraram que as concentrações destes metabólitos foram muito maiores em amostras de urina coletadas durante o segundo período da jornada, ou seja, no final da exposição comparadas com amostras coletadas no primeiro período do dia ou horas após o final da exposição^{40,69,70,76}.

A coleta da urina deve ser feita ao final da jornada de trabalho, em recipiente de polietileno ou vidro âmbar^{3,9,29,30,65}. Os tempos recomendados entre coleta e envio da amostra ao laboratório foram 2 dias se o

armazenamento foi a 4°C e 6 dias se mantida a -20°C ³. Como a maior parte do produto de biotransformação é excretado nas 4 horas seguintes ao final da jornada de trabalho, recomenda-se, quando possível, a coleta da urina durante este período pós-exposição ^{29,76,84}.

DE ROSA *et al.* (1987)²⁹ investigaram o momento mais adequado para a coleta de urina. As melhores correlações encontradas entre as concentrações de 100 ppm de tolueno no ar e a excreção do AH foram 0,8 e 0,9, para amostras coletadas no segundo período da jornada e as coletadas 4 horas após cessada a exposição, respectivamente.

Os primeiros métodos para separação e análise de ácido hipúrico envolviam a cristalização da urina e extração com éter. As determinações eram feitas por gravimetria, volumetria ou análises de Kjeldahal, portanto os resultados não eram quantitativos. Os procedimentos posteriores aos acima citados eram colorimétricos, fluorométricos, espectrofotometria de ultravioleta e cromatografia em papel ^{18,68,69,70,76}.

Muitos dos métodos analíticos descritos na literatura para determinação simultânea dos ácidos hipúrico e *m*-metil hipúrico em urina utilizam as técnicas cromatográficas em fase gasosa, acoplada ao detector de ionização de chama (CG-DIC) ^{4,18,20,21,54,84}, e em fase líquida de alta eficiência (CLAE) ^{48,64,71}. Esta última passou a ser a de escolha nos últimos tempos por não requerer processo de derivação dos analitos, etapa que muitas vezes torna a análise demorada.

CARVALHO *et al.* (1991)²¹ compararam as técnicas cromatográficas, em fase gasosa e líquida de alta eficiência, para determinação simultânea dos ácidos hipúrico e *m*-metil hipúrico na urina. Encontraram menos interferentes endógenos no método de cromatografia em fase gasosa, devido ao uso de um procedimento de derivação.

Para extração do ácido hipúrico e ácido *m*-metil hipúrico, a urina deve ser acidificada e o pH utilizado é 2,0^{4,18,20,21,40,54,68,69,76,84}. O solvente extrator que apresenta melhor eficiência e seletividade é o acetato de etila^{4,18,20,21,54,76,84} testado concomitantemente ao éter de petróleo, éter etílico e éter etílico/etanol (9:1)^{18,76}.

O volume de acetato de etila varia entre 3-5 mL. Em função da quantidade de AH e *m*-AMH excretados na urina, diversos autores descrevem em seus estudos analíticos a utilização de pequenos volumes de urina, de 0,5 a 2,0 mL^{4,18,20,21,40,54,68,69,84}.

Os métodos cromatográficos em fase gasosa requerem um procedimento de derivação, sendo a metilação com formação dos metil ésteres a mais comumente utilizada. A Tabela 5 apresenta alguns agentes de derivação recomendados.

TABELA 5. Reagentes usados na derivação dos AH e *m*-AMH.

reagente	referências
diazometano	Buchet & Lauwerys ¹⁸ ; Kira ⁵⁴
3-metil-1- <i>p</i> -toliltriazeno	Caperos & Fernandez ²⁰
trimetilsilil	Roosmalen & Drummond ⁸⁴
metanol + HCl	Carvalho <i>et al.</i> ²¹
hidróxido de trimetilfenilamônio	Alvarez-Leite <i>et al.</i> ⁴

Na técnica cromatográfica em fase gasosa, a escolha da coluna é de fundamental importância. Faz-se necessário que esta permita boa separação entre ácido hipúrico, ácido *m*-metil hipúrico e padrão interno, possibilitando análise rápida e precisa. Foram encontradas na literatura algumas colunas empacotadas recomendadas para esta determinação^{4,18,20,21,54,84}.

- SE 30 3% Chromosorb WAW - Buchet & Lauwerys; Kira^{18,54}
- Chromosorb AW - Caperos & Fernandez²⁰
- OV 1 3% Chrom Q - Roosmalen e Drummond⁸⁴
- SE 30 5% Chromosorb W - Carvalho *et al.*²¹
- SE 30 3% Chromosorb WHP - Alvarez-Leite *et al.*⁴

É necessário o uso de padrão interno (PI) para determinação quantitativa dos analitos por CG/DIC, e o citado na maioria dos estudos foi o ácido heptadecanóico^{4,18,20,21,54}.

3 OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO

Devido à importância de se realizar a biomonitorização da exposição concomitante a solventes, este trabalho tem por objetivos:

- Validar um método para análise simultânea de ácido hipúrico (AH) e metil hipúrico (AMH) urinários, por cromatografia gasosa/ionização de chama, bioindicadores de dose interna da exposição ao tolueno e ao xileno respectivamente.
- Aplicar o método em análise de amostras biológicas coletadas de trabalhadores que manipulam produtos contendo estes solventes, assim como em amostras de um grupo não-exposto ocupacionalmente aos mesmos.

O plano de trabalho constou das seguintes etapas:

- revisão da literatura sobre tolueno e xileno, especialmente quanto às suas toxicocinéticas e fatores que nela interferem;
- validação de um método cromatográfico em fase gasosa para análise simultânea de AH e AMH pelo estudo de: linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão, recuperação, interferência de matriz e estabilidade;
- seleção de trabalhadores não-expostos e expostos ocupacionalmente aos solventes de interesse;
- determinação dos ácidos hipúrico e metil hipúrico em trabalhadores expostos e não-expostos, segundo o método validado;

- estudo de possíveis interferências como o hábito de fumar, ingerir bebidas alcoólicas e o uso de equipamento de proteção individual, nos níveis de AH e AMH.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 População estudada e ambiente de trabalho

As amostras de urina destinadas à determinação dos ácidos hipúrico e metil hipúrico foram obtidas de trabalhadores expostos a tintas e tineres em quatro concessionárias autorizadas de veículos. Os grupos de trabalhadores foram escolhidos de acordo com as atividades dentro da empresa.

Grupo 1 – Exposto no setor de funilaria e pintura: os trabalhadores da funilaria e pintura se expõem aos solventes em diferentes etapas. O trabalho inicia-se na inspeção da área a ser pintada, correção dos defeitos e aplicação da tinta de fundo, denominada “primer”. Esta preparação da superfície a ser repintada utiliza produtos contendo solventes. Algumas peças recuperadas pelo funileiro necessitam da remoção completa da pintura antiga, utilizando o removedor (tíner). Posteriormente é aplicada uma tinta de fundo para proteção anticorrosiva e adesão do acabamento.

A aplicação da tinta consiste na atividade onde há maior exposição aos solventes. A preparação da tinta é feita pelo colorista, trabalhador designado e treinado para esta função, dentro da sala de coloração (4 X 2 m), sem ventilação. A aplicação da tinta é feita de duas maneiras: uma delas dentro de uma cabina fechada (8 x 8 X 3,5 m) com 3 ventiladores no teto e 3 aberturas no chão; a temperatura neste local é em torno de 38°C. A pintura na cabina é realizada quando tem-se que pintar grandes partes ou o carro todo. A outra maneira de aplicação da tinta é feita em peças menores e no ambiente da funilaria e o trabalhador que exerce esta atividade é chamado de pintor de linha. O pintor de dentro da cabina fica responsável pela lavagem de dois revólveres e os pintores de linha por um

revólver. É feita a preparação do revólver utilizado na repintura por lavagem com tiner por 3-5 vezes. O tempo em que o pintor está aplicando tinta é muito variado e depende da demanda e tamanho das peças. Na oficina de funilaria e pintura tem também a parte de tapeçaria e polimento que envolve o uso de solventes diversos, além de ficar no mesmo local da pintura e de remoção da tinta. Das quatro concessionárias visitadas, duas ofereciam melhores condições de trabalho nos setores de funilaria e pintura, como por exemplo, o fornecimento de equipamento de proteção individual.

Foram avaliados 69 trabalhadores. As coletas foram realizadas no final da jornada de trabalho, sempre às sextas-feiras na parte da tarde, após o almoço. A urina proveniente de única micção foi coleta diretamente em frasco de polietileno. Após a coleta, as amostras foram mantidas e transportadas no mesmo dia, em caixa de isopor contendo gelo, até o laboratório. Foram medidas a densidade e a creatinina de todas as amostras antes de serem conservadas a -20°C até o momento das análises. Os trabalhadores responderam a um questionário sobre vários itens como: hábitos pessoais e alimentares, presença de patologias e ingestão de medicamentos, a ocorrência ou não de sintomas inerentes ao uso de solventes, além de assinarem um termo de consentimento de participação no trabalho (anexos I e II).

Grupo 2 – Controle: paralelamente, foram coletadas amostras de urina de trabalhadores da parte administrativa (escritório), das mesmas concessionárias, porém, sem histórico de exposição a solventes ($n = 31$).

A Tabela 6 mostra algumas características da população exposta a solventes.

TABELA 6. Características da população avaliada, exposta a solventes nos setores de fulinaria e pintura.

trabalhador exposto	idade	hábito de fumar	tempo de trabalho no setor (anos)	local de trabalho	ingestão de bebida alcoólica	uso de E.P.I.
1. A.A.V.	28	NF	10	P.L.	sim	sim
2. A.G.B.	44	NF	22	P.L.	não	não
3. A.O.S.	44	NF	25	P.L.	não	sim
4. A.S.	51	NF	22	P.L.	não	não
5. A.S.P.	30	F	18	P.L.	não	não
6. C.A.F.	36	NF	19	P.L.	sim	não
7. C.S.	23	NF	7	P.L.	sim	sim
8. D.T.P.	31	NF	8	P.L.	não	sim
9. E.A.S.	29	NF	4	P.L.	sim	sim
10. E.A.Z.N.	27	NF	13	P.L.	sim	sim
11. E.G.	36	NF	21	P.L.	sim	não
12. F.V.	30	F	4	P.L.	sim	não
13. G.C.T.S.	29	NF	10	P.L.	não	sim
14. J.A.A.	31	NF	10	P.L.	sim	não
15. J.B.A.	37	NF	15	P.L.	sim	sim
16. J.C.S.	33	NF	4	P.L.	sim	sim
17. J.C.S.B.	25	NF	1	P.L.	não	sim
18. J.G.O.	29	NF	9	P.L.	não	não
19. J.M.R.P.	35	NF	20	P.L.	não	sim
20. J.O.S.L.	33	NF	14	P.L.	não	não
21. J.R.S.F.	40	NF	15	P.L.	não	não
22. M.A.C.	42	NF	28	P.L.	não	não
23. M.C.	32	F	15	P.L.	sim	sim
24. P.J.F.	43	NF	25	P.L.	sim	não
25. P.R.F.R.	32	NF	1	P.L.	não	sim
26. P.S.M.	46	NF	23	P.L.	sim	não
27. R.S.S.	41	NF	26	P.L.	sim	sim
28. S.C.J.	44	NF	22	P.L.	não	sim
29. A.B.M.V.	36	NF	8	T.	sim	não
30. G.M.S.	22	NF	6	T.	sim	sim
31. J.F.S.	39	F	7	T.	sim	não
32. W.E.S.	24	NF	5	T.	sim	não
33. A.B.S.	47	F	15	F.	sim	não
34. A.F.S.	28	NF	4	F.	não	não
35. A.J.B.S.	24	NF	12	F.	não	sim

Continuação da TABELA 6

tabalhador exposto	idade	hábito de fumar	tempo de trabalho no setor (anos)	local de trabalho	ingestão de bebida alcoólica	uso de E.P.I.
36. A.S.M.	43	NF	15	F.	não	não
37. C.A.	32	NF	10	F.	não	sim
38. C.A.M.	44	F	10	F.	sim	sim
39. D.A.M.	32	NF	10	F.	não	sim
40. D.B.	32	NF	15	F.	não	não
41. E.M.	27	NF	3	F.	não	sim
42. G.A.A.	39	NF	25	F.	não	sim
43. I.A.	40	F	20	F.	não	não
44. I.F.S.	41	NF	20	F.	não	não
45. M.M	45	F	22	F.	sim	não
46. P.B.C.	34	F	2	F.	sim	não
47. R.A.S.	30	F	20	F.	sim	sim
48. R.H.N.	30	F	11	F.	sim	não
49. R.N.	32	NF	19	F.	não	sim
50. R.S.	37	NF	18	F.	não	não
51. S.G.S.	42	F	22	F.	sim	sim
52. V.M.S.	26	NF	5	F.	sim	não
53. V.P.S.	33	NF	13	F.	não	sim
54. V.S.	39	F	20	F.	sim	sim
55. A.E.	31	NF	5	P.M.	sim	sim
56. I.R.L.	22	NF	3	P.M.	não	sim
57. J.C.A.	21	F	2	P.M.	sim	não
58. J.R.R.	39	NF	7	P.M.	sim	não
59. M.P.S.	29	NF	5	P.M.	sim	sim
60. O.P.S.	40	NF	18	P.M.	não	não
61. R.B.J.	22	NF	4	P.M.	não	sim
62. R.N.T.	26	NF	3	P.M.	não	não
63. W.H.	30	F	8	P.M.	não	não
64. C.A.O.C.	28	NF	7	C.	não	não
65. J.O.	35	NF	4	C.	não	não
66. E.S.	29	NF	6	P.C.	não	não
67. L.P.O.	28	NF	19	P.C.	sim	sim
68. M.E.S.	33	NF	17	P.C.	não	sim
69. O.F.S.	27	NF	12	P.C.	não	sim

*P.L.: pintura de linha; T.: tapeçaria; F.: funilaria; P.M.: polimento; C.: coloração; P.C.: pintura na cabina.

4.2 Material

4.2.1 Soluções-padrão

- Solução de ácido hipúrico 100g/L (estoque) e a 5,0; 10 e 20 g/L (trabalho).
- Solução de ácido *m*-metil hipúrico 20g/L (estoque) e a 1,0; 5,0 e 10 g/L (trabalho).
- Solução de ácido heptadecanóico 20g/L (estoque) e a 2,0 g/L (trabalho).

As soluções estoque foram preparadas em metanol a cada 6 meses e conservadas a -20°C. As soluções de trabalho foram preparadas a cada 3 meses e conservadas a 4°C.

4.2.2 Reagentes e solventes

- padrão de ácido hipúrico (AH) 98% - Aldrich[®], lote n.º 09613DN;
- padrão de ácido *m*-metil hipúrico (*m*-AMH) 98% - Aldrich[®], lote n.º 08516AR;
- padrão de ácido heptadecanóico 99% - Aldrich[®], lote n.º 04431MQ;
- urina sintética TDX ABBOTT[®];
- metanol seco p.a (máximo de água 0,005%) - Seccosolv, Merck[®];
- acetato de etila, grau de pureza cromatográfica - Lichrosolv, Merck;
- ácido clorídrico 37% p.a, Merck[®], lote n.º 604084, solução a 6N;
- óxido de prata p.a, Synth[®], lote n.º 25709;
- cloreto de trimetilfenilamônio para síntese, Merck[®], lote n.º S21836711;
- kit para análise de creatinina da Labtest[®]

4.2.3 Aparelhos, vidraria e acessórios

- cromatógrafo a gás Hewlett-Packard®, modelo 6890, com injetor split/splitless e detector de ionização de chama, acoplado a computador modelo Vectra XM, série 4-5/150, com *ChemStation* para integração e processamento dos cromatogramas;
- coluna capilar HP-1 100% dimetilpolisiloxano Hewlett-Packard®, com 25m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 1,05 μm de espessura da fase;
- gases especiais para cromatografia em fase gasosa: nitrogênio, ar sintético e hidrogênio, Air Liquide®;
- microsseringa com capacidade para 10 μL , Hewlett-Packard®;
- balança analítica Sartorius® research - modelo R200 D;
- agitador de tubos Fanem®, modelo 251;
- agitador horizontal Ética®;
- bloco de aquecimento com seletor de temperatura para até 150°C Pierce® modelo 18780;
- pipetas automáticas Labsystems de 40 a 200 μL , 200 a 1000 μL e 1 a 5 mL, Finn timer®;
- urodensímetro, Uricon®;
- tubos de vidro para centrífuga com rolha esmerilhada, capacidade para 15mL;
- béqueres afunilados com rolha esmerilhada com capacidade para 5mL.

Toda a vidraria utilizada passou por descontaminação química com solução sulfocrômica, antes da lavagem habitual.

4.3 Método

4.3.1 Validação do procedimento analítico para a determinação simultânea dos ácidos hipúrico e metil hipúrico urinários

As amostras destinadas à padronização do método analítico foram preparadas a partir de *pool* de urina de voluntários, não-expostos a solventes e enriquecidas com soluções-padrão dos ácidos hipúrico e *m*-metil hipúrico em diferentes concentrações, para o preparo das curvas de calibração, estudo da linearidade, precisão, exatidão, recuperação, limites de detecção e de quantificação, interferência de matriz e estabilidade.

4.3.1.1 Otimização das condições cromatográficas

Foram feitos testes com diferentes programações de temperatura. O fluxo usado para o gás de arraste, hidrogênio, foi o recomendado pela HP® para as características da coluna. As injeções foram feitas no modo "split", tendo sido testadas várias razões de divisão. Após revisão da literatura e alguns testes com agentes de derivação optou-se pelo procedimento de metilação proposto por ALVAREZ-LEITE *et al.* ⁴.

As soluções de trabalho contendo os ácidos hipúrico, *m*-metil hipúrico e heptadecanóico foram utilizadas para verificar a separação destas substâncias na coluna HP-1®, quando adicionadas à urina e submetidas ao procedimento analítico descrito em 4.3.2.

4.3.1.2 Linearidade

Para definir o intervalo de concentração no qual a intensidade de resposta do detector é diretamente proporcional às concentrações de ácido hipúrico e ácido *m*-metil hipúrico, o estudo da linearidade foi feito através da adição das seguintes concentrações das soluções destes ácidos às amostras do *pool* de urina ($n = 6$): 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 g/L, juntamente com 300 μ L de solução 2,0 g/L do padrão interno, o ácido heptadecanóico. Estas amostras foram analisadas em sextuplicata e submetidas ao procedimento descrito em 4.3.2.

4.3.1.3 Curva de calibração

Para o preparo da curva de calibração foram adicionadas às amostras do *pool* de urina, soluções-padrão de ácido hipúrico e ácido *m*-metil hipúrico de modo a obter as seguintes concentrações: 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 g/L. Foram tomadas duas alíquotas de cada concentração e submetidas ao procedimento analítico descrito no item 4.3.2. Foi analisado também em duplicata, uma amostra de referência do *pool* de urina. A partir dos resultados obtidos foi feita a regressão linear, usando-se a equação da reta para o cálculo da concentração de AH e *m*-AMH nas amostras. Para o AH, presente normalmente na urina, foi subtraído o valor obtido na amostra de referência de todos os adicionados de padrão. Este processo foi repetido com cada lote de amostras.

4.3.1.4 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção foi considerado como a menor concentração determinada com confiabilidade. De outra forma, o LD foi avaliado para a concentração mínima que se diferenciou do zero, com determinada precisão, isto é, a mínima concentração adicionada à amostra que apresentou um coeficiente de variação menor que 20%^{23,24,58,87}. Foi utilizada para esta determinação branco de urina sintética e diluições sucessivas da amostra adicionada de 0,5g/L dos padrões e submetidas ao método descrito em 4.3.2. A concentração escolhida como LD se diferenciou do ruído fornecido pelo branco de urina sintética, em três vezes a sua área.

4.3.1.5 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação foi considerado como a menor concentração do analito que pode ser medida com uma precisão adequada, ou seja, com uma imprecisão avaliada pelo coeficiente de variação menor que 10%^{23,24,58,87}. Foi encontrado por adição dos padrões dos ácidos hipúrico e *m*-metil hipúrico em urina sintética, em concentrações inferiores a 1,0g/L. Além disso, foi considerado como LQ do método, as concentrações que geraram picos de AH e *m*-AMH 10 vezes maior que o encontrado no branco de urina sintética. As análises descritas foram realizadas de acordo com o procedimento descrito em 4.3.2.

4.3.1.6 Precisão do método analítico

Para avaliar a precisão, as amostras enriquecidas com 0,5; 2,0 e 4,0 g/L dos ácidos hipúrico e *m*-metil hipúrico foram analisadas em 10 replicatas por concentração, para o estabelecimento da precisão intra-

ensaio e em quintuplicata, durante sete dias consecutivos, para o estudo da precisão interensaio. A precisão foi expressa pelo coeficiente de variação (%).

4.3.1.7 Recuperação

Para avaliar a eficiência do método de tratamento da amostra, ou seja, sua recuperação, utilizou-se três concentrações do AH e *m*-AMH: 0,5; 2,5 e 5,0 g/L de urina. Foram feitos 6 adicionados para cada concentração sendo estas amostras submetidas ao procedimento descrito em 4.3.2. A recuperação foi calculada pela comparação entre a resposta quando a adição dos analitos foi feita antes da extração da matriz biológica *versus* a resposta quando a adição foi realizada após o procedimento de extração, obtendo-se a porcentagem de recuperação dos analitos^{23,24,58,87}.

4.3.1.8 Exatidão

Para o estudo de exatidão, amostras de urina foram enriquecidas com AH e *m*-AMH para se obter concentrações de 0,5; 2,0 e 4,0 g/L e tratadas segundo método descrito em 4.3.2. Este estudo foi realizado em sextuplicata para cada uma das três concentrações.

A inexatidão foi calculada pela tendenciosidade (*bias*) de acordo com a equação^{23,24,58,87}:

$$\text{Inexatidão (\%)} = \frac{\text{conc. obtida} - \text{conc. esperada}}{\text{conc. esperada}} \times 100$$

4.3.1.9 Interferência da matriz

Para avaliar interferência da matriz biológica, amostras de urina e água, enriquecidas com as concentrações 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0g/L foram submetidas ao procedimento analítico descrito em 4.3.2. As análises foram realizadas em triplicata, juntamente com brancos de água e de urina.

4.3.1.10 Estabilidade do analito na amostra

A estabilidade foi avaliada através de três ciclos de congelamento a -20°C e descongelamento a temperatura ambiente por 2 horas antes da análise. As amostras de urina foram enriquecidas com 0,5; 2,0 e 4,0 g/L dos analitos (AH e *m*-AMH).

4.3.2 Procedimento de extração simultânea dos ácidos hipúrico e metil hipúrico em urina

Usou-se a técnica de extração com base na proposta por ALVAREZ-LEITE *et al.* ⁴, para a extração do ácido hipúrico, com ligeiras modificações.

- em tubo de centrífuga com rolha esmerilhada de capacidade para 15 mL, adicionar 1,0 mL de urina e acidificar com 2 gotas de HCl 6N;
- adicionar 0,3 mL da solução metanólica de padrão interno, ácido heptadecanóico 2g/L;
- extrair com 3mL de acetato de etila, agitando por 1 min;

- transferir a fase orgânica e colocá-la em um outro tubo contendo Na_2SO anidro, agitar. Repetir a extração e juntar as fases orgânicas;
- passar quantitativamente a fase orgânica para béquer afunilado com tampa, capacidade de 5ml;
- evaporar até a secura em termo bloco a 60°C , sob fluxo de N_2 ;
- sobre o resíduo seco colocar 200uL de agente metilante, agitar por 1 min;
- em seguida injetar 1uL no cromatógrafo a gás, segundo as condições especificadas no item 5.1.1.

***agente metilante** - Hidróxido de trimetilfenilamônio (HTMFA), preparado com se segue:

- Cristais de cloreto de trimetil-n-fenilamônio.....263 mg
- Óxido de prata.....175 mg
- Metanol super seco.....10 mL

- Agitar por 2h, em agitador mecânico, sendo o tubo recoberto com papel alumínio para proteger da luz. Deixar em repouso até decantar.
- Retirar o sobrenadante, colocar em frascos pequenos e acondicioná-los -20°C , ao abrigo da luz.

A Figura 7 mostra o fluxograma do método analítico para a determinação do ácido hipúrico e ácido metil hipúrico.

FIGURA 7. Fluxograma do procedimento analítico para a determinação simultânea dos ácidos hipúrico e metil hipúrico urinários.

4.3.3 Determinação da creatinina e da densidade urinária

Os teores de creatinina urinária foram determinados por método espectrofotométrico, sendo as análises executadas com auxílio de um Kit da Labtest® e a densidade urinária foi medida com urodensímetro Uricon®. Estas análises foram realizadas antes do congelamento das amostras.

4.3.4 Análise estatística

Os resultados foram analisados quanto à sua significância ($p < 0,05$) através dos testes não paramétricos Kruskal–Wallis e Mann–Whitney²⁸ pelo método ANOVA.

5 RESULTADOS

5.1 Validação do procedimento analítico para a determinação simultânea dos ácidos hipúrico e metil hipúrico urinários

5.1.1 *Otimização das condições cromatográficas*

As condições cromatográficas que melhor se adequaram à análise dos ácidos hipúrico e metil hipúrico estão apresentadas a seguir:

- temperatura: - coluna : inicial 140°C por 1 min
aquecer 30°C /min até 200°C
aquecer 40°C /min até 240°C
tempo final da corrida 10 min
- injetor : 240°C
- detector : 250°C
- fluxo dos gases: - hidrogênio: 3,2 mL/min
- hidrogênio: 40 mL/min
- ar sintético: 450 mL/min
- nitrogênio: 50 mL/min
- razão de divisão no injetor: 1/10
- parâmetros de integração: - sensibilidade: 950
- largura de pico: 0,02
- área rejeitada: 10
- altura rejeitada: 100

Nas condições padronizadas o ácido hipúrico (AH), ácido *m*-metil hipúrico (*m*-AMH) e ácido heptadecanóico (PI) foram visivelmente separados nos cromatogramas. Na Figura 8 estão representados os cromatogramas relativos ao branco de urina e à urina enriquecida com

soluções-padrão de ácido hipúrico e de ácido *m*-metil hipúrico nas concentrações de 2,5 g/L. A Tabela 7 apresenta os tempos de retenção e tempos de retenção relativos dos picos cromatográficos destas substâncias na coluna HP-1[®].

FIGURA 8. Cromatogramas do branco de urina com ácido heptadecanóico (PI) **(a)** ; do *pool* de urina enriquecida com ácidos hipúrico (AH) e *m*-metil hipúrico (AMH) na concentração 2,5 g/L e (PI) **(b)**.

Tabela 7. Tempo de retenção do ácido hipúrico e do ácido *m*-metil hipúrico com os respectivos desvios padrão e tempos de retenção relativos ao ácido heptadecanóico (PI), nas condições cromatográficas padronizadas.

ordem de eluição	analito	tempo de retenção $\pm$ desvio padrão (min)*	tempo de retenção relativo
1	ácido hipúrico	$4.751 \pm 0,0017$	0,58
2	ácido <i>m</i> -metil hipúrico	$5.882 \pm 0,0017$	0,69
3	ácido heptadecanóico	$8.544 \pm 0,0011$	1,00

*= média de 10 determinações

5.1.2 Linearidade

Nas Figuras 9 e 10 estão representadas as curvas de linearidade dos ácidos hipúrico e *m*-metil hipúrico, respectivamente, adicionados em amostras de *pool* de urina nas concentrações de 0,1 a 5,0 g/L para o AH e de 0,2 a 5,0 g/L para o *m*-AMH. Cada ponto corresponde à média dos valores encontrados na análise das sextuplicatas. Ficou demonstrado que o método foi linear nestas faixas de concentração.

FIGURA 9. Curva de linearidade do ácido hipúrico (AH) em urina.

FIGURA 10. Curva de linearidade do ácido *m*-metil hipúrico (AMH) em urina.

5.1.3 Limite de detecção

Para ambas as substâncias analisadas foi considerado limite de detecção a concentração de 6,25 mg/L, que forneceu um pico de AH e *m*-AMH três vezes maior que o branco de urina sintética e cujo coeficiente de variação foi de 18%.

5.1.4 Limite de quantificação

O limite de quantificação encontrado para o AH foi de 0,1 g/L, apresentando um coeficiente de variação de 4%, para 10 replicatas. Para o *m*-AMH, o limite de quantificação foi de 0,2 g/L, apresentando um CV de 5%, para 10 replicatas.

5.1.5 Precisão

Os coeficientes de variação intra e interensaio obtidos nas análises urinárias de AH e *m*-AMH, estão apresentados na Tabela 8.

TABELA 8. Precisão do método analítico para determinação simultânea de ácido hipúrico (AH) e ácido *m*-metil hipúrico (AMH) urinários, expressa em função dos coeficientes de variação (CV).

concentração (g/L)	CV (%) intra-ensaio*		CV (%) interensaio**	
	AH	AMH	AH	AMH
0,5	4,2	4,4	11,5	11,9
2,0	3,4	4,4	10,2	11,8
4,0	2,9	3,0	9,9	8,4

* dez replicatas de cada ponto, analisadas no mesmo dia

** cinco replicatas de cada ponto, analisadas 7 dias consecutivos

5.1.6 Recuperação

Os valores obtidos do estudo de recuperação estão apresentados na Tabela 9, cada ponto corresponde a média de seis replicatas.

TABELA 9. Recuperação do método para os ácidos hipúrico (AH) e *m*-metil hipúrico (AMH) adicionados em *pool* de urina.

concentração (g/L)	% recuperação	
	AH	AMH
0,5	76	73
2,5	87	87
5,0	85	82
média ± dp	82,7 ± 5,9	80,7 ± 7,1

5.1.7 Exatidão

A exatidão do método tem os valores do percentual de tendenciosidade representados na Tabela 10.

TABELA 10. Inexatidão do método de determinação simultânea dos ácidos hipúrico (AH) e *m*-metil hipúrico (AMH) em urina, expressa em função de porcentagem (%).

concentração (g/L)	% inexatidão	
	AH	AMH
0,5	- 8,6	- 9,2
2,0	- 8,3	- 8,8
4,0	- 7,8	- 7,9

5.1.8 Interferência da matriz

As Figuras 11 e 12 ilustram as curvas de calibração obtidas dos adicionados de AH e *m*-AMH em água e em urina.

FIGURA 11. Representação gráfica da curva de calibração do ácido hipúrico (AH) em água e em urina nas concentrações de 0,1 a 5,0 g/L.

FIGURA 12. Representação gráfica da curva de calibração do ácido *m*-metil hipúrico (AMH) em água e em urina nas concentrações de 0,2 a 5,0 g/L.

5.1.9 Estabilidade do analito na amostra

O resultado do estudo de estabilidade é mostrado na Figura 13 e 14, para as amostras que passaram por 3 ciclos de congelamento/descongelamento.

FIGURA 13 Estabilidade do ácido hipúrico (2,0 g/L) em amostra de urina, após 3 ciclos de congelamento/descongelamento.

FIGURA 14. Estabilidade do ácido *m*-metil hipúrico (2,0 g/L) em amostra de urina, após 3 coclos de congelamento/descongelamento.

Para as concentrações de 0,5 e 4,0 g/L de AH e AMH, em nenhum dos ciclos de congelamento/descongelamento as variações foram acima da média do valor inicial ± 1 desvio padrão.

5.2 Ácido hipúrico e ácido metil hipúrico em amostras de urina de trabalhadores expostos ocupacionalmente a solventes (Grupo 1) e de não-expostos (Grupo 2)

As Tabelas 11 e 12 apresentam, respectivamente, os resultados da determinação do AH e AMH em urina de trabalhadores não-expostos ocupacionalmente a solventes (Grupo 2), e expostos no setor de funilaria e pintura (Grupo 1). Os resultados estão expressos em g/L e em g/g de creatinina.

A Figura 15 mostra os cromatogramas relativos às amostras de urina do trabalhador 24 do Grupo 2 (não-exposto) **(a)** e dos trabalhadores 63 **(b)** e 1 do Grupo 1 **(c)** expostos no setor de funilaria e pintura.

TABELA 11. Valores do AH e do AMH em amostras de urina do grupo de trabalhadores não-expostos.

trabalhador	AH (g/L)	AH (g/g creat)	AMH (g/L)
1. A.D.C.N.	0,51	0,42	ND
2. A.J.R.	0,60	0,44	ND
3. C.M.R.	1,40	0,67	ND
4. D.A.R.	1,00	0,51	ND
5. D.O.P.	0,55	0,34	ND
6. D.R.D.	0,44	0,25	ND
7. E.H.	ND	ND	ND
8. E.I.O.	0,71	0,25	ND
9. E.S.H.N.	0,82	0,31	ND
10. E.S.N.	0,64	0,32	ND
11. F.B.H.	0,58	0,36	ND
12. F.O.M.	0,39	0,27	ND
13. G.E.D.	0,68	0,40	ND
14. G.G.B.	0,50	0,31	ND
15. G.S.	0,60	0,24	ND
16. J.B.M.	0,71	0,32	ND
17. J.D.T.F.	0,69	0,40	ND
18. J.L.	0,55	0,19	ND
19. K.N.S.	0,66	0,30	ND
20. L.R.S.	ND	ND	ND
21. M.L.R.	0,66	0,44	ND
22. M.L.S.	0,50	0,30	ND
23. M.R.S.V.	0,95	0,67	ND
24. N.M.C.F.	0,30	0,21	ND
25. P.E.F.D.	0,40	0,25	ND
26. P.H.B.	0,45	0,21	ND
27. R.A.G.	0,98	0,34	ND
28. R.M.R.	0,80	0,40	ND
29. R.P.I.	0,30	0,30	ND
30. S.M.S.	0,94	0,38	ND
31. W.S.	0,88	0,52	ND

ND = não detectado (< LQ (AH < 0,1 g/L e AMH < 0,2g/L))

TABELA 12. Valores dos ácidos hipúrico (AH) e metil hipúrico (AMH) em urina de trabalhadores expostos a solventes, no setor de funilaria e pintura.

trabalhador	AH (g/L)	AH (g/g creat.)	AMH (g/L)	AMH (g/g creat.)
1. A.A.V.	1,61	0,67	0,41	0,5
2. A.G.B.	0,41	0,43	ND	ND
3. A.O.S.	0,17	0,13	ND	ND
4. A.S.	0,58	0,39	0,36	0,41
5. A.S.P.	0,55	0,42	ND	ND
6. C.A.F.	1,01	0,63	ND	ND
7. C.S.	0,74	0,44	ND	ND
8. D.T.P.	0,24	0,2	ND	ND
9. E.A.S.	1,26	0,7	ND	ND
10. E.A.Z.N.	0,2	0,35	ND	ND
11. E.G.	0,69	0,3	ND	ND
12. F.V.	1,55	0,52	ND	ND
13. G.C.T.S.	0,96	0,53	ND	ND
14. J.A.A.	1,03	0,79	ND	ND
15. J.B.A.	0,73	0,41	ND	ND
16. J.C.S.	1,31	0,53	ND	ND
17. J.C.S.B.	0,55	0,25	ND	ND
18. J.G.O.	< LQ	< LQ	ND	ND
19. J.M.R.P.	0,98	1,09	ND	ND
20. J.O.S.L.	0,37	0,23	ND	ND
21. J.R.S.F.	0,83	0,76	ND	ND
22. M.A.C.	0,74	0,74	ND	ND
23. M.C.	0,62	0,31	ND	ND
24. P.J.F.	1,74	1,16	ND	ND
25. P.R.F.R.	1,31	0,77	ND	ND
26. P.S.M.	0,25	0,13	ND	ND
27. R.S.S.	0,28	0,2	ND	ND
28. S.C.J.	0,34	0,26	ND	ND
29. A.B.M.V.	0,38	0,2	ND	ND
30. G.M.S.	0,34	0,21	ND	ND
31. J.F.S.	0,2	0,2	ND	ND
32. W.E.S.	0,4	0,2	ND	ND
33. A.B.S.	1,05	1,31	ND	ND
34. A.F.S.	0,34	0,26	ND	ND
35. A.J.B.S.	0,64	0,21	ND	ND
36. A.S.M.	1,41	0,74	ND	ND
37. C.A.	3,15	3,15	ND	ND

Continuação da TABELA 12

trabalhador	AH (g/L)	AH (g/g creat.)	AMH (g/L)	AMH (g/g creat.)
38. C.A.M.	0,4	0,21	ND	ND
39. D.A.M.	1,07	0,36	ND	ND
40. D.B.	0,41	0,52	ND	ND
41. E.M.	0,14	0,14	ND	ND
42. G.A.A.	1,68	0,93	ND	ND
43. I.A.	0,63	0,35	ND	ND
44. I.F.S.	1,04	0,65	ND	ND
45. M.M.	0,56	0,33	ND	ND
46. P.B.C.	0,63	1,26	ND	ND
47. R.A.S.	0,21	0,21	ND	ND
48. R.H.N.	0,67	0,33	ND	ND
49. R.N.	0,36	0,23	ND	ND
50. R.S.	1,36	1,05	ND	ND
51. S.G.S.	0,49	0,2	ND	ND
52. V.M.S.	0,67	0,42	ND	ND
53. V.P.S.	0,67	0,26	ND	ND
54. V.S.	1,8	0,81	ND	ND
55. A.E.	0,16	0,2	ND	ND
56. I.R.L.	0,72	0,45	ND	ND
57. J.C.A.	0,34	0,26	ND	ND
58. J.R.R.	0,7	1,4	ND	ND
59. M.P.S.	0,94	0,67	ND	ND
60. O.P.S.	0,32	0,2	ND	ND
61. R.B.J.	1,28	0,71	ND	ND
62. R.N.T.	0,26	0,53	ND	ND
63. W.H.	1,63	3,26	ND	ND
64. C.A.O.C.	0,36	0,24	ND	ND
65. J.O.	0,29	0,2	ND	ND
66. E.S.	1,81	0,75	ND	ND
67. L.P.O.	0,46	0,23	ND	ND
68. M.E.S.	0,94	0,31	ND	ND
69. O.F.S.	0,49	0,29	ND	ND

ND = não detectado (<LQ (AH < 0,1 g/L e AMH < 0,2g/L))

FIGURA 15. Cromatogramas relativos às amostras de urina do trabalhador 24 do Grupo 2 (a); do trabalhador 63 do Grupo 1 (b) e do trabalhador 1 do grupo 1 (c).

TABELA 13. Medidas descritivas para as concentrações de ácido hipúrico (g/L e g/g creat) em trabalhadores expostos do setor de funilaria e pintura e grupo controle.

	trabalhadores expostos		grupo controle	
	g/L	g/g creat.	g/L	g/g creat.
média	0,76	0,55	0,72	0,34
mediana	0,63	0,36	0,64	0,32
desvio padrão	0,55	0,56	0,41	0,15
erro padrão	0,07	0,07	0,07	0,03
mínimo	0	0	0	0
máximo	3,15	3,26	1,60	0,67
n	69	69	31	31

FIGURA 16. Representação das concentrações de ácido hipúrico urinário (g/g creatinina) encontradas no grupo de trabalhadores expostos e no grupo controle.

TABELA 14. Medidas descritivas para as concentrações de ácido hipúrico urinário em (g/g de creat.) em trabalhadores expostos a solventes de acordo com o uso de equipamento de proteção individual (E.P.I).

	uso de E.P.I	
	sim	não
média	0,48	0,62
mediana	0,40	0,35
erro padrão	0,05	0,12
desvio padrão	0,29	0,73
mínimo	0,14	0,0
máximo	1,16	3,26
n	34	35

TABELA 15. Medidas descritivas para as concentrações de ácido hipúrico urinário, em g/g de creatinina em trabalhadores expostos a solventes no setor de funilaria e pintura de acordo com o hábito de fumar.

	fumante	não fumante
média	0,62	0,53
mediana	0,33	0,41
erro padrão	0,22	0,07
desvio padrão	0,81	0,48
mínimo	0,20	0,0
máximo	3,26	3,15
n	14	55

TABELA 16. Medidas descritivas para as concentrações de ácido hipúrico (g/g de creat.) em trabalhadores do setor de funilaria e pintura de acordo com a ingestão de bebidas alcóolicas.

	ingestão de bebida alcóolica	
	sim	não
média	0,49	0,60
mediana	0,34	0,41
erro padrão	0,10	0,12
desvio padrão	0,36	0,69
mínimo	0,13	0,0
máximo	1,4	3,26
n	33	36

6 DISCUSSÃO

Vários estudos indicam que o tolueno e o xileno estão presentes em combinação no ambiente de trabalho e devido à similaridade das suas estruturas químicas bem como das estruturas de seus metabólitos, o AH e o AMH podem ser determinados na urina numa única análise.

Procedeu-se o levantamento bibliográfico para escolha de um método analítico que permitisse aplicação em monitorização biológica. Foram encontrados métodos cromatográficos em fase gasosa (CG) e em fase líquida (CLAE).

Nos últimos anos, a CLAE tem sido a técnica mais utilizada em análises simultâneas de AH e AMH por possibilitar injeção direta dos extratos orgânicos obtidos das amostras, não requerendo prévia derivação dos analitos, o que agiliza a análise⁷¹.

Os métodos cromatográficos em fase gasosa requerem procedimento de derivação dos analitos. Há autores que realizam a derivação com diazometano, reagente altamente tóxico e explosivo^{18,54,84}. Outros obtêm os derivados trimetilsilila com substâncias caras e que requerem limpeza periódica do detector^{4,20,84}.

Entretanto, devido à grande disponibilidade de cromatógrafos à gás em laboratórios de análises toxicológicas, e ao fato desta técnica apresentar sensibilidade similar à CLAE em análise de AH e AMH, pareceu-nos interessante estudar um método de extração e um procedimento de derivação que tivessem características como: rapidez, baixo custo e boa recuperação dos derivados e que pudesse ser então utilizado em análises rotineiras de biomonitorização.

Foram realizados testes com dois agentes de derivação que mais pareceram atender às características acima descritas: o metanol/HCl, indicado por CARVALHO *et al.* (1991) ²¹ e o hidróxido de trimetilfenilamônio (HTMFA), utilizado por ALVAREZ-LEITE *et al.* (1994) ⁴ na análise de AH. Ainda que ambos apresentassem bons resultados de recuperação, o uso do metanol/HCl requer extração dos metil ésteres com clorofórmio e o tempo de reação para formação dos derivados é de 45 minutos. Assim, optou-se pela utilização do HTMFA que possibilita a formação dos derivados após 1 minuto de agitação do extrato seco com o metilante, além do baixo custo dos reagentes e pequeno volume gasto (200 µL).

Para a realização deste trabalho 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 da urina e os picos de AH e AMH e do padrão interno. Com base nos trabalhos que avaliaram a eficiência das colunas cromatográficas observou-se que não havia citações do uso de coluna capilar. A partir da polaridade das colunas empacotadas, selecionou-se a coluna capilar HP-1[®], 100% dimetilpolisiloxano, que mostrou boa resolução cromatográfica. Segundo o catálogo do fabricante esta coluna é apropriada para a análise destes de ácidos orgânicos.

Nos trabalhos revistos que citavam a cromatografia em fase gasosa como método para análise destes metabólitos, sempre o ácido *m*-metil hipúrico era utilizado como isômero de escolha ^{18,20,21,84}. Tanto em CG ^{21,54} como em CLAE ^{64,71} não se consegue separar os isômeros *meta* e *para* pois eles têm exatamente o mesmo tempo de retenção. Como o isômero *meta* é considerado o mais importante em termos quantitativos, ficando em segundo lugar o isômero *para*, optou-se pela padronização do ácido *m*-metil hipúrico representando os dois isômeros. O isômero *orto* é pouco representativo no

toluol e quando testado não gerou resposta detectável a não ser em concentrações altas ($> 1\text{ g/L}$).

O ácido heptadecanóico, preconizado por vários autores^{18,21,54,84}, foi utilizado como padrão *interno* para eliminar as variações durante a preparação das amostras e compensar as perdas advindas do procedimento de extração, pois na injeção manual pequenas variações no volume injetado implicam em variações na área do pico. O cálculo com base na área relativa do pico (área do AH ou do *m*-AMH/área PI) permitiu a obtenção de valores mais constantes; ALVAREZ-LEITE *et al.* (1994)⁴ utilizaram esta substância como padrão *externo*.

Em métodos cromatográficos a extração mais relatada é a líquido-líquido, sendo o acetato de etila o melhor solvente extrator; a urina deve ser previamente acidificada para se obter $\text{pH} = 2,0$ ^{18,20,21,54,68,84}.

O procedimento analítico teve por base o trabalho de ALVAREZ-LEITE *et al.* (1994)⁴ para a extração e derivação dos analitos. Quando usou-se o volume de metilante preconizado pelos autores ($120\text{ }\mu\text{L}$), notou-se redução dos picos das substâncias AH e *m*-AMH nas concentrações acima de $2,0\text{ g/L}$. Assim sendo, foram testados diversos volumes e optou-se por $200\text{ }\mu\text{L}$ de HTMFA, o qual proporcionou boa recuperação.

Os parâmetros de identificação, tais como as temperaturas do injetor e do detector foram testadas até obter boa resolução dos cromatogramas. Para otimizar as condições analíticas foi usada coluna capilar com programação de temperatura e razão de divisão, na tentativa de obter maior sensibilidade no método e diminuir o tempo de corrida.

A escolha do fluxo do gás de arraste, hidrogênio, foi feita com base nas especificações da coluna. Foram testados fluxos mais baixos e não se

obteve resultado satisfatório, as substâncias de interesse não apareceram nos cromatogramas quando o fluxo era menor que 3,2 mL/min. Uma das possibilidades para se diminuir o tempo de análise é a programação de temperatura da coluna, que foi definida como: início 140°C elevando-se até 200°C quando saíram os picos de AH e *m*-AMH e aumentando-se até 240°C com o objetivo de reduzir o tempo de eluição do PI para aproximadamente 8 minutos e limpar a coluna após cada injeção. A Figura 8 ilustra a boa separação entre os analitos e o PI dos demais compostos da urina eluídos na coluna. Os tempos de retenção das 3 substâncias foram adequados para a identificação dos analitos, $t_{rAH} = 0,58$ e $t_{rAMH} = 0,69$, sendo que cada amostra requer cerca de 10 minutos para sua análise.

A validação do método foi então estabelecida visando minimizar os erros e assegurar a máxima qualidade do trabalho, com base no que é proposto para as determinações analíticas.

Os dados do estudo de linearidade mostram que há covariância positiva entre as concentrações de AH, de 0,1 a 5,0 g/L, e *m*-AMH de 0,2 a 5,0 g/L e as respectivas áreas relativas (padrões das substâncias/padrão interno). O coeficiente de determinação foi de 0,9970 para AH e 0,9943 para o *m*-AMH. Ambos estão de acordo com o que é satisfatório para considerar que o método gera resultados proporcionais às concentrações das espécies analisadas, dentro de uma faixa analítica especificada^{23,24,58,87}. O intervalo das concentrações foi escolhido de acordo com o Índice Biológico Máximo Permitido (IBMP) de cada substância determinado pela legislação brasileira, de 2,5 e 1,5 g/g de creatinina, respectivamente para o AH e AMH, e o valor de referência estabelecido para o AH, de até 1,5 g/g de creatinina¹⁵.

Neste estudo, a curva de calibração foi analisada a cada lote de amostras para possibilitar a quantificação mais confiável dos analitos e devido à pequena variação obtida, optou-se por usar os pontos da curva em

duplicata. Visto estar o AH normalmente presente na urina em g/L, a quantidade presente no *pool* de urina usado para as adições dos padrões foi diminuída dos adicionados antes de usá-los para quantificação do AH nas amostras.

O limite de detecção (LD) para os dois bioindicadores foi de 6,25 mg/L e forneceu uma área três vezes maior que a obtida com uma urina sintética, com um CV de 18%. Para estabelecer o LD foi utilizada urina sintética como branco de urina, a qual possui todas as características da urina proveniente do organismo humano mas não apresenta o AH como constituinte.

Os limites de quantificação (LQ) foram de 0,1 g/L para AH e 0,2 g/L para *m*-AMH, com respectivos CVs de 4,0% e 5,0%. CARVALHO *et al.* (1991)²¹ e ALVAREZ-LEITE *et al.* (1994)⁴, obtiveram LQ similares usando CG/DIC e coluna empacotada na identificação e extração líquido-líquido do AH.

No estudo da precisão intra-ensaio utilizou-se as concentrações de 0,5; 2,0 e 4,0 g/L e os respectivos coeficientes de variação obtidos foram 4,2%; 3,4% e 2,9% para o AH e 4,4%; 4,4% e 3,0% para o *m*-AMH. As mesmas concentrações foram estudadas para estabelecer-se precisão interensaio, através de análise dia-após-dia por 7 dias, obtendo-se os seguintes CVs: 11,5%; 10,2% e 9,9% para o AH e 11,9%; 11,8% e 8,4% para o *m*-AMH. Todos os valores mostraram precisão adequada^{23,24,58,87} sendo menores que os relatados na literatura por ALVAREZ-LEITE *et al.* (1994)⁴ e maiores que os encontrados por CARVALHO *et al.* (1991)²¹.

Os resultados da recuperação do método obtidos a partir de adicionados dos padrões de AH e *m*-AMH às amostras de urina nas concentrações 0,5; 2,5 e 5,0 g/L (Tabela 9) forneceram valores médios em

torno de 80%, para ambas as substâncias. Valores em torno de 80-90% de recuperação foram obtidos em outros estudos^{4,20,21,71,84}.

A exatidão expressa em função da porcentagem de inexatidão (tendenciosidade) apresentou os resultados satisfatórios para as concentrações 0,5; 2,0 e 4,0 g/L, apesar de terem sido realizados com amostras adicionadas pela impossibilidade de se obter amostras certificadas (Tabela 10).

Foi avaliado o efeito da matriz para saber se esta teria alguma influência na análise. Aplicando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, foi possível verificar que um aumento nas concentrações de AH e *m*-AMH ($p > 0,05$) produz o mesmo aumento na área relativa, tanto na curva em água quanto em urina. Pode-se observar pela análise de regressão múltipla que os coeficientes angulares (curva em água e curva em urina para ambos os analitos) são próximos, já os coeficientes lineares diferem-se mais; optou-se por fazer a curva de calibração usando-se a urina.

No estudo de estabilidade, avaliando-se 3 ciclos de congelamento e descongelamento, os analitos mostraram-se estáveis nas concentrações 0,5; 2,0 e 4,0 g/L. As figuras 13 e 14 ilustram este resultado na concentração média 2,0 g/L. Na literatura encontra-se citações sobre o tempo de estabilidade dos analitos em geladeira, a 4°C, e freezer a -20°C. Em geladeira, o período avaliado variou entre 4 dias³ e 7 dias⁸⁴. A -20°C os analitos permaneceram estáveis entre 6 dias³ e 45 dias⁴.

Optou-se por fazer os ciclos de congelamento e descongelamento, pois não se encontra estudo deste parâmetro na literatura pesquisada. Assim, caso ocorra algum imprevisto após o descongelamento das amostras no laboratório sabe-se que estas serão estáveis em, pelo menos, 3 ciclos de congelamento/descongelamento.

Foram analisadas 100 amostras de trabalhadores de 4 concessionárias de veículos, sendo 69 amostras do setor de funilaria e pintura e 31 dos escritórios. LEPERA (1996)⁵⁹, cita que dentre os solventes encontrados na atmosfera das oficinas de repintura qualitativamente o tolueno e o xileno são predominantes. Estes foram detectados em 100% das amostragens do ar e suas proporções variaram em função da tinta e do tiner, e para uma mesma tinta, entre fabricantes.

A comparação dos níveis de tolueno e xileno no ar com os bioindicadores avaliados, AH e AMH, permitiria uma discussão mais completa sobre correlações e avaliação da exposição ocupacional no grupo estudado, o que infelizmente não pode ser executado. Também poderia esclarecer o porquê da obtenção de apenas dois casos mensuráveis de ácido metil hipúrico na população exposta (Tabela 12). Apesar disto, pode-se verificar pela comparação dos teores de AH obtidas nos dois grupos, controle e exposto, provavelmente a exposição dos trabalhadores era muito baixa.

As análises estatísticas foram aplicadas apenas para o AH pois o AMH apresentou-se quase sempre abaixo do LQ.

Os resultados obtidos (Tabelas 11 e 12) foram expressos em função da creatinina urinária, pois o IBMP na legislação nacional é expresso desta forma. Na impossibilidade da obtenção das amostras de urina 24 horas, dados na literatura indicam que a correção pela creatinina é a melhor forma de expressar a excreção urinária dos AH e *m*-AMH. Neste estudo não houve diferença significativa nos resultados expressos em g/L ou g/g de creatinina.

Os valores médios de AH detectados no grupo controle - 0,72 g/L (0,34 g/g creat.) – foram superiores aos encontrados por ALVAREZ-LEITE

et al. (1999) ⁵ na população metropolitana de Belo Horizonte (média 0,42 g/L) e por PAIVA & SIQUEIRA (1999) ⁷⁷ na região Sul de Minas Gerais (média de 0,18). Entretanto o número de pessoas (31) do grupo controle foi bem menor que as populações citadas nos outros estudos que objetivaram estabelecer valores de referência de AH.

No Brasil, a NR-7 ¹⁵ estabelece como IBMP para o AH o valor de 2,5 g/g de creatinina. Na população exposta (Tabela 12) apenas 2 dos trabalhadores apresentaram valores de AH superiores ao valor limite.

Aplicando o teste t Student, para a média de AH do grupo exposto comparada com a do grupo controle, foi encontrada diferença significativa entre os 2 grupos ($p < 0,05$). Nenhuma diferença foi encontrada quando foi aplicado o teste Mann-Whitney para as medianas ($p < 0,05$).

O uso de equipamento de proteção individual (E.P.I) (Tab. 14), não afetou significativamente os resultados de AH dos trabalhadores expostos, provavelmente por ter sido muito baixa a exposição.

Nem todos os trabalhadores que usavam E.P.I faziam parte das mesmas concessionárias. Devido a este fato, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis considerando esta variável, não tendo sido verificada diferença nos resultados de AH. O local de trabalho também não afetou significativamente estes resultados.

Os hábitos de fumar e de ingerir bebidas alcoólicas, juntos ou separadamente, tem sido apontado como sendo os principais fatores que interferem na toxicocinética do tolueno e, conseqüentemente, na excreção de seus metabólitos. Comparando-se as médias e medianas, para estas variáveis uso de tabaco e álcool, não foram encontradas diferenças

significativas, discordando dos achados de alguns autores^{5,49} e corroborando a de outros^{33,38,39,44,45,53,89,93}.

A avaliação de efeitos da exposição ocupacional a solventes através da aplicação de questionários é um procedimento freqüentemente relatado. O Quadro 1 mostra as respostas obtidas para as questões relativas ao questionário do Anexo 1. Para cada trabalhador é apresentado o tempo de profissão em anos, o tipo e o total de queixas. Os sintomas deste quadro foram selecionados de acordo com os testes neurocomportamentais aplicados por outros autores. Apesar dos sintomas serem subjetivos, os mesmos referem-se à exposição crônica.

Quadro 1. Tempo de profissão (TP), sintomas relatados (*) e total de sintomas por pintor.

trabalhador		sintomas																total de sintomas
Nº	TP	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	
01	20							*										1
02	10	*		*	*							*						4
03	18	*	*		*			*	*	*		*					*	8
04	10				*			*	*									3
05	26				*	*		*						*	*			5
06	6				*			*	*			*		*	*			6
07	21	*			*	*		*	*	*	*	*	*		*		*	11
08	18	*	*			*				*	*							5
09	2		*		*	*	*		*	*	*	*	*		*		*	11
10	5				*	*		*			*	*	*	*	*			8
11	5				*	*								*	*			4
12	3				*			*				*	*	*	*			6
13	25				*			*										2
14	28	*				*		*	*	*				*	*		*	8
15	5				*			*					*					3
16	7				*		*	*		*							*	5
17	8				*													1
18	10																	0
19	22													*				1
20	13	*			*	*		*		*	*	*						7
21	15	*				*									*			3
22	19			*				*	*									3
23	19				*			*	*				*					4
24	6			*	*									*			*	4
25	13																	0
26	15				*								*					2
27	22				*	*			*						*		*	5

Continuação do **QUADRO 1**

Nº	TP	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	
28	25				*													1
29	4	*	*		*	*			*			*		*			*	8
30	12												*		*			2
31	1			*									*				*	3
32	12																	0
33	1				*	*											*	3
34	19																	0
35	22	*		*	*			*						*				5
36	20					*									*			2
37	5																*	1
38	22													*				1
39	4	*	*		*	*		*					*				*	7
40	7				*	*		*	*									4
41	10			*	*			*	*									4
42	4	*		*						*	*	*		*			*	7
43	7	*	*	*	*			*			*		*	*	*			9
44	20				*	*								*				3
45	4				*													1
46	15			*														1
47	17				*	*												2
48	10				*	*			*									3
49	4	*		*				*				*			*			5
50	3	*	*		*	*	*		*				*				*	8
51	8				*									*			*	3
52	25				*	*	*	*	*		*							6
53	20	*													*			2
54	15					*								*	*			3
55	15													*	*			2
56	22					*	*					*				*		4

Continuação do **QUADRO 1**

Nº	TP	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	
57	23										*	*	*	*				4
58	11								*	*							*	3
59	4							*						*				2
60	18	*	*	*	*				*					*				6
61	3							*	*									2
62	9							*				*	*	*	*			5
63	20	*	*	*				*	*		*							6
64	14				*	*		*	*		*		*	*	*			8
65	10	*	*	*	*													4
66	15																	0
67	7							*	*						*			3
68	2	*	*	*	*													4
69	8			*										*				2

Legenda para sintomas

A - Você tem dificuldades para se lembrar das coisas

B - Alguém da sua família já disse que você tem memória curta

C - Você costuma escrever coisas que deve lembrar de fazer

D - Você costuma voltar para conferir coisas que fez

E - Você tem dificuldades para entender o que está lendo

F - Você tem dificuldade para se concentrar em algo que está fazendo

G - Você fica nervoso e irritado com muita facilidade

H - Você fica triste ou deprimido com certa frequência

I - Você se cansa muito fácil, com pouco esforço físico

J - Você tem batadeira no coração sem fazer esforço

K - Você sente o peito sufocado

L - Você transpira mesmo quando não está calor

M - Você tem dor de cabeça ao menos uma vez por semana

N - Você costuma ter formigamento em alguma parte do corpo

O - Você já notou alguma dificuldade para distinguir entre as cores (amarelo e azul) - (verde e vermelho)

P - Você tem insônia (acorda durante a noite e acorda cansado)

Não foi possível observar correlação entre número de sintomas e o tempo de profissão declarado pelos trabalhadores. Discussões mais aprofundadas sobre estes dados não foram possíveis com base no instrumento usado para sua obtenção.

A grande maioria dos trabalhadores avaliados apresentou mais de 3 diferentes tipos de queixas quanto ao seu estado de saúde. As alterações neurocomportamentais da exposição crônica aos solventes não se relaciona com os níveis de bioindicadores de dose interna e que refletem a exposição recente, como o AH e AMH aqui estudados. O desenvolvimento de biomarcadores de neurotoxicidade, que poderiam evidenciar o efeito conjunto de solventes no sistema nervoso e prevenir a ocorrência de doença crônica, é assunto de grande interesse e investigação atual.

Por outro lado, a biomonitorização, através de análises freqüentes de indicadores de dose interna numa população exposta, pode evidenciar a exposição excessiva e levar à implantação de medidas corretivas de modo a evitar o aparecimento da intoxicação.

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- O método analítico por cromatografia em fase gasosa e extração líquido-líquido para determinação simultânea dos ácidos hipúrico e metil hipúrico em urina mostrou-se simples e rápido, com linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão, exatidão e recuperação adequados para sua aplicação na biomonitorização de trabalhadores expostos ao tolueno e ao xileno.
- O emprego da coluna capilar 100% dimetilpolisiloxano permitiu a separação cromatográfica adequada dos ácidos hipúrico, metil hipúrico e heptadecanóico (PI) e posterior quantificação destes analitos.
- Não houveram perdas significativas dos analitos após três ciclos de congelamento e descongelamento.
- O hábito de fumar e de ingerir bebidas alcoólicas não provocou diferenças significativas nos níveis urinários de AH.
- Apesar de diferença estatisticamente significativa ter sido observada entre os valores médios de ácido hipúrico nos trabalhadores expostos e no grupo controle, nenhuma diferença foi encontrada quando analisou-se as medianas, medida mais adequada para distribuição não gaussiana de resultados. Talvez a ausência de diferenças significativas entre os dois grupos, assim como com relação ao uso de EPI, ingestão de bebidas alcoólicas e

hábito de fumar possam ser imputadas à baixa exposição ambiental dos trabalhadores aos solventes. Entretanto, apenas com a monitorização ambiental seria possível chegar a uma conclusão definitiva.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALESSIO, L., BERLIN, A., TOFFOLETTO, F., GHEZZI, I. Reability of urinary creatinine as a parameter used to adjust of urinary biological indicators. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlim, v.55, p.99-106, 1985.
2. ALESSIO, L. Multiple exposure to solvents in the workplace. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlim, v.69, p.1-4, 1996.
3. ALVAREZ-LEITE, E.M., SIQUEIRA, M.E.P.B., COUTO, H.A. **Guia prático monitorização biológica de trabalhadores expostos a substâncias químicas**. Belo Horizonte: Ergo, 1992. 170p.
4. ALVAREZ-LEITE, E.M., FRANÇA, L.S., MONTEIRO, R.B., CIOLETTI, A.G., BARROCA, M.M. Determination of urinary hippuric acid by gas chromatography after derivatization with trimethylphenylammonium hydroxide. **Toxicorama**, Paris, v.6, n.3, p.5-8, 1994.
5. ALVAREZ-LEITE, E.M., DUARTE, A., BARROCA, M.M., SILVEIRA, J.N. Possible effects of drinking and smoking habits on hippuric acid levels in urine of adults with no occupational toluene exposure. **J. Occup. Health**, v.41, p.112-114, 1999.
6. AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS. **Threshold limit values for chemical substances and physical agents. Biological exposures indices**. Cincinatti, ACGIH, 1998.
7. AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS. **Threshold limit values for chemical substances and physical agents. Biological exposures indices**. Cincinatti, ACGIH, 1999.

8. AMORIM, L.C. **Determinação do orto-cresol por cromatografia gasosa e comparação com os níveis de ácido hipúrico em urina de trabalhadores expostos ao tolueno.** São Paulo, 1995. 124p. (Dissertação de Mestrado -Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP).
9. ANGERER, J., KRAMER, A. Occupational chronic exposure to organic solvents XVI. Ambient and biological monitoring of workers exposed to toluene. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlim, v.69, p.91-96, 1997.
10. ANUÁRIO DA INDÚSTRIA QUÍMICA BRASILEIRA. São Paulo, ABIQUIM.1999.
11. BAEUM, J., DOSSING, M., HANSEN, S.H. Toluene metabolism during exposure to varying concentrations combined with exercise. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlim, v.59, p.281-294, 1987.
12. BAKER, L.E. A review of recent research on health effects of human occupational exposure to organic solvents. **J. Occup. Med.**, Chicago, v.10, p.1079-1092, 1994.
13. BERGET, K., NESTLER, K. Solvent uptake in relation to physical activity. **Science Total Environ.**, Amsterdam, v.101, p.111- 115, 1991.
14. BRASIL, Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho. Lei nº 6514, de 22 de dezembro de 1977, normas regulamentadoras (NR) aprovadas pela portaria nº3214 de 8 de junho de 1978. 18ed. São Paulo: Atlas, 1990. NR-15: **Atividades insalubres**, p.94-189.

15. BRASIL, Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho. Portaria nº24, de 29 de dezembro de 1994. Diário Oficial, nº 248, 30 de dezembro de 1994, Brasília, Seção 1, p.21.278 - 21.282, [NR-7 - **Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional**]
16. BROW, W.D., SETZER, J.V., DICK, R.B., PHIPPS, F.C., LOWRY, L.K. Body burden profiles of single and mixed solvents exposures. **J. Occup. Med.**, Chicago, v.29, p.877-881, 1987.
17. BRUGNONE, F., DE ROSA, E., PERBELLINI, L., BARTOLUCCI, G.B. Toluene concentrations in the blood and alveolar air of workers during the workshif and the morning after. **Br. J. Ind. Med.**, London, v.43, p.56-61, 1986.
18. BUCHET, J.P., LAUWERYS, R.R. Measurement of urinary hippuric and m-methylhippuric acids by gas chromatography. **Br. J. Ind. Med.**, London, v.30, p.125-128, 1973.
19. CAMPBELL, L., KERR WILSON, H., MARGARET SAMUEL, A., GOMPERTZ, D. Interactions of m-xylene and aspirin metabolism in man. **Br. J. Ind. Med.**, London, v.45, p.127-132, 1988.
20. CAPEROS, J.R., FERNANDEZ, J.G. Simultaneous determination of toluene and xylene metabolites in urine by gas chromatography. **Br. J. Ind. Med.**, London, v.34, p.229-233, 1977.
21. CARVALHO, D., LANCHOTE, V.L., BONATO, P.S., QUEIROZ, R.H.C., SANTOS, A.C., DREOSSI, A.C. A new derivatization procedure for analysis of hippuric acid and *m*-methyl-hippuric acid by gas chromatography. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlim, v.63, p.33-37, 1991.

22. CENTRO DE PESQUISAS E DESENVOLVIMENTO. Programa e tecnologia da Indústria Química. **Manual econômico da indústria química - MEIQ**. 5 ed. Camaçari, p.216-227, 1987.
23. CHASIN, A.A.M., CHASIN, M., SALVADORI, M.C. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Rev. Farm. Bioq. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.30, n.2, p.49-53, 1994.
24. 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.
25. CHEN, Z., LIU, S., CAI, S., YAO, Y., YIN, H., UKAI, H., UCHIDA, Y., NAKATSUKA, H., WATANABE, T., IKEDA, M. Exposure of workers to a mixture of toluene and xylenes. II effects. **Occup. Environ. Med.**, London, v.51, p.47-49, 1994.
26. CLARK, K. **Solvents in commun use: health risks to works**. Commission of the European Communities Cambridge: Published Royal Society of Chemistry, 1988. 308p,
27. COHR, K.H., STOKHOLM, J. Toluene: a toxicology review. **Scand. J. Work Environ. Health**, Helsinki, v.5, p.71-90, 1979.
28. CONOVER, W.J. **Pratical nonparametric statistics**. New York: John Wiley & Sons, 1975.

29. DE ROSA, E., BARTOLUCCI, G.B., SIGON, M., CALLEGARO, R., PERBELLINI, L., BRUGNONE, F. Hippuric acid and ortho-cresol as biological indicators of occupational exposure to toluene. **Am. J. Ind. Med.**, New York, v.11, p.529-537, 1987.
30. DELLA ROSA, H.V., SIQUEIRA, M.E.P.B., FERNÍCOLA N.A.G.G. **Monitorização biológica da exposição humana a agentes químicos**. São Paulo: Fundacentro , 1991. 67p.
31. ESCALONA, E., YANES, L., FEO, O. MAIZLISH, N. Neurobehavioral evaluation of venezuelan workers exposed to organic solvent mixtures. **Am. J. Ind. Med.**, New York, v.25, p.15-27, 1995.
32. FOO, S.C., PHOON, W.O., KHOO, N.Y. Toluene in blood after exposure to toluene. **Am. Ind. Hyg. Assoc. J.**, Akron, v.49, n.5, p.255-258, 1988.
- 33 FOO, S.C., JEYARATNAM, J., ONG, C.N., KHOO, N.Y., KOH, D., CHIA, S.E. Biological monitoring for occupational exposure to toluene. **Am. Ind. Hyg. Assoc. J.**, Akron, v.52, n.5, p.212-217, 1991.
34. FRANCO, G., FONTE, R., TEMPINI, G., CANDURA, F. Serum bile acid concentrations as a liver function test in workers occupationally exposed to organic solvents. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlim, v.58, p.157-164, 1986.
35. FRANCO, G., SANTAGOSTINO, G., LORENA, M. IMBRIANI, M. Conjugated serum bile acid concentrations in workers exposed to low doses of toluene and xylene. **Br. J. Ind. Med.**, London, v.46, p.141-142, 1989.

36. GHITTORI, S., IMBRIANI, M., PEZZAGNO, G., CAPODAGLIO, E. The urinary concentration of solvents as a biological indicator of exposure: proposal for biological equivalent exposure limit for nine solvents. **Am. Ind. Hyg. Assoc. J.**, Akron, v.48, n.9, p.786-790, 1987.
37. GREENBERG, M.M. The central nervous system and exposure to toluene: a risk characterization. **Environ. Res.**, New York, v.72, p.1-7, 1997.
38. HUANG, M., JIN, C., LIU, Y., LI, B., QU, Q., UCHIDA, Y., INOUE, O., NAKATSUKA, H., WATANABE, T., IKEDA, M. Exposure of workers to a mixture of toluene and xylenes. I metabolism. **Occup. Environ. Med.**, London, v.51, p.42-46, 1994.
39. IARC – International Agency for Research in Cancer. **Biological monitoring of exposure to benzene, toluene and xylene**. Lyon: IARC, v.47, 1988.
40. IKEDA, M., OHTSUJI, H. Significance of urinary hippuric acid determination as an index of toluene exposure. **Br. J. Ind. Med.**, London, v.26, p.244-246, 1969.
41. IKEDA, M. Complex exposures: potentials for assessing integrated exposures. **Clin. Chem.**, New York. v.40, n.7, p.1444-1447, 1994.
42. IKEDA, M. Exposure to complex mixtures: implications for biological monitoring. **Toxicol. Lett.**, Amsterdam, v.77, p.85-91, 1995.
43. INOUE, O., SEIJI, K., WATANABE, T., KASAHARA M., NAKATSUKA, H., YIN, S., LI, G., CAI, S., JIN, C., IKEDA, M. Mutual metabolic suppression between benzene and toluene in man. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlim, v.60, p.15-20, 1988.

44. INOUE, O., SEIJI, K., WATANABE, T., NAKATSUKA, H., LIU, S., IKEDA, M. Effects of smoking and drinking on excretion of hippuric acid among toluene-exposed workers. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlim, v.64, p.425-430, 1993.
45. INOUE, O., SEIJI, K., KAWAI, T., WATANABE, T., JIN, C., CAI, S., CHEN, Z., QU, Q., ZHANG, T., IKEDA, M. Excretion of methylhippuric acids in urine of workers exposed to a xylene mixture: comparison among three xylene isomers and toluene. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlim, v.64, p.533-539, 1993.
46. INOUE, O., SEIJI, K., WATANABE, T., CHEN, Z., HUANG, M., XU, X., QIAO, X., IKEDA, M. Effects of smoking and drinking habits on urinary o-cresol excretion after occupational exposure to toluene vapor among chinese workers. **Am. J. Ind. Med.**, New York, v. 25, p. 697-708, 1994.
47. INOUE, O., KANNO, E., KUDO, S., KAKIZAKI, M., KATAOKA, M., KAWAI, T., UKAI, H., IKEDA, M. High-pressure liquid chromatographic determination of toluene in urine as a marker of occupational exposure to toluene. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlim, v.71, p.302-308, 1998.
48. JANG, J., KANG, S., CHUNG, H.K. Biological exposure indices of organic solvents for Korean workers. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlim, v.65, p.S219-S222, 1993.
49. KANECO, T., WANG, P., SATO, A. Enzyme induction by ethanol consumption affects the farmacokinetics of inhaled m-xylene only at high levels of exposure. **Arch. Toxicol.**, Berlin, v.67, p.473-477, 1993.

50. KAWAI, T., MIZUNUMA, K., YASUGI, T., HORIGUCHI, S., UCHIDA, Y., IWAMI, O., IGUCHI, H., IKEDA, M. Urinary methylhippuric acid isomer levels after occupational exposure to a xylene mixture. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlim, v.63, p.69-75, 1991.
51. KAWAI, T., YASUGI, T., MIZUNUMA, K., HORIGUCHI, S., MORIOKA, I., MIYASHITA, K., UCHIDA, Y., IKEDA, M. Monitoring of workers exposed to a mixture of toluene, styrene, and methanol vapours by means of diffusive air sampling, blood analysis and urinalysis. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlim, v.63, p.429-435, 1992.
52. KAWAI, T., MIZUNUMA, K., OKADA, Y., HORIGUCHI, S., IKEDA. Toluene itself as the best urinary marker of toluene exposure. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlim, v.68, p.289-297, 1996.
53. KAWAMOTO, T., KOGA, M., OYAMA, T., KODAMA, Y. Habitual and genetic factors that affect urinary background levels of biomarkers for organic solvent exposure. **Arch. Environ. Contam. Toxicol.**, New York, v.30, p.114-120, 1996.
54. KIRA, S. Measurement by gas chromatography of urinary hippuric acid and methylhippuric acid as indices of toluene and xylene exposure. **Br. J. Ind. Med.**, London, v.34, p.305-309, 1977.
55. KURPPA, K., HUSMAN, K. Car painters' exposure to a mixture of organic solvents. **Scand. J. Work Environ. Health**, Helsinki, v.8, p.137-140, 1982.
56. LANGMAN, J.M. Xylene: its toxicity, measurement of exposure levels, absorption, metabolism and clearance. **Pathology**, Sidney, v.26, p.301-309, 1994.

57. LAUWERYS, R.R. **Industrial chemical exposure: Guidelines for biological monitoring**. Califórnia: Biomedical Publications, 1983, 150p.
58. LEITE, F. **Validação em análise química**. Campinas: Átomo, 1996. 124p.
59. LEPERA, J.S. **Avaliação da exposição ocupacional a solventes e a material particulado em procedimento de repintura automotiva**. São Paulo, 1996. 117p. (Tese de doutorado – Faculdade de Saúde Pública – USP).
60. LIIRA, J., RIIHIMÄKI, V., ENGSTRÖM, K., PFÄFFLI, P. Coexposure of man to *m*-xylene and methyl ethyl ketone. **Scand. J. Work Environ. Health**, Helsinki, v.14, p.322-327, 1988.
61. LIU, J.J.Y., BAI, C., WILLIAMSON, A.M., QU, S., HAMDAN, H., STACEY, N.H. Individual serum bile acids in apprentice spray painters in association with solvent exposure. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlim, v.69, p.21-26, 1996
62. LOF, A., JOHANSON, G. Toxicokinetics of organic solvents: a review of modifying factors. **CCR Cr. Rev.Toxicol.**, Cleveland, v.28, n.6, p.571-650, 1998.
63. LUNDBERG, I., SOLLENBERG, J. Correlation of xylene exposure and methyl hippuric acid excretion in urine among paint industry workers. **Scand. J. Work Environ. Health**, Helsink, v.12, p.149-153, 1986.

64. MAO, I.F., CHEN, M.L., LO, E.W. Simultaneous determination of urinary metabolites of toluene, xylene, styrene and ethyl benzene by solid-phase extraction technique and high-performance liquid chromatographic/photo diode array detection. **Intern. J. Environ. Anal. Chem.**, v. 64, p.1-9, 1996.
65. MONSTER, A.C., KEZIC, S., GEVEL, I., WOLFF, F.A. Evaluation of biological monitoring parameters for occupational exposure to toluene. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlim, v.65, S159-S162, 1993.
66. NASTERLACK, M., TRIEBIG, G., STELZER, O. Hepatotoxic effects of solvent exposure around permissible limits and alcohol consumption in printers over a 4-year period. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlim, v.66, p.161-165, 1994.
67. NISE, G., ORBAEK, P. Toluene in venous blood during and after work in rotogravure printing. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlim, v.60, p.31-35, 1988.
68. OGATA, M., TOMOKUNI, K., TAKATSUKA, Y. Quantitative determination in urine of hippuric acid m- or p-methylhippuric acid, metabolites of toluene and m- or p-xylene. **Br. J. Ind. Med.**, London, v.26, p.330-334, 1969.
69. OGATA, M., TOMOKUNI, K., TAKATSUKA, Y. Urinary excretion of hippuric acid and m- or p-methylhippuric acid in the urine of persons exposed to vapours of toluene and m- or p-xylene as a test of exposure. **Br. J. Ind. Med.**, London, v.27, p.43-50, 1970.

70. OGATA, M., TAKATSUKA, Y., TOMOKUNI, K. Excretion of hippuric acid and m- or p-methylhippuric acid in the urine of persons exposed to vapours of toluene and m- or p-xylene in an exposure chamber and in workshops, with specific reference to repeated exposures. **Br. J. Ind. Med.**, London, v.28, p.382-385, 1971.
71. OGATA, M., TAGUCHI, T. Simultaneous determination of urinary creatinine and metabolites of toluene, xylene, styrene, ethylbenzene and phenol by automated high performance liquid chromatography. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlim, v.61, p.131-140, 1988.
72. OGATA, M., TAGUCHI, T., HORIKE, T. Evaluation of exposure to solvents from their urinary excretions in workers coexposure to toluene, xylene, and methyl isobuthyl ketone. **Appl. Occup. Environ. Hyg.**, Cincinnati. v.10, n.11, p.913-920, 1995.
73. OLSEN, E., SEEDORFF, L. Exposure to organic solvents - I. A survey on the use of solvents. **Ann. Occup. Hyg.**, Oxford, v.34, n.4, p.371-378, 1990.
74. OLSEN, E., SEEDORFF, L. Exposure to organic solvents - II. An exposure epidemiology study. **Ann. Occup. Hyg.**, Oxford, v.34, n.4, p.379-389, 1990.
75. OLSON, B.A., GAMBERALE, F., IREGREN, A. Coexposure to toluene and p-xylene in man: central nervous functions. **Br. J. Ind. Med.**, London, v.42, p.117-122, 1985.
76. PAGNOTTO, L.D., LIEBERMAN, L.M. Urinary hippuric acid excretion as an index of toluene exposure. **Am. Ind. Hyg. Assoc. J.**, Akron, v.3, p.129-134, 1967.

77. PAIVA, M.J.N., SIQUEIRA, M.E.P.B. Valores de referência para ácido hipúrico urinário na região Sul de Minas Gerais. **Rev. Bras. Toxicol.**, São Paulo, v.12, n.2, supl, Res.N-176, 1999. (Congresso Brasileiro de Toxicologia, XI, International Congress of Toxicology, Guarujá, 1999).
78. PEZZAGNO, G., IMBRIANI, M., GHITTORI, S., CAPODAGLIO E. Urinary concentration, environmental concentration, and respiratory uptake of some solvents: effect of the work load. **Am. Ind. Hyg. Assoc. J.**, Akron, v.49, n.11, p.546-552, 1988.
79. PIERCE, C.H., DILLS, R.L., MORGAN, M.S., VICINI, P., KALMAN, D.A. Biological monitoring of controlled toluene exposure. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlim, v.71, p.433-444, 1998.
80. RIIHIMÄKI, V. Percutaneous absorption of m-xylene from a mixture of m-xylene and isobutyl alcohol in man. **Scand. J. Work Environ. Health**, Helsink, v.5, p.210-217, 1979.
81. RIIHIMÄKI, V., PFÄFFLI, P., SAVOLAINEN, K., PEKARI, K. Kinetics of m-xylene in man. General features of absorption, distribution, biotransformation and excretion in repetitive inhalation exposure. **Scand. J. Work Environ. Health**, Helsink, v.5, p.210-217, 1979.
82. RIIHIMÄKI, V., PFÄFFLI, P., SAVOLAINEN, K. Kinetics of m-xylene in man. Influence of intermittent physical exercise and changing environmental concentrations on kinetics. **Scand. J. Work Environ. Health**, Helsink, v.5, p.232-248, 1979.
83. RIIHIMÄKI, V., SAVOLAINEN, K. Human exposure to m-xylene, kinetics and acute effects on the central nervous system. **Ann. Occup. Hyg.**, Oxford, v.23, p.411-422, 1980.

84. ROOSMALEN, P.B., DRUMMOND, I. Simultaneous determination by gas chromatography of the major metabolites in urine of toluene, xylenes and styrene. **Br. J. Ind. Med.**, London, v.35, p.56-60, 1978.
85. SAITO, K., WADA, H. Behavioral approaches to toluene intoxication. **Environ. Res.**, New York, v.62, p.53-62, 1993.
86. SATO, A., NAKAJIMA, T. Differences following skin or inhalation exposure in the absorption and excretion kinetics of trichloroethylene and toluene. **Br. J. Ind. Med.**, London, v.35, p. 43-49, 1978.
87. SHAH, V.P., MIDHA, K.K., DIGHE, S., MCGILVERAY, I.J., SKELLY, J.P., YACOBI, A., LAYLOFF, T., VISWANATHAN, C.T., COOK, C.E., McDOWALL, R.D., PITTMAN, K.A., SPECTOR, S. Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. **Pharm. Res.**, Stuttgart, v.9, n.4, p.588-592, 1992.
88. SNYDER, R. & ANDREWS, L.S. Toxic effects of solvents and vapors. IN: KLAASEN, C.D., AMADUR, M.O., DOULL'S, J. (eds). **Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poisons**, 5th ed. Mc Millan Publish Company, New York, p.737-771, 1996.
89. TARDIF, R., LAPARE, S., PLAA, G.L., BRODEUR, J. Effect of simultaneous exposure to toluene and xylene on their respective biological exposure indices in humans. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlim, v.63, p.279-284, 1991.
90. TARDIF, R., LAPARE, S., KRISHNAN, K., BRODEUR, J. A descriptive and mechanistic study of the interaction between toluene and xylene in humans. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlim, v.65, p.S135-S137, 1993.

91. TRIEBIG, G., SCHALLER, K.H., WELTLE, D. Neurotoxicity of solvent mixtures in spray painters. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlim, v.64, p.352-359, 1992.
92. UKAI, H., TAKADA, S., INUI, S., IMAI, Y., KAWAI, T., SHIMBO, S., IKEDA, M. Occupational exposure to solvent mixtures: effects on health and metabolism. **Occup. Environ. Med.**, London, v.51, p.523-529, 1994.
93. WALLEN, M. Toxicokinetics of toluene in occupationally exposed volunteers. **Scand. J. Work Environ. Health**, Helsinki, v.12, p.588-593, 1986.
94. WALLEN, M., HOLM, S., NORDQVIST, B.M. Coexposure to toluene and p-xylene in man: uptake and elimination. **Br. J. Ind. Med.**, London, v.42, p.111-116, 1985.
95. WANG, G., MARANELLI, G., PERBELLINI, L., GUGLIELMI, G., BRUGNONE, F. Reference values for blood toluene in the occupationally nonexposed general population. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlim, v.65, p.201-203, 1993.

9 ANEXOS

ANEXO 1

QUESTIONÁRIO

I. DADOS SOBRE AMOSTRAGEM

Nº da amostra:

Data da coleta: ____/____/____ Hora da coleta: ____

Volume de urina coletado: _____ Densidade da urina: _____

II. INFORMAÇÕES PESSOAIS

Nome:

Idade:

Peso:

Altura:

Local de trabalho:

Área de trabalho:

Profissão:

Até que série você estudou?

III. SOBRE O SEU TRABALHO

1. Quantas horas trabalha por dia? _____
2. Quantas vezes por semana você pinta? _____
3. Quantas latas de tinta usa por semana? _____
4. Quantos galões de tiner usa por semana? _____
5. Há quanto tempo é pintor? _____
6. Tem algum outro emprego ou bico? () sim () não
Se sim, o que faz? _____
7. Qual a sua profissão anterior? _____
8. Usa equipamento de proteção? () sim () não
Se sim, qual(is)? _____

IV. HÁBITOS PESSOAIS E DIETA

1. Você é fumante? () sim () não

Quantos cigarros fuma por dia? _____

Há quantos anos fuma? _____

Fuma no local de trabalho? () sim () não

Qual o tempo entre o último cigarro e a hora da coleta da urina? _____

2. Bebida

Refrigerante () sim () não quanto por dia? _____ copos

Café () sim () não quanto por dia? _____ xícaras

Chá () sim () não quanto por dia? _____ xícaras

Cerveja () sim () não quanto por dia? _____ garrafas

Pinga () sim () não quanto por dia? _____ doses

Qual o tempo decorrido entre a última ingestão da bebida e a hora de coleta? _____

3. Dieta

Conserva em lata ou vidro () sim () não O que? _____

Suco concentrado () sim () não Qual? _____

Algum molho (tomate, pimenta) () sim () não Qual? _____

Queijo () sim () não Qual? _____

Frutas () sim () não Quais? _____

Mostarda e/ou Ketchup () sim () não

Adoçante () sim () não

Produtos dietéticos (refrigerante diet ou light, gelatina, chocolate) () sim ()

não

Qual o tempo decorrido entre sua última refeição e a hora da coleta? _____

Você poderia citar quais são os alimentos e bebidas ingeridos na sua última refeição?

V. SOBRE A SUA SAÚDE

01. Você tem dificuldades para se lembrar das coisas? () sim () não
02. Alguém da sua família já disse que você tem memória curta? () sim () não
03. Você costuma escrever coisas que deve lembrar de fazer? () sim () não
04. Você costuma voltar para conferir coisas que fez? () sim () não
05. Você tem dificuldades para entender o que está lendo? () sim () não
06. Você tem dificuldade para se concentrar em algo que está fazendo? () sim () não
07. Você fica nervoso e irritado com muita facilidade? () sim () não
08. Você fica triste ou deprimido com certa frequência? () sim () não
09. Você se cansa muito fácil, com pouco esforço físico? () sim () não
10. Você tem batadeira do coração sem fazer esforço? () sim () não
11. Você, as vezes, sente o peito sufocado? () sim () não
12. Você transpira mesmo quando não está calor? () sim () não
13. Você tem dor de cabeça ao menos uma vez por semana? () sim () não
14. Você costuma ter formigamento em alguma parte do corpo? () sim () não
15. Você tem dificuldade para abotoar e desabotoar a roupa? () sim () não
16. Você já desmaiou? () sim () não
17. Já tomou remédio para desmaio? () sim () não
18. Alguém da família tem doença nervosa, ou desmaio? () sim () não
19. Você já sofreu algum acidente com pancada na cabeça? () sim () não
20. Você está tomando algum remédio? () sim () não
Qual ? _____ Quantas vezes por dia? _____
21. Você tem algum problema de saúde? Por exemplo pressão alta, diabete, etc...
Se sim, qual é? _____
22. Você já teve hepatite, cirrose ou alguma doença do fígado? () sim () não
Se sim, qual? _____

23. Você se machuca no serviço (cortes, martelada no dedo, deixar cair ferramentas)
() raramente () às vezes () sempre se machuca
24. Você já notou alguma dificuldade para distinguir entre as cores?
amarelo e azul () sim () não
verde e vermelho () sim () não
25. Você sente algum incômodo quando está pintando?
() tontura () dor de cabeça () sua vista escurece () sente gosto ruim na boca
() arde o nariz () arde a garganta () arde os olhos () tosse
Alguma outra coisa? _____
26. Você dorme bem, acorda descansado? () sim () não
27. Você acorda durante a noite? () sim () não

ANEXO 2**TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS INFORMAÇÃO****I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL**

1. Nome: _____

Documento de identidade: nº: _____ Sexo () M () F

Data de nascimento: ____ / ____ / ____

Endereço: _____ nº ____ apto: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

Cep: _____ Telefone: _____

II - DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título da Pesquisa: "Determinação simultânea de ácido hipúrico e ácido *m*-metil hipúrico em urina de trabalhadores expostos ocupacionalmente ao tolueno e ao xileno
2. Pesquisadora: Alessandra Ferreira dos Santos
Cargo/Função: Farmacêutica Bioquímica Inscrição Conselho Regional nº 18.828
Departamento da FCF/USP: Análises Clínicas e Toxicológicas
3. Avaliação do Risco da Pesquisa: Risco Mínimo - Segundo o Conselho Nacional de Saúde, Resolução nº 01 de 13 de junho de 1988, DOU 05/01/1989, indivíduos que já sofrem exposição independentemente da pesquisa em questão, e que os riscos que sofrerão não serão diferentes das condições diárias de trabalho.
4. Duração da Pesquisa: 3 meses

III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE SOBRE A PESQUISA

Será realizada uma palestra esclarecedora para os indivíduos sujeitos à pesquisa falando sobre o objetivo deste projeto, justificativa, identificação dos procedimentos experimentais e propósitos. Esta palestra será realizada anteriormente ao preenchimento do Termo de Consentimento Pós-Informação.

Os riscos serão os mesmos que você terá nas condições diárias de trabalho.

Através deste projeto de pesquisa, será feita uma monitorização das suas condições de trabalho, bem como, se as substâncias em questão, tolueno e xileno, estão de alguma forma prejudicando o seu desempenho diário, e causando males à sua saúde.

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO**DA PESQUISA**

1. Acesso, a qualquer tempo, à informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência.
3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

V - INFORMAÇÕES REFERENTES AOS RESPONSÁVEIS PELA PESQUISA

Pesquisadora: Alessandra Ferreira dos Santos

Endereço: R. Teodoro Sampaio 1896, apto 81, Pinheiros, São Paulo - SP, Cep 05406 -150

Telefones: (011) 3818 21 97 USP

Médico do Trabalho: _____

Endereço: _____

Telefones: _____

VI - CONSENTIMENTO PÓS ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pela pesquisadora e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa.

_____, _____ de _____ de _____.

Assinatura do sujeito de pesquisa

Assinatura do pesquisador