UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-graduação em Farmácia
Área de Toxicologia e Análises Toxicológicas

**Valores de referência de acetona urinária em população do sul de
Minas Gerais**

Danielle Palma de Oliveira

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira

São Paulo

2002

Danielle Palma de Oliveira

Valores de referência de acetona urinária em população do sul de
Minas Gerais

Comissão julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira
Orientador/presidente

Profª Drª Miriam Meyer Passarelli
1º. examinador

Prof. Dr. José Salvador Lepera
2º. examinador

São Paulo, 12 de abril de 2002.

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Claiton e Edna, por toda confiança depositada em mim e pelo amor com o qual sempre me incentivaram. Agradeço à Deus por tê-los ao meu lado, principalmente nos momentos mais difíceis.

Aos meus irmãos, Gustavo e Guilherme, pelo carinho, amor e companhia que sempre pude contar.

À esta família maravilhosa agradeço de todo coração todo o esforço, renúncia e carinho que me fizeram a pessoa que sou hoje. E, reforço todo o amor que sinto por cada um de vocês.

À Profa. Dra. Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira,

pela amizade demonstrada sempre com tanta sinceridade, pelo apoio, confiança, paciência e orientação indispensáveis para esta conquista. Agradeço pela ajuda incondicional, tanto profissional quanto pessoal.

AGRADECIMENTOS

- À minha grande amiga Patrícia Penido Maia, por todas as vezes que pude contar com seu apoio, em qualquer situação.
- Aos meus amigos: Camila, Tânios, Júlia, Gabrielle, Tânia, Renata Rosa, Renata Rios, Francisco, Lucinha, Renato, Diogo, Fabio, Denise, Daniel, Elisiane e Mateus (meu afilhado), pela grande ajuda nos momentos difíceis, pelas inúmeras risadas e pela amizade sincera.
- Aos colegas do curso de pós-graduação da Universidade de São Paulo, principalmente à querida amiga Simone Valente.
- Aos amigos e funcionários do Laboratório de Análises Toxicológicas da Efoa/Ceufe.
- Aos Coordenadores do Programa de pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.
- Aos professores do departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Universidade de São Paulo.
- À Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas/Centro Universitário Federal.
- Aos funcionários do Laboratório Central de Análises Clínicas da Efoa/Ceufe.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

RESUMO

SUMMARY

1 INTRODUÇÃO.....	01
2 VALORES DE REFERÊNCIA E EXPOSIÇÃO À ACETONA E AO ISOPROPANOL.....	04
2.1 <i>Valores e referência.....</i>	04
2.2 <i>Acetona.....</i>	15
2.3 <i>Isopropanol.....</i>	29
2.4 <i>Acetona urinária como bioindicador da exposição à acetona e ao isopropanol</i>	38
3 OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO.....	42
4 MATERIAL E MÉTODO.....	44
4.1 <i>Material.....</i>	44
4.1.1 <i>Reagentes.....</i>	44
4.1.2 <i>Soluções padrão.....</i>	44
4.1.3 <i>Vidrarias, aparelhos e acessórios.....</i>	45
4.2 <i>Método.....</i>	45
4.2.1 <i>Acetona em urina na população de referência</i>	45
4.2.2 <i>Otimização da extração por headspace.....</i>	48
4.2.3 <i>Validação do método analítico para determinação de acetona urinária</i>	49
5 RESULTADOS.....	54
5.1 <i>Otimização da extração por headspace.....</i>	54
5.2 <i>Validação do método para determinação de acetona urinária.....</i>	56
5.3 <i>Acetona urinária na população de referência.....</i>	63
6 DISCUSSÃO.....	78
7 CONCLUSÕES.....	88

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
9 ANEXOS.....	101

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Tipo de vedação, áreas dos picos de acetona e coeficientes de variação	54
TABELA 2. Tempos de aquecimento dos frascos de <i>headspace</i> em estufa, áreas dos picos de acetona e coeficientes de variação.....	54
TABELA 3. Temperaturas de aquecimento do frasco de <i>headspace</i> , áreas dos picos de acetona e coeficientes de variação	55
TABELA 4. Tipo de sal, áreas dos picos de acetona e coeficientes de variação	55
TABELA 5. Volumes de urina utilizados, áreas dos picos de acetona e coeficientes de variação	56
TABELA 6. Coeficientes de variação em estudo de precisão intra e interensaio.....	60
TABELA 7. Coeficientes de variação obtidos no estudo de estabilidade da acetona em urina, congelada a -20° C, durante dez dias	62
TABELA 8. Característica da população de referência e valores de acetona urinária	64
TABELA 9. Valores de referência para a população total.....	70
TABELA 10. Valores de referência (VR) de acetona (mg/L) na população subdividida de acordo como sexo e hábito de fumar	71
TABELA 11. Valores de referência (VR) de acetona urinária em mg/g de creatinina, na população subdividida de acordo como sexo e hábito de fumar.....	71

TABELA 12. Valores de referência (VR) de acetona urinária (mg/L) na população subdividida de acordo com a idade e ingestão de bebida alcoólica	72
TABELA 13. Valores de referência (VR) de acetona urinária, mg/g de creatinina, na população subdividida de acordo com a idade e ingestão de bebida alcóolica	72
TABELA 14. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) de parâmetros bioquímicos na população avaliada e os seus respectivos valores de referência	73
TABELA 15. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) de parâmetros hematológicos na população avaliada e os seus respectivos valores de referência	74

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Vias de metabolismo da acetona	25
FIGURA 2. Biotransformação e excreção do isopropanol em mamíferos	33
FIGURA 3. Fluxograma da técnica da determinação de acetona urinária	50
FIGURA 4. Cromatograma de: (a) amostra de urina com adição de padrão interno; (b) amostra de urina fortificada com 1 mg/L de acetona e adicionada de padrão interno	57
FIGURA 5. Representação gráfica do efeito da matriz biológica na determinação de acetona	58
FIGURA 6. Curva de linearidade entre a concentração de acetona e área relativa ao n-propanol (PI) e os respectivos desvios padrão de cada ponto	59
FIGURA 7. Estabilidade da acetona em amostra de urina sem adição, mantida a temperatura ambiente e em geladeira e freezer	60
FIGURA 8. Estabilidade da acetona em amostra fortificada com 1,0 mg/L de acetona e mantida a temperatura ambiente e em geladeira e freezer	61
FIGURA 9. Estabilidade da acetona em amostra de urina fortificada com 3,0 mg/L, mantida a temperatura ambiente e em geladeira e freezer	62
FIGURA 10. Estabilidade da acetona em urina, mantida em freezer durante dez dias	63
FIGURA 11. Valores de acetona urinária (mg/L) na população de referência	75

FIGURA 12. Distribuição dos valores transformados (log acetona) na população de referência	75
FIGURA 13. Diagrama de dispersão dos valores de acetona urinária, sem correção, transformados (log acetona) na população de referência, de acordo com a idade	76

RESUMO

RESUMO

A determinação de valores de referência de alguns xenobióticos naturalmente existentes no organismo é importante na biomonitorização, para comparação de níveis encontrados na população exposta com os da população de referência. A acetona é um solvente muito popular, utilizado em vários ramos da indústria e em laboratórios químicos. O isopropanol é um solvente largamente utilizado em indústrias, laboratórios e está presente em vários produtos domésticos. Este solvente é biotransformado no organismo humano, tendo como principal metabólito a acetona. A acetona em urina (AcU) é o bioindicador mais usado para avaliar a exposição de trabalhadores expostos a acetona e ao isopropanol. Como também é encontrada em pessoas não expostas ocupacionalmente a estes solventes, o objetivo deste trabalho foi verificar os níveis basais de AcU e a possível influência de fatores individuais nestes níveis. A população de referência foi constituída por 207 indivíduos (91 homens e 116 mulheres, com idades entre 18 e 80 anos). A AcU foi determinada por *headspace/cromatografia* em fase gasosa/DIC. O método mostrou linearidade de 0,1 a 5,0 mg/L; o limite de detecção e de quantificação de 0,1 mg/L; precisão intra-ensaio, entre 4 e 5% e inter ensaio, entre 5,2 e 8,8% (urina sem adição e fortificada com 1,0 e 3,0 mg/L de acetona). Para a população total, os valores de referência encontrados foram: média ($\pm$ DP) de 1,12 ($\pm$ 0,47) mg/L; mediana de 1,04 mg/L; média geométrica de 1,03 mg/L; intervalo de confiança 95% entre 0,98-1,26 mg/L e valor superior de referência (média + 2DP) de 2,06 mg/L. Devido ao fato da distribuição dos valores de AcU (mg/L) não ser Gaussiana, optou-se por uma transformação dos valores (log AcU) que aproximou os dados da distribuição normal ($W = 0,98532$, $p < 0,7000$). A população selecionada demonstrou ser saudável e adequada ao estudo; o sexo e a ingestão de bebidas alcoólicas parecem afetar os teores de acetona urinária, enquanto a idade e o uso de tabaco não mostraram este efeito.

SUMMARY

SUMMARY

The determination of reference values of some xenobiotics is important for the biomonitoring, to compare the concentration in the exposed and the general population. The acetone is a very popular solvent, that is used in a large number of industries and laboratories. Isopropanol is used in industries, laboratories and cosmetic products. In the human body, this solvent is metabolized and the most important product is acetone. Acetone in urine (AcU) is the most used biomarker to monitor workers exposed to acetone/isopropanol. This substance is also found in non-exposed people, so, the main objective of this work was to verify the basal levels of AcU and if there are some factors that have influence on these levels. 207 volunteers were studied (91 men and 116 women, and the ages between 18-80 years). The AcU was determined by *headspace*/gas chromatography/ FID. The method showed linearity between 0.1-5.0 mg/L; limit of detection (LOD) and limit of quantification of 0.1 mg/L; intra-assay precision, between 4 and 5%; inter-assay precision, between 5.2 and 8.8% (urine without addition, and spiked 1.0 and 3.0 mg/L of acetone). In the total population, the reference values obtained were: mean ($\pm$ SD) 1.12 ($\pm$ 0.47) mg/L; median 1.04 mg/L; geometric mean 1.03 mg/L; 95% confidence range between 0.98-1.26 mg/L and upper reference value (mean + 2 SD) of 2.06 mg/L. The values distribution wasn't "normal", therefore, the transformation of the values was necessary (log AcU). Sex and alcohol intake showed significant influence on the concentration of acetone in urine. No interference was verified for smoking or the age of the volunteers.

1. INTRODUÇÃO

O uso de solventes orgânicos no meio ocupacional brasileiro apresenta significativo risco à saúde do trabalhador por ser o espectro de utilização destes compostos bastante amplo: diferentes processos industriais em pequenas, médias e grandes empresas, meio rural, laboratórios químicos, entre outros.

A acetona é um solvente muito popular utilizado em laboratórios e vários ramos da indústria como agente de extração e de limpeza (KAWAI *et al.*, 1990). Seus principais efeitos tóxicos são: irritação nos olhos, nariz e garganta; cefaléia; náuseas; vertigem; incoordenação; depressão do sistema nervoso central; narcose e, em doses extremamente altas, falência cardio-respiratória (DICK *et al.*, 1989). Para os humanos, a acetona é um constituinte endógeno, metabólito de ácidos graxos e carboidratos, mas que em níveis elevados pode ser tóxica para o sistema nervoso central (KUMAGAI *et al.*, 1998).

O isopropanol é um solvente largamente utilizado em laboratórios. Tem uso industrial e também está disponível em vários produtos domésticos. Este álcool é biotransformado no organismo humano, sendo seu principal metabólito a acetona (ZAHLEN *et al.*, 1985).

Os efeitos sistêmicos nos humanos devidos à ingestão ou inalação do isopropanol são: diminuição do pulso e da pressão sanguínea, anestesia, narcose, cefaléia, depressão mental, alucinação, percepção distorcida, dispnéia, depressão respiratória, náuseas, vômitos e coma, dependendo do grau de exposição (GHITTORI *et al.*, 1996).

O principal objetivo da Toxicologia Ocupacional é a prevenção de alterações da saúde dos trabalhadores expostos às substâncias químicas. A presença de

substâncias potencialmente tóxicas no ambiente de trabalho impõe que a exposição seja avaliada sistematicamente.

A prevenção de danos à saúde destes trabalhadores somente pode ser alcançada se as condições de exposição ou práticas de trabalho forem definidas para que não apresentem risco inaceitável para a saúde. As medidas preventivas destinadas a esse fim são conhecidas como procedimentos de monitorização, ambiental e biológica (DELLA ROSA *et al.*, 1996, KUCERA *et al.*, 1995; LAUWERYS *et al.*, 1996; ONG, 1999).

Para que a monitorização biológica seja implantada é necessária a definição de alguns parâmetros, entre eles, os limites biológicos de exposição do bioindicador e, quando este aparece em material biológico da população em geral, de seus valores de referência (VR) (DELLA ROSA *et al.*, 1996).

Quando as concentrações dos bioindicadores estão abaixo do IBMP supõe-se que a maioria dos trabalhadores está exposta a quantidades não nocivas de substâncias químicas. Os valores de referência são importantes na avaliação da exposição ocupacional a substâncias químicas às quais os trabalhadores se expõem através de outras fontes, não relacionadas ao ambiente de trabalho (AITIO, 1994; ALESSIO, 1993; APOSTOLI, 1994; BERLIN, 1982). Esta avaliação faz-se cada vez mais necessária, pois as diferenças quantitativas entre exposição ocupacional e a ambiental estão progressivamente sendo reduzidas (APOSTOLI, 1994; APOSTOLI, 1995; BURATTI, 1978).

O grau e o tipo de poluição ambiental sofrem extensa variação de um país e/ou região para a outra, o que afeta especialmente a contaminação maior ou menor do alimento, da água e do ar com o xenobiótico, tornando obrigatório o estabelecimento dos valores de referência por regiões que apresentam estas

características semelhantes (ALESSIO, 1993; APOSTOLI, 1994; DYBAER, 1983; ODONE *et al.*, 1988)

Portanto, é de interesse definir os valores de referência da acetona urinária, bioindicador preconizado para a exposição ocupacional à acetona e ao isopropanol, e avaliar os fatores que podem alterar seus níveis, considerando a falta de estudos neste aspecto.

2. VALORES DE REFERÊNCIA E EXPOSIÇÃO À ACETONA E AO ISOPROPANOL

2.1 VALORES DE REFERÊNCIA

Valores de referência de bioindicadores são valores do xenobiótico ou de seu metabólito ou qualquer parâmetro bioquímico relacionado à exposição ao toxicante detectados em indivíduos não expostos ocupacionalmente aos mesmos (AITIO, 1994; ALESSIO, 1993; APOSTOLI, 1994; BERLIN, 1982).

Os valores de referência são quesitos indispensáveis à monitorização biológica de alguns xenobióticos. O nível de um indicador biológico nos indivíduos expostos que permite o estabelecimento de estratégias de controle, deve ser confrontado com o nível deste mesmo indicador determinado em uma população cuja característica principal é a de não estar exposta, por motivo profissional ou por situação particular ambiental, à substância química considerada (DELLA ROSA *et al.*, 1996; DYBAER, 1983; ODONE *et al.*, 1988). Por outro lado, podem fornecer base científica para pesquisas biomédicas de doenças causadas pelos respectivos agentes tóxicos (KUCERA *et al.*, 1995; MINOIA *et al.*, 1990; POULSEN *et al.*, 1987).

Em análises clínicas os termos *valor normal* ou *limite de normalidade* foram muito utilizados. Em monitorização biológica, são usuais os termos: limite de referência e valor de referência (ODONE *et al.*, 1988). A *International Federation of Clinical Chemists* (IFCC) tem recomendado uma série de definições para prevenir confusão devido ao uso destes termos (KUCERA *et al.*, 1995; ODONE *et al.*, 1988):

♦ valor de referência: é o resultado da medida da concentração de uma substância química em uma amostra biológica de um indivíduo da população de referência.

♦ intervalo de referência: intervalo que contém a maioria dos valores de referência da população.

Tradicionalmente, valores de referência de indivíduos supostamente saudáveis têm sido amplamente utilizados em laboratórios clínicos. Frequentemente, o limite entre saúde e doença é confuso, especialmente em relação à idade (PETITCLERE & WILDING, 1984). Os intervalos de referência têm sido utilizados para: diferenciar uma pessoa saudável de uma doente; ajudar a determinar a causa específica de uma enfermidade; acompanhar um paciente e a evolução da doença; monitorar o uso de medicamentos (ODONE *et al.*, 1988).

Nos últimos tempos, a definição dos critérios de proteção à saúde tem por base o risco da exposição a baixos níveis. Para a determinação desse risco é necessário conhecer os níveis das substâncias químicas no organismo humano e a definição dos valores de referência. Todavia, a maioria dos dados encontrados na literatura sobre concentrações de substâncias no organismo humano denota que estas são muito próximas às de impacto toxicológico (MINOIA, *et al.*, 1990; ODONE *et al.*, 1988).

No Brasil foi iniciada a obtenção de uma base de dados para os valores de referência. Neste sentido, esforços têm sido empreendidos, notando – se a inserção deste tema nos últimos eventos científicos relacionados com a Saúde do Trabalhador e de Toxicologia.

O interesse pela saúde no ambiente de trabalho é universal e os princípios da Saúde Ocupacional devem ser os mesmos para todos os países e regiões. Porém,

freqüentemente, existe uma grande variedade de práticas ocupacionais e problemas dentro de uma região ou entre países. A adoção de valores de referência deve ser baseada em diferentes critérios. A aplicação direta desses valores não é adequada, pois podem não ser os mesmos para os diversos grupos da população exposta (ONG, 1999).

A seleção de um grupo de referência apresenta dificuldades de organização e custo. Por este motivo, recorre-se comumente a valores publicados na literatura e corre-se o risco de utilizar dados de populações com características diversas (DELLA ROSA *et al.*, 1996; ODONE *et al.*, 1988).

Na determinação dos valores de referência deve-se ter cuidado especial na seleção da população, levando-se em consideração critérios de seleção, estratificação e exclusão (BARTOLUCCI *et al.*, 1995).

Para a seleção da população de referência é importante diversificar as características, coletando amostra de diferentes grupos, com idades, sexo, hábitos de vida e atividades profissionais distintas. Crianças não devem participar da seleção, pois constituem um grupo com características muito particulares (BARTOLUCCI *et al.*, 1995).

É importante determinar o número de indivíduos que irão constituir a população de referência, o n . Este número depende da finalidade requerida e deve ser tanto maior quanto maior for a variabilidade do indicador biológico na população em geral (KUCERA *et al.*, 1995; ODONE *et al.*, 1988). O n deve ser de no mínimo 120 (cento e vinte) indivíduos, para avaliar adequadamente a população não exposta ocupacionalmente de uma região (BEZENER *et al.*, 1983; BURATTI, 1978; ODONE *et al.*, 1988; POULSEN *et al.*, 1987).

A população de referência deve apresentar número aproximadamente igual de homens e mulheres e de diferentes faixas etárias, a partir de 18 anos, sendo recomendado ao menos 50 (cinquenta) para cada critério de estratificação da amostra (POULSEN *et al.*, 1987).

Um grupo de referência é caracterizado pela diversidade de fatores que exercem influência sobre o indicador estudado. Assim, deve-se levar em consideração a idade, sexo, raça e herança genética (DELLA ROSA *et al.*, 1996; DYBKAER, 1983; KUCERA *et al.*, 1995; ODONE *et al.*, 1988; ONG, 1999).

Outros fatores devem ser determinados como hábito de fumar, ingestão de bebidas alcoólicas e medicamentos, obesidade entre outros, além de fatores patológicos (APOSTOLI, 1999; MINOIA *et al.*, 1990):

- **Fatores genéticos:** cuidados especiais devem ser tomados quando se selecionam valores de referência provenientes de diferentes regiões, pois esses valores são baseados em uma população de diferentes grupos étnicos. As diferenças bioquímicas e imunológicas podem ser completamente diferentes.
- **Fatores ambientais:** geralmente a exposição extraprofissional a uma substância advém da alimentação e da poluição ambiental. Um outro elemento ambiental importante quando se considera um grupo de referência é a condição sócio- econômica do grupo, que expressa as condições de vida e higiene.
- **Fatores religiosos, sociais e culturais:** a diversidade pode afetar o perfil dos valores de referência para monitorização biológica. Por exemplo, trabalhadores muçulmanos fazem jejum

durante o período do “Ramadan”. Esta prática pode alterar a biotransformação de alguns agentes químicos.

- **Fatores fisiológicos:** alguns indicadores biológicos são dependentes do acúmulo do agente tóxico no organismo com o tempo. Neste caso, parece evidente a influência que a idade e o sexo do grupo de referência podem exercer sobre o nível dos valores observados. Deve-se considerar hábitos de vida, em particular o consumo de tabaco e bebidas alcoólicas, no nível do indicador.
- **Estado nutricional e patológico:** O estabelecimento de um valor representativo para toda população é praticamente impossível, devido às variações na saúde e no estado nutricional das diferentes populações e, conseqüentemente, na susceptibilidade aos efeitos nocivos advindos do ambiente de trabalho. Além disso, doenças infecciosas e parasíticas podem reduzir a resistência imunológica. Esse estado tem implicações na interpretação de resultados, visto que nesses casos pode ocorrer uma intoxicação com doses mais baixas do xenobiótico. Insuficiência hepática ou hepatites podem alterar a biotransformação de agentes químicos e doenças renais podem interferir na eliminação dos mesmos. O consumo de um determinado fármaco, associado a uma patologia particular, pode interferir com o indicador. Portanto, é oportuno excluir do grupo de referência, indivíduos com tratamento terapêutico em curso.
- **Condições climáticas:** deve-se considerar o grande aumento na frequência respiratória a partir de atividades físicas intensas e trabalho em temperaturas elevadas. Por outro lado, climas

quentes aumentam a velocidade de absorção dérmica de vários xenobióticos.

Um questionário pode ser utilizado para fornecer detalhes sobre idade, sexo, área de residência, ocupação profissional, uso de tabaco, peso corporal, hábitos alimentares, fatores sócio-econômicos e sociais e existência de fontes poluidoras próximas ao local de residência ou trabalho (DELLA ROSA *et al.*, 1996; MINOIA *et al.*, 1990).

Além desses fatores deve-se padronizar outras medidas (PETITCLERE & WILDING, 1984), como:

- horário de coleta;
- procedimentos de coleta e tratamento das amostras;
- método analítico e controle de qualidade dos procedimentos.

Voluntários que possuem características que possam influenciar na excreção do analito avaliado para VR, devem ser excluídos da seleção. Para determinação adequada dos valores de referência é necessário utilizar uma população saudável. A identificação de possíveis anomalias fisiológicas ou patologias pode ser feita através de exames bioquímicos e hematológicos dos voluntários (DELLA ROSA *et al.*, 1996; MINOIA *et al.*, 1990). Algumas patologias podem influenciar na toxicocinética e toxicodinâmica de muitas substâncias, dessa forma é essencial excluir da seleção pessoas portadoras de patologias, principalmente as que alterem o nível do bioindicador. Outro critério de exclusão é a exposição ao xenobiótico em questão ou à outra substância que possa interferir na toxicocinética do bioindicador (BARTOLUCCI *et al.*, 1995).

No laboratório existem muitas fontes indefinidas de variação, além das causadas por temperatura, técnica, validade dos reagentes e característica dos pacientes que vão alterar a média e o desvio padrão. Um pequeno coeficiente de

variação indica que as determinações estão bem controladas, e um coeficiente alto sugere a necessidade de um número maior de amostras (ODONE *et al.*, 1988).

A variabilidade analítica do método precisa estar dentro dos limites aceitáveis. Resultados fidedignos requerem padronização do método, programas internos de qualidade, validação através do estudo de sua precisão, sensibilidade, limites de detecção e de quantificação, linearidade e exatidão (BURATTI, 1978; KAWAI *et al.*, 1990; HRADECKY & JAGOS 1978; PETITCLERE & WILDING, 1984).

Em análises de biomonitorização o estudo destas condições é imprescindível, uma vez que quase sempre se trabalha com valores muito baixos do analito, próximos ao limite de detecção, onde os erros são significativos (ODONE *et al.*, 1988).

A maioria dos métodos disponíveis para a monitorização biológica tem por base a determinação do agente químico ou de seu metabólito no ar alveolar, sangue ou urina. Muitos fatores influenciam na escolha da matriz; porém, a urina é o material mais utilizado (ODONE *et al.*, 1988; ONG, 1999).

Antes de se implantar um programa de monitorização biológica deve-se considerar alguns pontos:

- o biomarcador deve ser suficientemente específico, ter adequada sensibilidade e deve ter boa correlação com a intensidade da exposição;
- o método para a coleta da amostra deve ser eticamente aceitável, causando o menor desconforto possível ao trabalhador.

A seleção de biomarcadores pode ter importância crucial não somente na determinação da concentração média do xenobiótico, mas também na saúde dos trabalhadores que estão sendo monitorizados.

Assim, a correta determinação dos VR é operação complexa que exige um delineamento experimental bem conduzido, desde a fase de seleção da população, preparo de questionário validado, coleta das amostras biológicas obedecendo a critérios de ética, até a fase de análise estatística apropriada dos resultados obtidos. A sua execução apresenta problemas de organização, requer estrutura adequada, equipe multiprofissional e é de custo elevado (APOSTOLI, 1994; MINOIA *et al.*, 1990; ODONE *et al.*, 1988). Além disso, o estudo deve ser refeito periodicamente, uma vez que as condições de contaminação ambiental variam com o tempo (DELLA ROSA *et al.*, 1996).

Após determinar a concentração do analito, o próximo passo é definir se o valor encontrado é "normal" ou "anormal". O ideal seria que os valores de uma pessoa sã fossem bem diferentes dos valores encontrados em uma pessoa doente. Porém esse modelo ideal é incomum. Em muitas situações os valores normais se sobrepõem ao valor anormal. Dessa forma torna-se necessário discutir o significado da palavra **normal**. Esta terminologia tem diferentes significados (APOSTOLI 1995; DYBKAER, 1983; NORDBERG *et al.*, 1992; ODONE *et al.*, 1988):

- distingue uma pessoa sadia de uma anormal ou doente;
- normal significa usual. Muitos diriam que os norte americanos, em geral, têm elevados níveis de colesterol sérico. Este valor pode ser considerado usual, mas não significa necessariamente boa saúde;
- outra definição para a palavra normal é uma série de resultados para um teste de laboratório, que adota o mesmo comportamento estatístico, denominada de distribuição Gaussiana. Esta distribuição

simétrica nem sempre ocorre em provas de laboratório, por isso não se deve aplicar o termo “normal” para uma série de valores.

Para a maior parte dos fins, quando a bibliografia sugere que os valores se distribuem de forma Gaussiana, cerca de quarenta determinações representativas são suficientes para se diferenciar “normais” de “anormais”; porém, este número não produz valores adequados para um intervalo de referência. Evidentemente um número maior de amostras determina um intervalo de referência mais confiável (ODONE *et al.*, 1988).

A expressão dos VR se faz de maneiras diferentes, de acordo com a finalidade de seu uso e o país ou entidade que os gerou. Assim, são geralmente expressos em *valores médios, intervalo de confiança 95 ou 99%, valor superior de referência* (que tem maior valor prático para médicos e higienistas). Estes valores são usados para comparação individual de resultados obtidos na monitorização biológica (ODONE *et al.*, 1988).

Nos últimos anos, a monitorização biológica tem sido também utilizada para avaliar a exposição de um grupo de trabalhadores, preferencialmente à avaliação individual. Para caracterizar esta exposição, é recomendado o uso da distribuição dos valores de referência (por técnicas estatísticas determinadas) que seria comparada com a distribuição dos valores encontrados no grupo ocupacionalmente exposto (DELLA ROSA *et al.*, 1996).

Após definir os valores da população geral, é necessário verificar se há diferença entre os subgrupos de acordo com o sexo, faixa etária, entre outros fatores. Quando há um número reduzido de voluntários é difícil determinar essas diferenças. Portanto, em um grupo maior, tal como duzentas determinações ou mais, é mais provável que se tenha diferenças estatísticas entre os subgrupos (ODONE *et al.*, 1988).

Os valores e intervalos de referência devem fornecer uma adequada descrição da população. Para tanto se deve utilizar alguns parâmetros (KUCERA *et al.*, 1995):

- Resultados de testes estatísticos para distribuição normal de valores de referência. Através da simples plotagem dos dados em um sistema cartesiano pode-se verificar a tendência de normalidade dos dados e testes estatísticos como o *Shapiro-Wilk* são utilizados para confirmação (DUCA, 1992). Como a distribuição é freqüentemente inclinada, a transformação dos valores de referência é necessária (por exemplo, transformação logarítmica) na obtenção de uma distribuição normal, o que possibilita a utilização de um teste paramétrico na comparação de médias (DUCA, 1992; DYBKAER, 1983; KUCERA *et al.*, 1995). Vale ressaltar que qualquer forma de transformação pode ser empregada para aproximar os valores da distribuição Gaussiana e a escolha da melhor forma de transformação depende somente da observação dos valores obtidos (DUCA, 1992; POULSEN *et al.*, 1987).
- Média e mediana como medidas de tendência central. Pode-se utilizar a média $\pm$ desvio padrão ou intervalo de 95% de confiança, baseado em pelo menos cento e vinte (120) determinações (KUCERA *et al.*, 1995).
- Um outro modo de expressar os valores de referência consiste em avaliar o valor limite ou valor superior de referência, o qual é dado por média + 2 desvios padrão para uma população normal (Gaussiana) ou como intervalo 95% de confiança para qualquer tipo de distribuição (KUCERA *et al.*, 1995).

Como norma geral, se todos os trabalhadores do grupo exposto tiverem valores de biomarcadores superiores a metade do valor superior de referência, este grupo, provavelmente, foi exposto ocupacionalmente (DELLA ROSA *et al.*, 1996).

2.2 ACETONA

Propriedades físico-químicas

Nome químico: acetona

Sinônimos: dimetil cetona; 2-propanona; beta-cetopropano

Fórmula química: C_3H_6O

Estrutura química:

A acetona é um líquido transparente, muito volátil, com um odor peculiar, aromático e não residual. É considerada extremamente inflamável.

É miscível com água e outros solventes orgânicos como éter, metanol, etanol e ésteres. As propriedades físicas da acetona, tais como: alto índice de evaporação, baixa viscosidade e miscibilidade, tornam esta substância um bom solvente (ENCYCLOPEDIA, 1991; KRASAVAGE *et al.*, 1982).

As propriedades físicas da acetona são (ENCYCLOPEDIA, 1991; KRASAVAGE *et al.*, 1982; LEWIS, 1997; NIOSH/OSHA, 1988; SIFNIADES, 1985):

- peso molecular relativo: 58,08;
- cor: límpida e transparente;
- estado físico: líquido;
- ponto de fusão: $-94,6\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- ponto de congelamento: $-94,7^{\circ}\text{C}$ a 1 atm;
- ponto de ebulição: $56,2^{\circ}\text{C}$ a 1 atm;
- densidade: a 20°C a 1 atm: 0,78998 g/ml,
a 25°C a 1 atm: 0,78440 g/ml,
a 30°C a 1 atm: 0,78033 g/ml;

- viscosidade a 20°C: 0,32 mPa;
- coeficientes de partição:
 - $\log K_{ow}$: -0,24,
 - $\log K_{oc}$: 0,73;
- pressão de vapor: 24 kPa a 20°C.

A acetona mostra reação típica com cetonas saturadas. Essas reações incluem adição, óxido-redução e condensação. A reatividade química da acetona é comercialmente importante para a síntese de metil metacrilato, álcool diacetônico, bifenol A e outros compostos (ENCYCLOPEDIA, 1991).

Os fatores de conversão (25°C) são:

$$1 \text{ ppm} = 2,374 \text{ mg/m}^3$$

$$1 \text{ mg/m}^3 = 0,421 \text{ ppm}$$

Usos e fontes de exposição

Como solvente a acetona é utilizada em:

- tintas, vernizes, tineres, tintas de impressão e adesivos e produtos de limpeza. O maior uso da acetona é como solvente de superfície, principalmente no revestimento de superfície automotiva (ENCYCLOPEDIA, 1991; KRASAVAGE *et al.*, 1982; SATOH *et al.*, 1995);
- extrator de gorduras e óleos no processamento de alimentos e agente precipitante na purificação de açúcar e amido (WANG *et al.*, 1994; WIGAEUS *et al.*, 1981);
- aplicações farmacêuticas incluem uso como intermediário e solvente de fármacos, vitaminas e cosméticos (ENCYCLOPEDIA, 1991).

As indústrias que utilizam acetona incluem: fábricas de fibras de plástico reforçadas e de sapatos; fábricas de explosivos, látex e vernizes, de borracha; indústrias químicas (como solvente e como intermediário); indústrias de tingimento, couro e seda artificial; na produção de óleos lubrificantes. É utilizada em cilindros de gás para estocar acetileno com segurança (ENCYCLOPEDIA, 1991; KAWAI *et al.*, 1990; KRASAVAGE *et al.*, 1982).

Devido ao alto nível de exposição, trabalhadores de indústrias que utilizam acetona em algum processo de manufatura são parte de uma população de risco de intoxicação; entre esses se incluem os que trabalham na fabricação de tintas, plástico, indústrias de fibras artificiais, fabricação de sapatos, pintores profissionais e faxineiros comerciais e domésticos. O conteúdo de acetona de certos removedores de esmalte é elevado; assim, usuários frequentes destes removedores, como manicures, estão expostos a concentrações de acetona maiores que a população em geral. Pessoas que moram próximo a fontes industriais de emissão (como refinarias, incineradores, locais com alto nível de tráfego de veículos automotores) estão também expostas a altas concentrações de acetona (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

A *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH) preconiza 500 ppm de acetona como TWA e 750 ppm como STEL (ACGIH, 2001).

A acetona ocorre como componente de metabolismo normal no sangue, urina e ar exalado nos seres humanos. Devido ao fato da formação endógena de acetona estar intimamente ligada à utilização de gorduras estocadas como fonte de energia, os níveis endógenos podem variar dependendo da saúde, nutrição e nível de atividade individual (FUJINO *et al.*, 1992; KAWAI *et al.*, 1990; KRASAVAGE *et al.*, 1982; WANG *et al.*, 1994; WIGAEUS *et al.*, 1981).

Além disso, a acetona, entre outros produtos carbonados, resulta da reação degenerativa devido à lipoperoxidação (BAGCHI *et al.*, 1992; DeZWART *et al.*, 1997).

As fontes humanas de emissão no ambiente aquático incluem despejo de esgoto e lixiviação de indústrias. A principal fonte de emissão de acetona para o ar é a evaporação do solvente de produtos de revestimento tais como tintas, vernizes e tintas de impressão (LIPARI *et al.*, 1984). É emitida a partir de automóveis e turbinas (JONSSON *et al.*, 1985; ZERVAS *et al.*, 2001).

Outras importantes fontes antropogênicas de acetona são as indústrias químicas, a fumaça de cigarro (42µg/40 mL de fumaça) (MANNING *et al.*, 1983), a queima de madeira e fibra (LIPARI *et al.*, 1984), a queima de polietileno, resíduo de combustão e a produção de petróleo (EGLE, 1973; LIPARI *et al.*, 1984).

A acetona é formada na atmosfera a partir da oxidação fotoquímica do propano e possivelmente do óxido de propileno e epícloroedrin (HENDERSON, *et al.*, 1989; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

Em 1994, a produção de acetona mundial era próxima a 3,83 milhões de toneladas. Como aproximadamente 80% da acetona é produzida como um co-produto do fenol, a demanda deste produto influencia grandemente os níveis de acetona. Esperava-se que a demanda de acetona crescesse em uma média anual de 3,3% de 1994 a 1999 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998). Atualmente, no Brasil, a capacidade de produção de acetona é de 84.000 t/ano, sendo que a principal matéria-prima é o cumeno (ANUÁRIO, 2000-2001).

A maioria da acetona é manufaturada por um dos seguintes processos: peroxidação do cumeno (94% de rendimento), desidrogenação do isopropanol (95% de rendimento), destilação destrutiva da madeira, destilação de acetato de

cálcio. No processo de peroxidação, o cumeno é oxidado a hidroperóxido, o qual é clivado originando acetona e fenol. No processo de desidrogenação, o isopropanol é cataliticamente desidrogenado produzindo acetona e hidrogênio (ENCYCLOPEDIA, 1991; KRASAVAGE *et al.*, 1982). A fermentação de amido de milho e melaço para produzir acetona, usando *Clostridium acetobutylicum*, é utilizada em muitos países incluindo o Brasil, Rússia, Egito e Índia (SIFNIADES, 1985).

Este composto é comumente encontrado como contaminante volátil. É um dos intermediários de maior vida produzida na oxidação leve de hidrocarbonetos não-metano (HENDERSON *et al.*, 1989).

GROSJEAN *et al.*, (1990) coletaram amostras em três grandes áreas urbanas no Brasil – São Paulo, Rio de Janeiro e Salvador – com populações variando de 2 a 13 milhões de pessoas. Em São Paulo, os níveis de acetona variaram entre 0,5-7,0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0,2-3,0 ppb), no Rio de Janeiro 1,2-9,0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0,5-3,8 ppb) e em Salvador 0-49,9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (0-21 ppb). Os dados são de áreas urbanas, rurais e outras, e os valores dependem do local onde a amostragem foi feita, da época do ano e da técnica de amostragem.

Em 1975, o Brasil iniciou um programa nacional de produção de etanol a partir da cana-de-açúcar, e em 1988, quando essas amostras foram coletadas, aproximadamente um terço dos veículos em uso eram movidos a etanol. Formaldeído, acetaldeído e acetona foram os três compostos carbônicos mais prevalentes, mas seus níveis foram próximos aos encontrados em outras partes do mundo (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

SHAH & SINGH (1988), reportaram uma concentração de 19 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (8ppb) em ambientes domésticos. Esses autores compilaram dados e calcularam a concentração nestes ambientes em média de 16,4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (6,9 ppb). Outros

pesquisadores relataram resultados similares, detectando níveis de acetona entre 37-41 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ (~ 15-17 ppb). Partículas de madeira de baixa densidade utilizadas na construção de casas nos EUA e produtos domésticos foram considerados as principais fontes.

A acetona tem sido qualitativamente detectada na água destinada ao consumo, em várias cidades dos EUA. A água é contaminada com acetona através do despejo de efluentes provenientes de indústrias de couro, refinamento de petróleo, metais não ferrosos, tintas, publicidade e impressão, plástico, produtos químicos inorgânicos, fibras têxteis, papel, borracha, praguicidas, fotográfica, farmacêutica, porcelana, produtos mecânicos e equipamentos de transporte. A maior concentração de acetona em efluentes foi proveniente de indústrias de tintas (ENCYCLOPEDIA, 1991).

Existem poucos dados sobre o nível de acetona no solo e sedimento. Devido à alta solubilidade em água e baixo coeficiente de adsorção pelo sedimento, a acetona é predominantemente encontrada na água. No solo é encontrada, sobretudo em locais próximos a aterros industriais (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

A acetona tem sido qualitativamente detectada em alguns tipos de queijo (DAY & ANDERSON, 1965), e em batatas (COLEMAN & CHENG, 1981). É encontrada em outros alimentos: músculo de peito de frango, nectarinas, alguns grãos (feijão, soja, lentilhas, ervilhas), cebola, uvas, couve-flor, tomate, mostarda, ipoméia e leite (LOVEGREN *et al.*, 1979; PALO & ILKOVÁ, 1970; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998). A acetona ocorre naturalmente como um produto de biodegradação de esgotos, lixos sólidos e álcoois e como produto de oxidação de substâncias húmicas. A emissão natural de vapor de acetona por algumas árvores (ISIDOROV *et al.*, 1985) assim como a partir de águas dos oceanos foi relatada (ZHOU & MOPPER, 1990).

Toxicocinética

A intensidade da exposição aos solventes orgânicos é influenciada, sobremaneira, por suas propriedades físico-químicas. Algumas destas características, tais como lipossolubilidade, coeficiente de partição óleo/água e grau de ionização, influenciam também a fase de toxicodinâmica. Outras características dos solventes que apresentam papel importante na fase de exposição são: pressão de vapor, ponto de ebulição, gravidade específica, velocidade de evaporação e densidade de vapor (FISEROVA-BERGEROVA *et al.*, 1974; LEITE, 1996).

Quanto maior o coeficiente de partição sangue/ar maior solubilidade do solvente no sangue em relação a concentração no ar. O fluxo sangüíneo para o fígado e a razão de biotransformação são importantes para a redução da concentração do solvente dissolvido no sangue (ASTRAND, 1985; FISEROVA-BERGEROVA *et al.*, 1974; PERBELLINI & GHITTORI, 1998).

Do ponto de vista ocupacional, uma das principais vias de introdução dos solventes orgânicos é a pulmonar. Esses solventes ao se volatilizarem podem ser inalados pelos trabalhadores expostos e, conseqüentemente, atingir os alvéolos pulmonares.

A solubilidade dos solventes tem grande importância na absorção pelos pulmões e na acumulação no organismo durante a exposição. Outros fatores, todavia, são também importantes, incluindo ventilação pulmonar e circulação sangüínea, os quais influenciam a razão de transporte aos pulmões e a partir destes para outros tecidos. O nível de atividade física deve também ser considerada juntamente com esses fatores. Exercícios físicos aumentam a ventilação pulmonar e, assim, aumentam a concentração de solventes disponível

aos pulmões (ASTRAND, 1985; FISEROVA-BERGEROVA *et al.*, 1974; PERBELLINI & GHITTORI, 1998).

A acetona é rapidamente absorvida nos alvéolos. Depois dos primeiros quinze minutos de exposição, aproximadamente 75-80% do vapor aspirado é absorvido e os 20-25% do vapor restante é eliminado pela respiração (DIVINCENZO *et al.*, 1973, JOHANSON, 1991; SATOH *et al.*, 1995).

O coeficiente de partição óleo/ar relativamente alto para a maioria dos hidrocarbonetos aromáticos facilita a passagem através da dupla camada de células, epitelial e endotelial, que separam o alvéolo dos capilares. A afinidade da acetona por lipídeos é muito menor, o que afeta a passagem da acetona através da membrana. Quase toda substância altamente solúvel no sangue passa para a corrente sangüínea, até o equilíbrio e/ou até a permeabilidade da membrana não permitir mais sua entrada (PEZZAGNO *et al.*, 1988; WIGAEUS *et al.*, 1981). Quando solventes muito hidrossolúveis (como a acetona) são inspirados, parte do vapor será dissolvido na saliva e na água no epitélio respiratório e é então liberada durante a expiração (ASTRAND, 1985). Conseqüentemente, a concentração no ar expirado será maior que no ar alveolar (KUMAGAI & MATSUNAGA, 1995).

A absorção de acetona pelos alvéolos continua até que sua concentração no sangue venoso seja igual a do sangue arterial (ASTRAND, 1985; JOHANSON, 1991).

Ocorre absorção dérmica de acetona em humanos. Estudos mostraram que a exposição por via respiratória de acetona durante duas horas a 250-500 ppm, equivale à exposição dérmica durante quatro horas nas mesmas concentrações (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

Em estudos com voluntários conduzidos por HAGGARD *et al.* (1994), foi verificada absorção da acetona por via gastrintestinal, avaliada pela quantidade e velocidade de biotransformação e excreção do solvente nos expostos.

Devido ao seu baixo peso molecular e miscibilidade com água, a acetona é absorvida e bem distribuída por tecidos não adiposos do organismo humano. Variáveis como dieta, exercícios e consumo de álcool afetam a cinética da acetona (ASTRAND, 1985; HALLIER *et al.*, 1981; PEZZAGNO *et al.*, 1986; WIGAEUS *et al.*, 1981).

A absorção se faz em razão relativamente constante pelos pulmões até o equilíbrio entre os compartimentos do organismo. Existem poucos estudos sobre a distribuição de acetona. O coeficiente de partição tecido-sangue para músculos, rins, pulmões e cérebro varia entre 0,74 a 0,82; indicando quase completa distribuição pelos tecidos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

WIGAEUS *et al.*, (1981) descobriram que aproximadamente 79% da acetona absorvida é biotransformada, cerca de 20% é excretada de forma inalterada no ar exalado e cerca de 1% na urina. A meia-vida da acetona no ar alveolar é de aproximadamente 4 horas; no sangue venoso e arterial é de 4 e 6 horas respectivamente. A concentração mais alta na urina ocorre 3 a 3,5 horas após a exposição. A acetona endógena é em média 0,13 mg/100mL no sangue e 1,4 mg/L em urina (CUNNINGHAM *et al.*, 1989; JONES, 2000; LAUWERYS, 1980; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

O metabolismo da acetona envolve pelo menos três vias gliconeogênicas, com incorporação final de átomos de carbono à glicose e outros produtos e substratos do metabolismo intermediário com geração de dióxido de carbono (Figura1). A acetona é um dos três corpos cetônicos produzidos pela acetil coenzima A, no fígado, sendo a via de metabolismo similar em humanos e animais

(JONES & ANDERSSON, 1995; JONES, 2000; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

Inicialmente ocorre oxidação (hidroxilação do grupo metila) a acetol pela acetona monooxigenase, uma atividade relacionada ao citocromo P450IEII, com exigência de oxigênio e NADPH (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998). O acetol é então metabolizado por pelo menos três vias diferentes: na primeira, é convertido a metilglioxal (acetona monooxigenase/citocromo P450IEII) e se forma D-lactato e D-glicose. Na segunda e terceira vias, o acetol é convertido a 1,2-propanodiol por um mecanismo extra-hepático que não está bem caracterizado (JONES, 2000; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

A importância relativa de cada via no metabolismo da acetona depende da quantidade administrada: em doses pequenas ou produção endógena, a via do metilglioxal predomina; em altas doses essa via é saturada e o metabolismo continua pelas vias extra-hepáticas.

JONES *et al.*, (1993) relataram que a concentração sangüínea de acetona aumenta durante jejum prolongado e em *diabetes mellitus*; porém, se esta doença for controlada, os níveis de acetona se aproximam do normal. A dieta, bem como estado fisiológico e genético podem alterar o metabolismo de acetona.

FIGURA 1. Vias de metabolismo da acetona (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

A cinética da eliminação metabólica segue rigorosamente a lei de Michaelis-Menten (HALLIER *et al.*, 1981). A eliminação ocorre principalmente por via pulmonar (20 %) (WANG *et al.*, 1994). Apenas pequena quantidade é excretada na urina (1%), sendo 75% biotransformada (FUJINO *et al.*, 1992). Em geral, a acetona é eliminada do organismo dentro de 24 horas, desde que a exposição tenha cessado e sua meia-vida é de 5,8 horas (WANG *et al.*, 1994).

Toxicodinâmica e efeitos nocivos

A acetona é altamente volátil e seu vapor tem efeito irritante nas membranas mucosas dos olhos, nariz e garganta. Efeitos adversos têm sido encontrados em baixas concentrações: tempo de reação prolongado é observado em trabalhadores expostos a cerca de 200 ppm. Efeitos na fisiologia do sistema nervoso autônomo foram detectados em exposição a 250 ppm (WANG *et al.*, 1994; WIGAEUS *et al.*, 1981; WYSOCKI *et al.*, 1997).

Este solvente pode induzir a hiposnia; no início, a pessoa exposta sente um odor persistente e desagradável semelhante ao do solvente, passando a ter dificuldade de diferenciar cheiros e aromas. Em exposição elevada durante anos, ocorre inflamação crônica nas vias aéreas, estômago e duodeno (EMMETT, 1976).

A hepatotoxicidade da acetona é moderada e também podem ser observados efeitos hematológicos, cujo mecanismo não está completamente esclarecido. A toxicidade renal pode ser devida ao seu metabólito, formiato, excretado pelos rins. Aumento do peso dos rins e fígado, provavelmente devido à indução de enzimas microssômicas também tem sido relatado (LOGAN *et al.*, 1994; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

Além de redução de albumina e aumento de α e β globulinas e lipídeos totais, a exposição à acetona causa depressão de glutatona livre no fígado e de UDP glicuronil transferase (EGLE, 1973; VAINIO & ZITTING, 1978).

Estudos em animais revelaram que a acetona é fetotóxica em altas concentrações (6600 ppm), embora o mecanismo não seja bem definido (WIGAEUS *et al.*, 1981).

Um efeito da acetona muito estudado é a indução de enzimas microssômicas, particularmente do citocromo P450IIE1. Assim, potencializa a toxicidade de diversos agentes químicos que originam metabólitos tóxicos, como a formação de carboxiemoglobina a partir do diclorometano (AKUBUE *et al.*, 1994; BRADY *et al.*, 1989; DeZWART *et al.*, 1997).

É importante avaliar os possíveis efeitos de múltipla exposição no local de trabalho, pois muitas indústrias utilizam grande variedade de compostos e as interações metabólicas podem influenciar tanto a toxicocinética quanto a toxicodinâmica dos solventes. As interações metabólicas dos solventes geralmente resultam na inibição ou indução enzimática (APOSTOLI *et al.*, 1998).

O pré-tratamento com acetona potencializa os efeitos hepatotóxicos e nefrotóxicos de solventes halogenados, tais como tetracloreto de carbono, clorofórmio, 1,1,2-tricloreto, 1,1-dicloretileno, 1,2-diclorobenzeno, devido à formação de intermediários tóxicos (DeZWART *et al.*, 1997; HEWITT *et al.*, 1980; KRASAVAGE *et al.*, 1982).

A acetona também potencializa a neurotoxicidade e a toxicidade na reprodução do hexano e metil-n-butilcetona e de seus metabólitos como a 2,5 hexanodiona (2,5 HD). O mecanismo desta interação não está completamente

claro, mas parece ocorrer diminuição da depuração da 2,5 hexanodiona pela acetona (CARDONA *et al.*, 1996; ZHAO *et al.*, 1998).

A possível interação da acetona com estireno é particularmente importante em indústrias de fibra de vidro, onde os trabalhadores estão expostos aos dois solventes ao mesmo tempo (WIGAEUS *et al.*, 1984). Alguns estudos mostram que nesta situação os trabalhadores têm maior concentração de ácido mandélico na urina. A co-exposição aumenta significativamente a atividade do NADH citocromo C redutase e o nível de citocromo P 450, e a atividade da enzima etoxicumarina-O-dietilase é duplicada (MARHUENDA *et al.*, 1997; VAINIO & ZITTING, 1978).

A acetona apresenta baixo risco sob condições adequadas de manuseio industrial e a toxicidade oral aguda é baixa. É fracamente irritante da pele, mesmo após exposições repetidas, e moderadamente irritante dos olhos, provavelmente pela desidratação com conseqüente floculação gelatinosa, levando à opacificação da esclerótica. Este efeito, em ratos, se verifica em exposições acima de 200 ppm de vapor de acetona (KRASAVAGE *et al.*, 1982).

2.3 ISOPROPANOL

Propriedades físico-químicas (AMERICAN INDUSTRIAL HYGIENE ASSOCIATION, 1978; CHEMICAL, 1992; PAPA, 1993; ZAKHARI *et al.*, 1982)

- fórmula química: C_3H_8O
- estrutura química:

- nomes mais comuns: isopropanol, álcool isopropílico;
- sinônimos: 2-propanol, propanol-2, álcool sec-propílico, dimetilcarbinol;
- fator de conversão: 1 ppm = 2,46 mg/m³ de ar.

O isopropanol é um líquido altamente inflamável a temperatura ambiente e sob condições normais de pressão. O odor é semelhante a uma mistura de etanol e acetona. Esse composto é completamente solúvel em água, etanol, acetona, clorofórmio e benzeno (KAPP *et al.*, 1996; ZAKHARI *et al.*, 1982).

Este solvente apresenta, basicamente, todas as reações químicas típicas dos álcoois secundários. Reage violentamente com agentes oxidantes fortes e em contato com fogo, é decomposto formando gases tóxicos, como monóxido de carbono. Suas propriedades químicas e físicas são resumidamente:

- estado físico: líquido;
- cor: incolor;
- peso molecular relativo: 60,09;
- limite de percepção de odor: 7,990 mg/m³;

- ponto de ebulição: 82 °C;
- solubilidade em água: infinita;
- densidade específica (20°C): 0,785;
- densidade relativa de vapor: 2,07;
- pressão de vapor (20°C): 4,4 kPa (33 mmHg);
- limite de flamabilidade: 2-12% de volume.

Usos e fontes de exposição

Atualmente, a capacidade de produção no Brasil é de 9.000 t/ano, sendo que a acetona é a principal matéria-prima (ANUÁRIO, 2000-2001). Este álcool pode ser produzido a partir do propano por dois diferentes processos: hidratação indireta e hidratação catalítica direta. É também produzido através da hidrogenação catalítica de acetona (ZAKHARI *et al.*, 1982).

O isopropanol é solvente freqüentemente utilizado em muitos produtos diretamente acessíveis ao consumo individual. Sua pressão de vapor é de 30 mmHg (22°C), o que o torna relativamente muito volátil. Assim, alta concentração de vapor é facilmente alcançada em ambientes fechados (SAVOLAINEN *et al.*, 1979, ZAKHARI *et al.*, 1982).

Como solvente em produtos farmacêuticos, domésticos e cosméticos, o isopropanol é bastante utilizado (ENCYCLOPEDIA, 1992; ZAKHARI *et al.*, 1982). É um solvente de baixo custo, com inúmeras aplicações industriais como: solvente extrator, purificante, cristalizante e precipitante de produtos naturais e artificiais; diluente de tintas, vernizes e óleos; solvente de produtos farmacêuticos e cosméticos (tônicos capilares e perfumes); solvente de aerossóis em produtos de limpeza e veterinários. Além das propriedades solventes, o isopropanol é usado em processos de resfriamento, antipirético (em compressas para baixar febre em crianças), rubefaciente e anti-séptico, porém, algumas dessas aplicações não são

mais usuais (BRUGNONE *et al.*, 1983; TREON, 1960; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990).

É usado na produção de acetona e seus derivados e na manufatura de outros produtos químicos, tais como: acetato de isopropila, isopropilamina, éter diisopropílico, ésteres de ácidos graxos de 2-propanol, ésteres de herbicidas e isopropóxido de alumínio (ISIDOROV *et al.*, 1985; ZAKHARI *et al.*, 1982; WANG *et al.*, 1994).

Outros usos incluem a aplicação do isopropanol como: desnaturante de solventes, como líquido de refrigeração em indústrias de cerveja, agente desidratante, preservante e flavorizante em chás e cervejas (ISIDOROV *et al.*, 1985; ZAKHARI *et al.*, 1982; WANG *et al.*, 1994).

É também usado na secagem de filmes fotográficos, preparação de placas metálicas antes do tratamento galvanoplástico (BRASIL, 1988).

O isopropanol pode atingir a atmosfera, água e solo através do descarte de efluentes. A emissão de isopropanol pode ocorrer em indústrias durante sua utilização (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990).

Tem sido identificado como produto de metabolismo de microorganismos, tais como: *Pseudomonas* spp., *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Vibrio*, *Clostridium*, entre outros (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990).

Os trabalhadores se expõem durante a produção do próprio isopropanol ou da acetona e outros derivados, ou durante sua utilização como solvente. Na maioria dos casos estes trabalhadores estão expostos a outros agentes químicos.

Normalmente, a exposição ocorre pela via respiratória em vários tipos de atividades: pintura de carros, impressão, produção de tintas, fabricação de borracha, produção de medicamentos como o cloranfenicol, entre outros (ZAKHARI *et al.*, 1982).

Toxicocinética

O isopropanol é introduzido principalmente pela via pulmonar, tendo sido detectada alta correlação entre a concentração alveolar e a exposição (entre 8 e 647 mg/m³) em trabalhadores de uma indústria de impressão. A absorção pulmonar foi de 0,03 a 6,6 mg/min, indicando aumento linear com os níveis de exposição (BRUGNONE *et al.*, 1983). A absorção do isopropanol através do estômago é rápida e completa dentro de 15-30 minutos (PAPPAS *et al.*, 1991)

A distribuição do isopropanol é rápida por todos os compartimentos do organismo. É encontrado, após a ingestão, no fluido espinhal em concentração similar à sérica, bem como seu metabólito, a acetona (NATOWICZ *et al.*, 1985; PAPPAS *et al.*, 1991, ZAKHARI *et al.*, 1982).

Existem vários estudos em animais demonstrando a biotransformação do isopropanol em acetona (BAILEY, 1990; PAPPAS *et al.*, 1991; ZAKHARI *et al.*, 1982).

A Figura 2 ilustra a biotransformação e excreção do isopropanol. A oxidação para acetona foi confirmada em casos de exposição ocupacional, bem como em casos clínicos de intoxicação em humanos (BRUGNONE *et al.*, 1983; KAWAI *et al.*, 1990).

casos clínicos de intoxicação em humanos (BRUGNONE *et al.*, 1983; KAWAI *et al.*, 1990).

Após a inalação, a razão acetona/isopropanol diminui com o aumento da concentração de isopropanol, indicando saturação da via enzimática de oxidação (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990).

Existem evidências mostrando que o isopropanol é oxidado à acetona principalmente pela enzima citosólica álcool desidrogenase (ADH). Esta oxidação pode chegar a 90% de todo o álcool absorvido. O restante é eliminado na forma inalterada (CHAN *et al.*, 1993; PAPPAS *et al.*, 1991).

FIGURA 2. Biotransformação e excreção do isopropanol em mamíferos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990).

formação do complexo urinário β - isopropil - glicuronídeo (JONES & ANDERSSON, 1995; KAMIL *et al.*, 1953).

A biotransformação de álcoois pelo fígado é uma reação enzimática reversível e, sob determinadas circunstâncias, as cetonas podem ser reduzidas aos álcoois que as formaram. Isto significa que a acetona pode ser convertida em isopropanol (Figura 2); quando a concentração sanguínea de acetona aumenta, a via de redução ao isopropanol é ativada. Esta redução é facilitada se houver abundância de co-enzima NADH nos hepatócitos (JONES & ANDERSSON, 1995).

Existem poucos trabalhos na literatura sobre a formação de isopropanol a partir de acetona endógena produzida a partir de patologias relacionadas a distúrbios de carboidratos (BAILEY, 1990).

A maior parte do isopropanol inalado (81-89%) é excretada pelo ar exalado sob a forma inalterada ou como metabólitos: acetona e CO₂. Uma pequena quantidade (3-8%) é excretada pela urina sob a forma inalterada ou conjugada com ácido glicurônico ou seu metabólito, acetona. Apenas 0,5-1,7% é eliminado nas fezes. A excreção através da saliva e leite também foram verificadas (BRUGNONE *et al.*, 1983; KAPP *et al.*, 1996; ZAKHARI *et al.*, 1982).

A eliminação do isopropanol do sangue obedece a uma cinética de primeira ordem. A meia-vida em ratos é de 1,5 – 2,5 horas, dependendo da dose e a administração de etanol aumenta este tempo. A meia-vida do metabólito, acetona, é de 22 horas (NATOWICZ *et al.*, 1985).

Toxicodinâmica e efeitos nocivos

O isopropanol é um depressor do sistema nervoso central duas vezes mais potente que o etanol, podendo levar ao coma devido à redução na velocidade de biotransformação e à contribuição do efeito depressor da acetona formada. Da

mesma forma que o etanol, a intoxicação por isopropanol leva a perda de consciência, resultando, com frequência, em coma profundo. A morte ocorre como consequência da depressão respiratória e pode ser relacionada com concentrações sanguíneas acima de 25 mmol/L. Efeitos cardíacos incluem hipotensão, taquicardia e choque. A congestão dos pulmões é observada em casos fatais (BRASIL, 1988; CHAN *et al.*, 1993).

Anormalidades nos eletroencefalogramas de pessoas que trabalham com pintura de carros e que estão expostas a vários solventes, incluindo acetona e isopropanol, foram relatadas (SEPPÄLÄINEN *et al.*, 1978).

O isopropanol é irritante, podendo causar rinite, vômitos e dermatite no contato prolongado (PAPPAS *et al.*, 1991).

Sabe-se que o isopropanol é responsável pela toxicidade hepática e renal causada por haloalcanos: a hepatotoxicidade tem sido atribuída a alterações não específicas na membrana, que tornam a célula mais susceptível à injúria, ou ao aumento da bioativação de outros agentes nocivos pela formação de intermediários reativos, ou a ambos. O isopropanol e a acetona quando utilizados com o tetracloreto de carbono nas indústrias de borracha e plástico potencializam a hepatotoxicidade deste composto (BRUGNONE *et al.*, 1983; TRAIGER & PLAA, 1974; ZAHLEN *et al.*, 1985; WIGAEUS *et al.*, 1984).

Em estudos epidemiológicos com trabalhadores expostos ao isopropanol por tempo prolongado foram demonstrados câncer paranasal, pulmonar e laríngeo. Esta substância não tem potencial genotóxico, e apesar dos dados epidemiológicos relacionarem a exposição ao isopropanol a certos tipos de câncer, não existem dados suficientes que comprovem este efeito (BRUGNONE *et al.*, 1983).

Em 1989, a *Environmental Protection Agency* (EPA) declarou a necessidade de realizar testes sobre a farmacocinética, toxicidade subcrônica, neurotoxicidade aguda e subcrônica, genotoxicidade, toxicidade crônica incluindo oncogenicidade, toxicidade reprodutiva e no desenvolvimento de neurotoxicidade do álcool isopropílico, devido ao aumento de seu uso. Porém, testes realizados demonstraram que essa substância não é carcinogênica ou mutagênica (CHEMICAL, 1992; KAPP *et al.*, 1996).

A indução de enzimas microssômicas no fígado e rins de ratos reflete aumento na biotransformação do *n*-hexano, especialmente na formação do metabólito 2-hexanol. Esse efeito é devido à acetona formada pela biotransformação do isopropanol. A co-exposição do isopropanol/*n*-hexano pode aumentar o risco da neurotoxicidade do *n*-hexano, em concentrações de isopropanol próximas ao TLV-TWA de 400 ppm. Esse limite parece alto quando comparado a outros solventes, especialmente quando são consideradas a rápida absorção e a alta concentração sanguínea de isopropanol (ACGIH, 2001; ZAHLEN *et al.*, 1985).

O isopropanol aumenta a atividade da glutathione S-transferase no fígado, mas não nos rins, enquanto o nível de glutathione reduzida aumenta levemente em ambos os órgãos (ZAHLEN *et al.*, 1985).

A completa reversibilidade de todos os efeitos no fígado, após um período de recuperação de quatro semanas, contrasta com o que foi observado nos rins. Neste local a indução enzimática mostrou-se persistente, indicando diminuição mais lenta de isopropanol e acetona acumulados ou diferentes mecanismos de regulação das enzimas microssômicas nos dois órgãos (ZAHLEN *et al.*, 1985).

Severa embriofetotoxicidade foi observada em ratos após altas exposições ao isopropanol. A redução do peso fetal mostrou ser dose-

-dependente. Após exposição a 7000 ou 10000 ppm de isopropanol, apenas a incidência de malformações esqueléticas aumentou. Danos pré e pós implantação, retardamento do crescimento fetal e desenvolvimento de anomalias, foram demonstradas quando o nível de exposição afetou também a mãe. Mas isso não significa que o isopropanol não apresente perigo na gestação, nas condições em que é usado atualmente (NELSON *et al.*, 1988).

2.4 ACETONA URINÁRIA COMO BIOINDICADOR DA EXPOSIÇÃO À ACETONA E AO ISOPROPANOL

A excreção de solventes é principalmente realizada pelos rins através de metabólitos. Parte do solvente absorvido é excretado pelos pulmões sob a forma inalterada e uma pequena quantidade (cerca de 1%) é excretada pelos rins. Esta pequena quantidade dissolvida na urina está em equilíbrio com a concentração sangüínea e com o ar alveolar (GHITTORI *et al.*, 1987).

FUJINO *et al.* (1992) estudaram três indicadores de exposição à acetona: acetona em urina, no ar exalado e em sangue. A maior correlação obtida com o nível de exposição foi a urinária ($r=0,71$).

Estudos de KUMAGAI *et al.* (1998) demonstraram que a concentração de acetona na sangue e no ar exalado são sensíveis à exposição à acetona em todos os períodos da jornada de trabalho, enquanto que a concentração urinária é sensível nos períodos medianos, pois a excreção se inicia após duas horas de exposição.

PEZZAGNO *et al.* (1988) já demonstravam estreita correlação entre valores ambientais e urinários de acetona, em amostras coletadas após 4 horas de exposição ($r=0,94$). Outros estudos confirmaram essa correlação (DIVINCENZO *et al.*, 1973; GHITTORI *et al.*, 1987; KAWAI *et al.*, 1990).

A monitorização biológica da acetona através de urinálises é válida somente com nível de exposição acima de 15 ppm; abaixo deste valor, não existe boa correlação (IKEDA, 1999).

Vários parâmetros têm sido avaliados para verificar qual o melhor bioindicador de exposição ao isopropanol. A concentração de acetona no ar

alveolar e no sangue reflete a quantidade de isopropanol absorvida em todas as fases da exposição, da mesma forma que a concentração urinária determinada ao final da jornada de trabalho e na manhã seguinte (GHITTORI *et al.*, 1996).

Em animais que receberam isopropanol, foi verificada predominância na excreção de acetona em relação ao próprio álcool, mesmo sendo seu o tempo de excreção menor que o da acetona (GHITTORI *et al.*, 1996). KAWAI *et al.* (1990) estabeleceram que a AcU é um bom bioindicador de dose interna ao isopropanol até mesmo em níveis baixos de exposição, como 70 ppm, o que fornece um valor de acetona urinária de 20,3 mg/L.

GHITTORI *et al.* (1996) obtiveram boa correlação entre a concentração urinária e níveis de exposição ao isopropanol em trabalhadores, variando entre 0,7 a 202 ppm. Segundo a ACGIH, o índice biológico de exposição (BEI) para acetona urinária é de 50 mg/L, na exposição à acetona, sendo que a urina é a matriz preconizada para a biomonitorização (ACGIH, 2001).

BRUGNONE *et al.* (1983) descreveram que a concentração de acetona tanto no ar alveolar quanto no sangue tem boa correlação com a concentração de isopropanol no ar alveolar. Segundo este autor, os níveis sangüíneos de acetona determinados ao final da jornada de trabalho e na manhã seguinte têm correlação significativa com a quantidade de isopropanol absorvida e com a média de acetona sangüínea durante toda jornada de trabalho (TREON, 1960).

Apesar de demonstrada elevada correlação entre os níveis de acetona e/ou isopropanol na atmosfera de trabalho e a acetona na urina dos expostos, este bioindicador não é específico para esta exposição.

A exposição à acetona ocorre tanto a partir de fontes naturais, quanto a partir de fontes antropogênicas, e é produzida endogenamente por todos os humanos. A

população geral é exposta à acetona através do ar, ingestão de alimentos e água contaminados. A exposição dérmica à acetona pode ocorrer através do contato com a pele de produtos de consumo, como removedores de esmalte e de tintas e produtos domésticos de limpeza (BRÜHL *et al.*, 2000; GROSJEAN *et al.*, 2001; STAPLES, 2000).

O nível endógeno de acetona no organismo em qualquer instante reflete o nível de produção de acetoacetato. A concentração de acetona no sangue total não difere da concentração no plasma, ambas podendo estar elevadas com o estado de jejum e peso corporal do indivíduo. Condições fisiológicas normais ou anormais e estados patológicos podem aumentar a cetogênese e a queima de acetona no organismo (GAVINO *et al.*, 1986).

Atletas e mulheres grávidas podem apresentar níveis elevados pois esses grupos têm maior necessidade de energia (JONES *et al.*, 1993). Nestes indivíduos, os corpos cetônicos (ácido acetoacético, acetona e ácido 3-hidroxibutírico) estão aumentados, devido à elevação do metabolismo de lipídeos (KUNDU & JUDILLA, 1991).

Em diabéticos insulino-dependentes (tipo I), nos quais as vias de metabolismo hepático são ativadas, ocorre quebra de lipídeos como energia alternativa, resultando em cetoacidose diabética quando a acetona é gerada em abundância pela descarboxilação não enzimática de acetoacetato (JONES *et al.*, 1993; KUNDU & JUDILLA, 1991).

Indivíduos com *diabetes mellitus* descontrolada ou com cetoacidose diabética podem ter níveis plasmáticos de acetona de até 750 mg/L. Em casos de intoxicação aguda por acetona, concentrações sanguíneas acima de 1000 mg/L são necessárias para levar à inconsciência em humanos, mas níveis mais baixos

podem interromper processos fisiológicos em diabéticos (TROTTER *et al.*, 1971; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

Indivíduos com dieta cetogênica (alta quantidade de proteínas e muito pouco ou nenhum carboidrato) produzem excessiva quantidade de acetona. Vários tipos de estresse físico e emocional aumentam a concentração de glicose sangüínea, que é seguida de uma elevação na concentração de corpos cetônicos. Não ocorre alta concentração de acetona em pessoas diabéticas que controlam a doença com insulina (JONES *et al.*, 1993; KUNDU & JUDILLA, 1991).

Quando o isopropanol é utilizado como solvente extrator em indústrias alimentícias, pode ser encontrado no produto final; foi detectado em 8 de 17 amostras de limonada, preparada com essência natural extraída com isopropanol. Este composto foi também identificado em concentrados de proteínas de peixes, extraídas com isopropanol (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990).

O metabolismo microbiano pode ser responsável pela presença de isopropanol em certos gêneros alimentícios. Aproximadamente 25% do isopropanol encontrado em cervejas é adicionado como agente flavorizante durante o processo de fabricação (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990).

A população em geral está potencialmente exposta a grande variedade de produtos de consumo contendo isopropanol, como os de limpeza. O desinfetante Pinho Sol[®], por exemplo, possui em sua formulação cerca de 10% de isopropanol (CORDING *et al.*, 2000).

3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO

A finalidade principal da monitorização biológica é proteger a saúde dos trabalhadores prevenindo danos à saúde provenientes da exposição inadequada. Para ser implantada é necessário conhecer os melhores bioindicadores para cada substância, bem como seus valores de referência e valores limites.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo estabelecer os valores de referência para acetona urinária na região sul de Minas Gerais, após validação de um método analítico por cromatografia em fase gasosa. A possível influência da idade, sexo e hábitos individuais nestes valores também foi finalidade desta pesquisa.

O plano de trabalho estabelecido para atingir estes objetivos foi:

- levantamento e estudo de trabalhos sobre características gerais de valores de referência de bioindicadores utilizados na monitorização biológica e dos vários aspectos de interesse toxicológico da acetona e do álcool isopropílico;
- escolha e validação de um método por *headspace*/cromatografia gasosa, através do estudo de efeito da matriz, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão e estabilidade do analito em urina;
- seleção de voluntários para constituir a população de referência, entre homens e mulheres, de diferentes faixas etárias e hábitos de vida;
- determinação de parâmetros hematológicos na população de referência: leucograma, contagem de hemácias, nível de hemoglobina, hematócrito, índices hematimétricos; e bioquímicos: creatinina em urina e em sangue,

glicemia, colesterol total, triglicerídeos, bilirrubina total e frações, transaminases, proteínas totais e urina tipo I;

- determinação da acetona urinária na população selecionada;
- análise estatística dos dados obtidos para possibilitar as diferentes expressões dos valores de referência, assim como para avaliar a interferência ou não de fatores fisiológicos e hábitos individuais nestes valores.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 Material

4.1.1 Reagentes

Os reagentes utilizados nesse trabalho foram:

- acetona p.a Merk®;
- água destilada®;
- álcool n-propílico p.a Vetec®;
- sulfato de sódio anidro p.a Merk®;
- cloreto de sódio p.a Merk®.

4.1.2 Soluções-padrão

Foram preparadas soluções-padrão estoque de acetona e de n-propanol (padrão interno), separadamente, 10g/L, em água destilada. Esta solução era preparada a cada mês e conservada a 4°C.

A partir de diluições da solução padrão foi preparada uma solução 50 mg/L de acetona em água destilada. A partir dessa solução foram preparadas soluções de 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 5,0 mg/L de acetona em água destilada e em urina, para a validação do método.

A solução-padrão de uso de n-propanol (padrão interno) a 100 mg/L foi preparada a partir da diluição da solução estoque.

4.1.3 Vidrarias, aparelhos e acessórios

- frascos para *headspace*, de vidro, com tampa de borracha e lacre de alumínio
- pipetas de vidro de 10; 2; 1mL
- pipeta automática de 200 μ L
- balões volumétricos de 100 mL e 50 mL
- estufa
- seringa de 1mL - BD[®],
- cromatógrafo a gás CGS[®] - modelo 1000 DPC equipado com detector de ionização de chama, com IQ (*Integration Quality*) para integração e processamento dos cromatogramas, munido de coluna Carbowax CG 745[®] (30m x 0,53 mm).

4.2 Métodos

4.2.1 Acetona em urina na população de referência

População estudada

As amostras destinadas à determinação de acetona foram obtidas de pessoas saudáveis não expostas ocupacionalmente à acetona e/ou ao isopropanol, habitantes da região de Alfenas-MG. Esta cidade pertence à região sul de Minas Gerais, sendo a agropecuária a principal atividade econômica; a industrialização não é muito significativa e, por consequência, a poluição industrial é pequena.

Foram avaliados 226 indivíduos para o estabelecimento dos valores de referência; porém, os resultados de 207 – 91 homens e 116 mulheres de 18 a 80 anos – foram utilizados no trabalho. As coletas foram realizadas no Laboratório

Central de Análises Clínicas da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas (Efoa). Os voluntários encontravam-se em jejum de 8 a 12 horas e a urina foi a primeira da manhã, desprezando-se o primeiro jato. Esta amostra, proveniente de única micção, foi coletada diretamente em frascos de polietileno descartáveis de 50 mL. Após a coleta, as amostras foram imediatamente transferidas para os frascos de *headspace* contendo sulfato de sódio anidro, lacradas e mantidas na geladeira até o momento da determinação de acetona, realizada no mesmo dia. O sangue, cerca de 15 mL, foi colhido utilizando seringas descartáveis e submetido às análises bioquímicas e hematológicas no Laboratório Central de Análises Clínicas da Efoa.

Cada voluntário respondeu a um questionário sobre vários itens como: hábitos pessoais e alimentares, local de moradia, presença de patologias e ingestão de medicamentos, peso corporal, atividade profissional entre outros (Anexo I). Assinou, também, um termo de consentimento na participação no trabalho (Anexo II). O estado de saúde foi avaliado através de exames bioquímicos (glicose, colesterol, creatinina plasmática, alanina transaminase, aspartato transaminase, uréia, triglicerídeos, proteínas totais, bilirrubina total e frações), hematológicos (hemograma completo) e urina tipo I. Tais exames foram realizados por técnicas rotineiras de laboratórios de análises clínicas (Anexo III).

Os critérios de exclusão adotados foram: atividade profissional relacionada à acetona ou isopropanol, dieta de emagrecimento rigorosa, diabéticos, pessoas que estavam sob jejum prolongado antes da coleta da urina (acima de 12 horas), presença aumentada de corpos cetônicos na urina (urina tipo I), pessoas que faziam exercícios físicos pesados, pois, conforme já mencionado, estas circunstâncias podem afetar fisiologicamente a excreção da acetona (BREGA *et al.*, 1991; JONES *et al.*, 1993; PEZZAGNO *et al.*, 1988; WANG *et al.*, 1994). Foram considerados fumantes os voluntários que fumavam cinco ou mais cigarros

por dia, e a ingestão de bebidas alcoólicas somente foi considerada positiva se ocorreu até uma semana antes da coleta.

A estratificação da amostra para a realização da análise estatística foi baseada na idade, sexo e hábitos pessoais como tabagismo e ingestão de bebidas alcoólicas.

O protocolo da pesquisa foi aprovado junto aos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo (FCF/USP) e da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas (Efoa) (Anexos IV e V).

Todas as amostras foram analisadas em duplicata, utilizando o método descrito em 4.2.3.

A creatinina urinária foi determinada pelo método colorimétrico de JAFFÉ modificado, kit BIOCLIN.

Análise estatística

Inicialmente, foi estudada a distribuição estatística dos valores de referência através do método de Shapiro-Wilk e plotagem dos dados em sistema cartesiano para verificar qual seria o melhor método para ajustar estes valores à distribuição Gaussiana.

Utilizou-se o teste paramétrico *t*-Student para avaliar a influência da idade, sexo, uso de tabaco e de bebidas alcoólicas. O teste de Tukey, para comparação de médias, foi realizado para verificar possíveis diferenças na expressão dos valores de acetona urinária. O estudo estatístico foi realizado utilizando o programa: SAS® Software, versão 6.11, SAS Institute, Inc., Cary NC (1996).

4.2.2. Otimização da extração por *headspace*

Foram feitos estudos para padronizar o melhor método levando em consideração os vários fatores que afetam a técnica de *headspace*, entre eles: sistema de vedação do frasco, tempo e temperatura da estufa, volume de amostra e efeito "salting out". As comparações foram feitas com base nos resultados das áreas dos picos correspondentes.

Sistema de vedação do frasco

Amostras de um *pool* de urina foram submetidas a técnica de *headspace*, utilizando tampas de borracha e revestidas ou não com papel alumínio.

Tempo de aquecimento

Amostras de um *pool* de urina foram processadas pela técnica de *headspace*, mantidas na estufa por diferentes tempos de aquecimento: 5; 10; 15 e 20 minutos. Para este estudo as tampas de borracha foram revestidas com papel alumínio.

Temperatura de aquecimento

Foram utilizadas amostras de um *pool* de urina submetidas a técnica de *headspace*, utilizando-se diferentes temperaturas de aquecimento: 70; 75; 80; 85; 90; 95°C por 20 minutos. Para este estudo as tampas de borracha foram revestidas com papel alumínio.

Adição de sal - "salting out"

Amostras de um *pool* de urina foram mantidas a 90°C por 20 minutos sem adicionar sal e adicionando sulfato de sódio anidro e cloreto de sódio separadamente. Para este estudo as tampas de borracha foram revestidas com papel alumínio.

Volume de amostra

Foram utilizadas amostras de um *pool* de urina mantidas a 90°C por 20 minutos e utilizando diferentes volumes: 2; 3; 5 mL. Para este estudo as tampas de borracha foram revestidas com papel alumínio e, sulfato de sódio anidro foi adicionado às amostras.

4.2.3 Validação do método para a determinação da acetona urinária

As amostras destinadas a validação do método foram preparadas a partir de um *pool* de urina, obtidas de alunos e funcionários do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas. As amostras foram colhidas, homogeneizadas e fortificadas com soluções padrão de acetona em diferentes concentrações para o preparo da curva de calibração; estudo do efeito da matriz, da linearidade, da precisão, do limite de detecção e quantificação e da estabilidade.

O método utilizado pode ser descrito nas seguintes etapas:

- em frasco de vidro para *headspace* adicionar 2 mL de urina, 2 g de sulfato de sódio anidro e 0,2mL de padrão interno. Fechar com a tampa de borracha revestida com papel alumínio e lacrar;
- levar à estufa a 90°C por 20 min;
- injetar 0,5 mL da fase gasosa no cromatógrafo.

- injetar 0,5 mL da fase gasosa no cromatógrafo.

A Figura 3 mostra o fluxograma do método de extração da acetona em urina.

Figura 3. Fluxograma da técnica da determinação de acetona urinária.

Otimização das condições cromatográficas

Estudou-se os seguintes parâmetros para otimização das condições cromatográficas: temperatura da coluna, temperaturas do injetor e detector, fluxos dos gases de arraste e auxiliar, relação de divisão (*split*) e padrão interno.

Efeito da matriz

Para avaliar o efeito da matriz amostras de urina e de água fortificadas, em quintuplicata, com as concentrações 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0 e 5,0 mg/L de acetona foram submetidas ao procedimento descrito no item 4.2.3.

Linearidade e curva de calibração

Amostras de *pool* de urina foram adicionadas de soluções-padrão de acetona de modo a obter as seguintes concentrações: 0,1; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 5,0 mg/L. Estas amostras foram, assim como a urina de referência, analisadas em quintuplicata, segundo o procedimento descrito em 4.2.3.

Para cada lote de amostras analisadas foi preparada curva de calibração utilizando as concentrações 0,5; 1,0 e 2,5 mg/L (duplicata/ponto). Nestes estudos, o valor de acetona obtido nas amostras de referência foi subtraído de todos os adicionados de padrão.

Limite de detecção (LD)

O LD foi considerado como a mínima concentração determinada com confiabilidade, ou seja, diferenciando do zero com pico três vezes maior que o ruído de fundo (CHASIN *et al.*, 1998). Obteve-se por diluições sucessivas da amostra adicionada de 0,1 mg/L de acetona e submetidas ao método descrito em 4.2.3.

Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação foi a menor concentração que se pôde medir com precisão adequada, ou seja, com uma imprecisão avaliada pelo coeficiente de

variação menor que 10% (CHASIN *et al.*, 1998), encontrado por adição do padrão de acetona em urina (0,1 mg/L) e diluições sucessivas de amostra. As análises descritas foram realizadas de acordo com o procedimento 4.2.3.

Precisão Intra-ensaio

Para avaliar a precisão intra-ensaio, foram utilizadas amostras de urina sem adição e fortificadas com 1,0 e 3,0 mg/L de acetona, analisadas em 10 replicatas por concentração. As amostras foram submetidas ao procedimento descrito no item 4.2.3.

Precisão interensaio

A precisão interensaio foi avaliada através da análise sucessiva de amostras de urina sem adição e fortificadas com 1,0 e 3,0 mg/L de acetona (em duplicata) durante dez dias consecutivos. As amostras foram analisadas de acordo com o método descrito no item 4.2.3.

Estabilidade do analito na amostra

No estudo da estabilidade da acetona em urina foram utilizadas amostras sem adição e fortificadas com 1,0 e 3,0 mg/L de acetona, armazenadas em vidro âmbar, nas seguintes condições:

- Temperatura ambiente: as amostras foram analisadas em duplicata no tempo zero, após seis, doze, vinte e quatro e quarenta e oito horas;
- Geladeira ($\pm 4^{\circ}\text{C}$): as amostras foram analisadas em duplicata no tempo zero, após seis, doze, vinte e quatro e quarenta e oito;
-

- Freezer (-20°C): as amostras foram armazenadas em alíquotas e analisadas durante 10 dias consecutivos, em duplicata. Foram avaliados, ainda, ciclos de congelamento/ descongelamento no tempo zero, após seis, doze, vinte e quatro e quarenta e oito horas, totalizando quatro ciclos completos de congelamento (freezer à -20° C) e descongelamento ($\pm 20^\circ$ C).

5. RESULTADOS

5.1 Otimização da extração por *headspace*

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos do estudo da influência de vedação da tampa do frasco de *headspace*.

TABELA 1. Tipo de vedação, áreas dos picos de acetona e coeficientes de variação.

sistema de vedação	área do pico de acetona*	CV %**
sem revestimento	42,3	1,6
com papel alumínio	109,4	3,4

* média de cinco determinações

** área relativa ao n-propanol

As áreas dos picos resultantes de acordo com os diferentes tempos de manutenção dos frascos em estufa, estão arroladas na Tabela 2.

TABELA 2. Tempos de aquecimento dos frascos de *headspace* em estufa, áreas dos picos de acetona e coeficientes de variação.

tempo (min)	área do pico de acetona*	CV%**
5	12,4	2,3
10	27,7	2,7
15	45,7	3,3
20	76,9	4,0

* média de cinco determinações

** área relativa ao n-propanol

A Tabela 3 apresenta o efeito da temperatura de aquecimento das amostras e as áreas dos picos correspondentes.

TABELA 3. Temperaturas de aquecimento do frasco de *headspace*, áreas dos picos de acetona e coeficientes de variação.

temperatura (°C)	área do pico de acetona*	CV%**
70	13,9	5,4
75	21,6	2,4
80	24,8	6,6
85	34,5	2,9
90	45,5	4,0
95	56,5	2,5

* média de cinco determinações

** área relativa ao n-propanol

O efeito "salting out" foi avaliado na presença de dois sais inorgânicos diferentes (sulfato de sódio e cloreto de sódio). A Tabela 4 mostra o resultado deste estudo.

TABELA 4. Tipo de sal utilizado, áreas dos picos de acetona e coeficientes de variação.

sal	área do pico de acetona *	CV%**
sem adição	76,9	4,0
sulfato de sódio	96,9	2,0
cloreto de sódio	83,0	3,1

* média de cinco determinações

** área relativa ao n-propanol

A Tabela 5 denota os resultados do estudo da variação do volume de amostra de urina utilizada.

TABELA 5. Volumes de urina utilizados, áreas dos picos de acetona e coeficientes de variação.

volume (mL)	área do pico de acetona *	CV% **
2	124,2	5,0
3	92,0	6,3
5	96,9	2,0

* média de cinco determinações

** área relativa ao n-propanol

5.2 Validação do método para determinação de acetona urinária

Otimização dos parâmetros cromatográficos

As condições cromatográficas para análise de acetona em urina estabelecidas estão descritas abaixo:

➤ Coluna:

- Temperatura: 90 °C,
- Fluxo do gás de arraste (nitrogênio): 8 mL/min.

➤ Detector:

- Temperatura: 180 °C,
- Fluxos: hidrogênio: 73 mL/min;
oxigênio: 292 mL/min;
auxiliar (nitrogênio): 32,8 mL/min.

➤ Injetor:

- Temperatura: 150 °C,
- Relação de divisão: *splitless*

➤ Padrão interno: n-propanol

A Figura 4 mostra o perfil cromatográfico do vapor gerado a partir de amostra real e fortificada com 1 mg/L de acetona, adicionadas de padrão interno nas condições analíticas padronizadas. O tempo de retenção médio ($n = 10$) da acetona foi estabelecido em $1,33 \text{ (min.)} \pm 0,0032$ e do para o n-propanol de $2,85 \text{ (min.)} \pm 0,0195$. O tempo de retenção relativo (acetona/PI) foi, em média, 0,47.

FIGURA 4. Cromatograma de: (a) amostra de urina com adição de padrão interno; (b) amostra de urina fortificada com 1 mg/L de acetona e adicionada de padrão interno.

Efeito da matriz

A Figura 5 é a representação gráfica da linearidade entre a concentração de acetona e área relativa ao n-propanol, em amostras enriquecidas de *pool* de urina e de água. Cada ponto corresponde à média dos valores obtidos na análise de cinco replicatas.

FIGURA 5. Representação gráfica do efeito da matriz biológica na determinação de acetona.

Linearidade

A Figura 6 mostra a curva de linearidade. Cada ponto corresponde à média dos valores obtidos na análise de cinco replicatas.

FIGURA 6. Curva de linearidade entre a concentração de acetona e área relativa ao n-propanol (PI) e os respectivos desvios padrão de cada ponto.

Limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção do método foi igual ao limite de quantificação. Este valor foi de 0,1 mg/L, apresentando um coeficiente de variação de 7% para dez replicatas.

Precisão intra e interensaio

A Tabela 6 denota os coeficientes de variação obtidos no estudo de precisão intra e interensaio.

TABELA 6. Coeficientes de variação em estudo de precisão intra e interensaio.

acetona em urina (mg/L)	coeficiente de variação %	
	intra-ensaio	interensaio
sem adição	5,5	6,3
1,0	4,0	8,8
3,0	5,0	5,2

Estabilidade

A Figura 7 ilustra a estabilidade da acetona em urina mantida em temperatura ambiente e em geladeira e freezer (ciclos de congelamento/descongelamento).

FIGURA 7. Estabilidade da acetona em amostra de urina sem adição, mantida a temperatura

A Figura 8 mostra a estabilidade de acetona em urina fortificada com 1,0 mg/L e mantida a temperatura ambiente e em geladeira e freezer (ciclos de congelamento/descongelamento).

FIGURA 8. Estabilidade da acetona em amostra de urina fortificada com 1,0 mg/L, mantida a temperatura ambiente e em geladeira e freezer.

A estabilidade de acetona em urina fortificada com 3,0 mg/L e mantida a temperatura ambiente, geladeira e freezer (ciclos de congelamento/descongelamento) está representada na Figura 9.

FIGURA 9. Estabilidade da acetona em amostra de urina fortificada com 3,0 mg/L, mantida a temperatura ambiente e em geladeira e freezer.

A Tabela 7 e a Figura 10 mostram os resultados da estabilidade de urina em freezer, durante dez dias consecutivos.

TABELA 7. Coeficientes de variação obtidos no estudo de estabilidade da acetona em urina, congelada a -20°C , durante dez dias.

acetona em urina (mg/L)		coeficiente de variação %
adicionado	real	
Sem adição	1,03	6,0
1,0	1,68	8,0
3,0	3,18	5,0

FIGURA 10. Estabilidade da acetona em urina, mantida em freezer durante dez dias.

5.3 Acetona urinária na população de referência

As análises de acetona urinária foram realizadas de acordo com o método padronizado e validado. As concentrações obtidas através da curva de calibração (mg/L) também foram corrigidas pela creatinina. A população foi subdividida de acordo com sexo, idade, hábitos de fumar e ingestão de bebidas alcoólicas.

A Tabela 8 mostra as características da população de referência e seus respectivos valores de acetona urinária.

TABELA 8. Características da população de referência e valores de acetona urinária.

(Continua)

voluntário	sexo	idade (anos)	tabaco	bebida	acetona urinária	
					mg/L	mg/g creat.
1	F	25	não	não	0,59	0,62
2	F	30	sim	sim	1,20	0,85
3	F	24	não	não	0,67	0,65
4	F	20	não	não	1,60	0,61
5	M	25	não	não	1,80	1,06
6	M	21	não	sim	0,67	0,53
7	F	36	não	sim	1,30	0,46
8	M	27	sim	sim	0,78	0,33
9	F	37	sim	não	0,85	0,59
10	F	33	não	não	0,60	0,60
11	F	65	não	sim	1,10	0,90
12	M	26	não	sim	0,70	0,59
13	M	60	sim	não	0,98	0,55
14	F	38	não	não	0,55	0,65
15	F	77	sim	não	0,69	0,72
16	M	80	não	não	0,61	1,18
17	F	20	sim	não	0,96	0,69
18	M	23	não	não	0,94	0,63
19	M	20	não	não	0,74	0,59
20	M	25	não	não	0,89	0,54
21	F	46	não	não	1,08	0,53
22	M	24	não	não	0,67	0,92
23	M	22	não	não	0,92	1,05
24	M	21	não	sim	1,10	0,38
25	F	40	não	não	0,72	0,96
26	M	18	não	não	0,52	0,40
27	F	45	sim	não	0,74	1,02
28	M	23	não	não	0,40	0,57
29	F	42	não	não	1,47	1,95
30	F	44	não	não	1,42	0,40
31	F	19	não	não	0,59	0,63
32	M	21	não	não	0,89	0,51
33	F	18	não	não	0,30	0,70
34	M	46	não	sim	0,53	0,52

TABELA 8. Características da população de referência e valores de acetona urinária.
(Continua)

voluntário	sexo	idade (anos)	tabaco	bebida	acetona urinária	
					mg/L	mg/g creat.
35	M	35	não	não	0,62	1,15
36	F	40	não	não	0,98	1,01
37	F	41	não	não	0,87	0,74
38	M	38	não	não	1,20	1,39
39	F	23	não	não	1,46	0,76
40	F	29	não	não	1,39	1,88
41	M	33	não	sim	0,94	0,73
42	F	35	não	sim	0,63	1,77
43	F	23	sim	sim	0,76	0,60
44	M	32	sim	sim	1,24	0,68
45	M	30	não	sim	1,50	0,58
46	F	67	não	não	0,92	0,63
47	F	43	sim	sim	1,30	0,65
48	M	37	não	não	1,40	0,77
49	M	20	não	não	1,10	0,65
50	F	37	não	não	0,75	0,85
51	F	24	não	não	0,88	0,53
52	M	40	não	sim	1,70	1,04
53	F	42	não	sim	0,64	0,67
54	F	36	não	sim	0,76	0,68
55	M	54	não	sim	1,40	1,61
56	M	44	sim	não	1,06	0,68
57	F	37	sim	sim	1,70	2,00
58	F	28	não	não	1,30	0,85
59	M	23	não	não	0,86	0,41
60	F	47	não	não	0,61	0,60
61	F	35	sim	sim	1,68	0,96
62	M	24	não	não	1,52	0,81
63	F	35	não	não	1,54	0,53
64	F	35	não	não	1,20	0,80
65	M	32	não	não	0,82	0,44
66	M	27	não	não	0,88	0,74
67	F	45	sim	sim	0,92	0,50
68	F	45	não	não	0,61	2,42

TABELA 8. Características da população de referência e valores de acetona.

(Continua)

voluntário	sexo	idade (anos)	tabaco	bebida	acetona urinária	
					mg/L	mg/g creat.
69	F	24	sim	não	1,16	0,63
70	F	25	não	não	0,67	1,03
71	F	62	sim	sim	0,70	1,55
72	M	28	não	não	0,64	0,79
73	M	36	não	sim	1,17	0,47
74	M	48	não	sim	1,52	0,99
75	F	62	não	não	0,62	2,69
76	M	48	sim	sim	1,30	0,72
77	F	29	não	sim	0,92	0,88
78	F	42	não	não	0,70	0,52
79	M	32	não	não	0,72	0,56
80	F	29	não	sim	1,10	0,58
81	F	23	não	não	1,17	0,69
82	M	51	não	sim	1,34	0,70
83	M	36	não	sim	1,02	0,79
84	F	27	sim	sim	1,27	0,85
85	F	61	não	não	1,50	2,21
86	M	33	não	não	0,92	1,19
87	F	46	não	não	0,80	2,05
88	M	36	não	sim	1,38	0,74
89	M	21	não	sim	1,22	0,57
90	F	39	não	não	1,00	0,66
91	F	24	não	não	1,20	0,59
92	F	74	sim	sim	0,55	1,31
93	F	36	não	não	0,84	0,64
94	M	34	não	não	0,74	0,34
95	M	54	sim	sim	1,46	0,47
96	F	54	não	não	0,78	0,48
97	M	60	sim	sim	0,89	0,53
98	F	58	não	não	0,54	0,96
99	F	67	não	não	0,68	0,58
100	F	50	sim	não	0,71	2,37
101	M	20	não	não	0,62	1,41
102	F	21	não	não	1,67	2,58

TABELA 8. Características da população de referência e valores de acetona.

(Continua)

voluntário	sexo	idade (anos)	tabaco	bebida	acetona urinária	
					mg/L	mg/g creat.
103	F	37	não	não	0,63	0,51
104	F	48	não	não	0,85	1,15
105	F	22	não	não	0,80	0,60
106	F	23	não	não	1,59	0,82
107	F	61	não	não	1,33	0,76
108	M	45	sim	não	0,88	1,19
109	F	50	não	não	1,25	0,43
110	M	36	não	sim	0,71	0,47
111	F	46	sim	sim	1,21	0,49
112	F	68	não	sim	1,01	0,42
113	M	35	não	sim	1,18	0,45
114	M	55	não	não	1,25	0,75
115	F	39	não	não	1,95	1,42
116	F	30	não	não	0,56	0,37
117	F	55	não	não	0,85	1,31
118	F	23	não	não	0,87	0,58
119	F	65	não	não	0,96	1,78
120	F	22	não	não	1,46	0,70
121	F	24	não	não	1,02	0,99
122	M	27	não	sim	1,10	0,73
123	F	23	não	sim	1,00	0,66
124	F	42	não	não	1,08	0,69
125	M	53	não	não	1,24	0,72
126	M	46	não	não	1,54	0,45
127	M	18	não	não	1,09	1,08
128	M	57	não	sim	0,82	1,72
129	F	65	não	não	0,62	1,93
130	M	23	não	sim	1,31	0,73
131	F	23	não	sim	1,14	0,87
132	F	23	não	sim	1,68	0,97
133	F	25	não	sim	1,47	0,78
134	M	50	não	não	1,29	0,80
135	F	22	não	sim	0,88	1,39
136	M	46	sim	não	0,77	1,22

TABELA 8. Características da população de referência e valores de acetona.

(Continua)

voluntário	sexo	idade (anos)	tabaco	bebida	acetona urinária	
					mg/L	mg/g creat.
137	F	32	não	não	1,17	0,71
138	M	20	sim	não	0,96	0,76
139	F	31	sim	sim	0,80	0,48
140	F	38	não	não	0,78	1,24
141	M	21	sim	não	1,04	1,09
142	F	56	não	não	1,47	0,62
143	M	23	não	não	0,87	1,42
144	F	23	não	sim	1,07	0,74
145	F	53	não	não	1,65	2,74
146	M	57	não	sim	1,35	0,98
147	M	47	sim	sim	1,09	0,85
148	F	23	sim	sim	0,71	0,90
149	M	55	não	sim	1,09	0,89
150	F	46	não	não	1,25	0,92
151	M	71	não	sim	0,76	1,84
152	F	55	não	não	0,66	1,38
153	M	47	sim	sim	1,44	1,20
154	M	46	não	sim	1,37	0,83
155	F	46	sim	não	1,32	1,78
156	F	23	não	sim	1,04	0,72
157	F	21	não	sim	1,89	0,47
158	F	26	não	não	1,81	0,88
159	F	29	não	sim	1,20	0,55
160	F	21	não	não	1,10	0,80
161	M	40	sim	sim	0,98	0,62
162	M	34	não	sim	1,00	0,58
163	M	30	não	sim	1,35	0,85
164	F	59	não	não	0,98	1,69
165	F	70	sim	não	0,97	0,83
166	F	20	sim	sim	0,81	0,89
167	F	24	não	sim	1,67	0,69
168	F	60	não	sim	1,09	0,71
169	M	40	não	sim	1,03	0,55
170	F	70	não	não	1,27	2,08

TABELA 8. Características da população de referência e valores de acetona urinária.

Danielle Palma de Oliveira

(Continua)

voluntário	sexo	idade (anos)	tabaco	bebida	acetona urinária	
					mg/L	mg/g creat.
171	M	46	não	sim	1,06	0,78
172	M	61	sim	sim	1,72	0,86
173	F	40	não	não	0,88	0,48
174	M	19	sim	sim	1,17	0,44
175	F	35	sim	não	1,39	0,50
176	M	31	sim	sim	1,29	0,47
177	M	47	sim	não	0,61	0,44
178	M	26	não	não	1,92	1,12
179	M	32	sim	sim	0,84	0,49
180	M	46	sim	sim	1,33	0,95
181	F	68	não	não	1,50	0,59
182	M	24	não	sim	0,56	0,85
183	M	46	não	sim	1,19	1,02
184	F	24	não	sim	0,87	0,57
185	F	46	não	não	1,19	1,09
186	M	25	não	sim	1,55	1,03
187	M	54	sim	sim	0,87	0,58
188	F	26	não	não	1,63	1,34
189	F	48	não	não	1,31	1,23
190	M	51	não	não	0,99	2,23
191	M	37	sim	não	1,05	0,59
192	F	55	não	não	0,84	1,04
193	F	25	não	não	1,09	0,66
194	F	48	não	sim	1,17	0,59
195	F	23	não	sim	1,10	0,60
196	F	53	não	sim	1,44	1,09
197	M	52	não	sim	0,99	0,37
198	M	58	sim	sim	1,70	1,12
199	M	66	sim	sim	1,36	1,32
200	M	37	sim	sim	0,90	1,60
201	M	39	não	não	0,97	0,47
202	F	61	não	não	1,16	1,18
203	M	74	não	não	0,77	0,98
204	F	41	sim	não	0,98	0,58

TABELA 8. Características da população de referência e valores de acetona urinária.

voluntário	sexo	idade (anos)	tabaco	bebida	(Conclusão) acetona urinária	
					mg/L	mg/g creat.
205	M	38	sim	sim	1,58	1,28
206	M	46	sim	sim	0,70	0,50
207	F	40	não	não	1,37	0,89

As Tabelas 9 a 13 demonstram os valores de referência obtidos na população total e subdividida em grupos.

TABELA 9. Valores de referência para a população total.

valores de referência (n=207)	acetona urinária	
	mg/L	mg/g creat.
média ± desvio padrão	1,12 ± 0,47	0,89 ± 0,46
mediana	1,04	0,74
média geométrica	1,03	0,81
intervalo de confiança 95%	0,98 - 1,26	0,83 - 0,95
percentil 95%	2,20	1,95
intervalo experimental	0,20 - 1,95	0,33 - 2,74
VSR*	2,06	1,81

* valor superior de referência = média + 2 desvios padrão

TABELA 10. Valores de referência (VR) de acetona urinária (mg/L) na população subdividida de acordo com o sexo e hábito de fumar.

VR	sexo		uso de tabaco	
	feminino	masculino	sim	não
n	116	91	51	156
média ± DP	1,04 ± 0,35	1,10 ± 0,33	1,07 ± 0,31	1,06 ± 0,35
mediana	0,97	1,07	0,98	1,03
MG*	0,98	1,05	1,02	1,00
IC 95%**	0,87 - 1,21	0,77 - 0,94	0,75 - 0,99	0,90 - 1,22
percentil 95%	1,54	1,52	1,22	1,55
IE***	0,30 - 1,95	0,88 - 1,32	1,04 - 1,10	0,30 - 1,95
VSR****	1,74	1,76	1,69	1,76

* média geométrica

**intervalo de confiança 95%

*** intervalo experimental

**** valor superior de referência = média + 2 desvios padrão

TABELA 11. Valores de referência (VR) de acetona urinária em mg/g de creatinina, na população subdividida de acordo com o sexo e hábito de fumar.

VR	sexo		uso de tabaco	
	feminino	masculino	sim	não
n	116	91	51	156
média ± DP	0,93 ± 0,52	0,86 ± 0,39	0,87 ± 0,43	0,92 ± 0,50
mediana	0,74	0,77	0,60	0,76
MG*	0,82	0,78	0,79	0,82
IC 95%**	0,84 - 1,02	0,77 - 0,94	0,75 - 0,99	0,84 - 1,00
percentil 95%	1,95	1,72	1,55	2,05
IE***	0,33 - 2,74	0,34 - 2,23	0,33 - 2,37	0,34 - 2,74
VSR****	1,97	1,64	1,73	1,92

* média geométrica

**intervalo de confiança 95%

*** intervalo experimental

**** valor superior de referência = média + 2 desvios padrão

TABELA 12. Valores de referência (VR) de acetona urinária (mg/L) na população subdividida de acordo com a ingestão de bebida alcoólica e a idade.

VR	ingestão de bebida		faixa etária		
	sim	não	≤ 25	26-45	≥46
n	85	122	59	79	69
x ± DP	1,13±0,32	1,01±0,35	1,04±0,36	1,06±0,35	1,07±0,32
mediana	1,10	0,96	1,01	1,00	1,09
MG*	1,08	0,96	0,97	1,01	1,02
IC 95%**	0,91-1,34	0,83-1,34	0,77-1,31	0,83-1,29	0,83-1,31
P95%**	1,68	1,63	1,67	1,70	1,52
IE****	0,53-1,89	0,30-1,95	0,30-1,89	0,55-1,95	0,53-1,72
VSR*****	1,77	1,71	1,76	1,76	1,71

* média geométrica

**intervalo de confiança 95%

***percentil 95%

**** intervalo experimental

***** valor superior de referência = média + 2 desvios padrão

TABELA 13. Valores de referência (VR) de acetona urinária, mg/g de creatinina, na população subdividida de acordo com a ingestão de bebida alcoólica e a idade.

VR	ingestão de bebida		faixa etária		
	sim	não	≤ 25	26-45	≥46
n	85	122	59	79	69
x ± DP	0,82±0,36	0,97±0,55	0,75±0,24	0,84±0,44	1,06±0,53
mediana	0,73	0,76	0,59	0,73	0,91
MG*	0,76	0,85	0,72	0,76	0,94
IC 95%*	0,75-0,90	0,87-1,07	0,69-0,81	0,75-0,95	0,93-1,18
P95%***	1,55	2,21	1,09	1,77	2,08
IE****	0,33-2,00	0,34-2,74	0,38-1,42	0,34-2,42	0,37-2,37
VSR*****	1,54	2,07	1,23	1,72	2,12

* média geométrica

**intervalo de confiança 95%

*** percentil 95%

**** intervalo experimental

***** valor superior de referência = média + 2 desvios padrão

Os resultados dos exames bioquímicos e hematológicos realizados nos voluntários estão demonstrados nas Tabelas 14 e 15.

TABELA 14. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) de parâmetros bioquímicos na população avaliada e os seus respectivos valores de referência.

parâmetro	$x \pm DP$	valor de referência
Glicose (mg/dL)	$85,3 \pm 15,5$	70-110
Uréia (mg/dL)	$32,4 \pm 9,9$	15-50
Creatinina (mg/dL)	$1,4 \pm 6,2$	0,4-1,4
Colesterol total (mg/dL)	$172 \pm 39,5$	< 200
Triglicerídeos (mg/dL)	$121 \pm 93,6$	< 200
Bilirrubina total (mg/dL)	$0,55 \pm 0,2$	Até 1,2
Bilirrubina direta (mg/dL)	$0,3 \pm 1,5$	Até 0,4
Bilirrubina indireta (mg/dL)	$0,5 \pm 1,8$	Até 0,8
AST* (U/L)	$15,3 \pm 4,95$	3-50
ALT** (U/L)	$15 \pm 7,9$	12-46
Proteínas totais (g/dL)	$7,3 \pm 5,3$	6,0-8,0

* alanina transaminase

** aspartato transaminase

TABELA 15. Valores médios ($\pm$ desvio padrão) de parâmetros hematológicos na população avaliada e os seus respectivos valores de referência.

parâmetro	$x \pm DP$	valor de referência
Leucócitos (/mm ³)	6600 $\pm$ 1748	5000-10000
Neutrófilos (%)	3807 $\pm$ 1215	2750-6500
Neutrófilos (rel)	57,0 $\pm$ 8,4	55-65
Bastonetes (mm ³)	18,8 $\pm$ 46,7	0-500
Bastonetes (%)	0,27 $\pm$ 0,66	0-5
Linfócitos (mm ³)	2225 $\pm$ 713	1000-3000
Linfócitos (%)	29,2 $\pm$ 7,9	20-30
Monócitos (mm ³)	303,0 $\pm$ 154,4	200-800
Monócitos (%)	4,8 $\pm$ 2,3	4-8
Eosinófilos (mm ³)	217,3 $\pm$ 218,7	100-400
Eosinófilos (%)	3,2 $\pm$ 2,7	2-4
Basófilos (mm ³)	35,0 $\pm$ 54,1	0-100
Basófilos (rel)	0,5 $\pm$ 0,8	0-1
Hemácias $\times 10^6$ (/mm ³)	4,7 $\pm$ 0,46	4,5-5,5
Hemoglobina (g%)	14,3 $\pm$ 1,6	(M) 13-18 (F) 12-16
Hematócrito (%)	42,4 $\pm$ 4,2	(M) 40-54 (F) 37-47
MCV* (fl)	89,5 $\pm$ 5,5	80-98
MCH** (pg)	30,2 $\pm$ 2,2	27-32
MCHC*** (%)	33,5 $\pm$ 2,2	32-38
RDW **** (%)	13,1 $\pm$ 1,4	11,5-14,5

* volume corpuscular médio

** peso corpuscular médio

*** concentração hemoglobínica corpuscular média

**** índice de anisocitose

Análise estatística

Valores de acetona urinária (mg/L)

Os dados da população de referência não apresentam distribuição Gaussiana ($W = 0,87942$, $p < 0,0001$), como ilustra a Figura 11.

FIGURA 11. Valores de acetona urinária (mg/L) na população de referência (Shapiro-Wilk $W = 0,87942$, $p < 0,0001$).

Devido à não centralidade dos valores, optou-se pela sua transformação (log acetona), que aproximou os valores da distribuição normal ($W = 0,98532$, $p < 0,7000$), como mostra a figura 12.

FIGURA 12. Distribuição dos valores transformados (log acetona) na população de referência (Shapiro-Wilk $W = 0,98532$, $p < 0,7000$).

A Figura 13 mostra a dispersão após a transformação dos valores (log acetona), na qual não se observa correlação entre estes valores e a idade ($p < 0,2319$).

FIGURA 13. Diagrama de dispersão dos valores de acetona urinária, sem correção, transformados (log acetona) na população de referência, de acordo com a idade.

Aplicando-se o teste t-Student, verifica-se nível médio de acetona transformada maior nos voluntários que bebem ($n = 85$, $p = 0,0234$) em comparação com os que não bebem. O valor médio de acetona urinária também foi significativamente mais elevado nos homens (91) em relação às mulheres (116) ($p = 0,0136$). Quanto a variável uso de tabaco ($p = 0,9009$) não há diferenças nos valores transformados de acetona urinária.

Valores de acetona urinária corrigidos pela creatinina

Os dados da população de referência também não possuem distribuição normal ($W = 0,82229$, $p < 0,0001$), desta forma, optou-se por uma transformação dos valores ($1/\sqrt{\text{acetona}}$), a qual levou os dados a uma aproximação da distribuição normal ($W = 0,97479$, $p = 0,0837$).

Através de um teste *t-Student* pode-se comparar os valores transformados de acetona nos voluntários fumantes e não fumantes, nos que bebem e os que não bebem, e nos voluntários do sexo masculino e do sexo feminino. Para todas as variáveis não foram observadas diferenças estatísticas entre as médias.

A verificação de uma possível correlação entre as formas de expressão de acetona, mostra uma correlação positiva entre os valores de acetona urinária (mg/L) ($r = 0,2369$) ($p < 0,0001$) e os valores de acetona corrigidos pela creatinina.

Aplicando-se um teste de comparação de médias (Tukey, 5% $\Delta = 0,131$), observa-se que os valores de AcU não corrigidos (mg/L) foram maiores que os corrigidos por creatinina urinária.

6. DISCUSSÃO

Segundo vários autores, a concentração de acetona urinária é o melhor bioindicador de exposição à acetona e ao isopropanol por sua boa correlação com a concentração destas substâncias no ambiente de trabalho (BAGCHI *et al.*, 1992; BREGA *et al.*, 1991; DIVINCENZO *et al.*, 1973; GHITTORI *et al.*, 1987; KAWAI *et al.*, 1990; KUMAGAI *et al.*, 1998; PEZZAGNO *et al.*, 1988).

A determinação de valores de referência de acetona urinária se faz necessária antes de seu uso na biomonitorização da exposição ocupacional e/ou para avaliar outras condições patológicas que provocam sua elevação, uma vez que é substância onipresente no organismo.

A escolha, padronização e validação do método de análise do bioindicador para estabelecimento de seus valores de referência é etapa inicial e indispensável da pesquisa.

Conforme proposto, uma técnica *headspace*/cromatografia em fase gasosa foi padronizada e validada. Esta técnica é bastante simples e de fácil execução. A cromatografia em fase gasosa é a técnica de escolha por vários autores (BRUGNONE *et al.*, 1983; DIVINCENZO *et al.*, 1973; GHITTORI *et al.*, 1987; GHITTORI *et al.*, 1996; JONES *et al.*, 1993; KAWAI *et al.*, 1990; PEZZAGNO *et al.*, 1988; SATOH *et al.*, 1996; WANG *et al.*, 1994; WIGAEUS *et al.*, 1981), porém pode-se utilizar a cromatografia líquida de alta eficiência (BREGA *et al.*, 1991).

A técnica de *headspace* é amplamente empregada para determinação de substâncias voláteis (DIVINCENZO *et al.*, 1973; GHITTORI *et al.*, 1987; IOFFE, 1984; JONES *et al.*, 1993; NÚNEZ *et al.*, 1984; PEZZAGNO *et al.*, 1988; WANG *et al.*, 1994). Essa técnica é simples, exige pouco manuseio da amostra e elimina os interferentes não voláteis que poderiam contaminar o injetor e o detector. O fator crítico é o equilíbrio entre a fase condensada e a fase vapor (IOFFE, 1984; NÚNEZ

et al., 1984; SETO, 1994); por isso vários parâmetros devem ser otimizados para garantir a máxima recuperação do analito e sensibilidade do método. Neste estudo, os parâmetros analisados foram: vedação do frasco de *headspace*, tempo de aquecimento, temperatura da estufa, volume de amostra e adição de sal.

Solventes orgânicos podem parcialmente ser adsorvidos em alguns materiais. Sendo de borracha a tampa do frasco de *headspace*, foi realizado um estudo comparativo utilizando tampas de borracha revestidas ou não com papel alumínio. O resultado (Tabela 1) demonstrou claramente que há perda do analito por adsorção na tampa, o que prejudicaria a sensibilidade da técnica. O revestimento com papel alumínio aumentou em 158% a área do pico de acetona. Este resultado foi verificado pela área absoluta, pois, o padrão interno também sofre adsorção, mantendo a área relativa praticamente constante. O coeficiente de variação (CV) foi calculado em relação à área relativa para avaliar a precisão do estudo, e se mostrou adequado (menor que 4 %).

O resultado do estudo do tempo de aquecimento da amostra em estufa (5; 10; 15 e 20 minutos), mostrado na Tabela 2, demonstrou que o aumento do tempo eleva a área do pico de acetona, em 520% quando comparado o tempo 5 com o tempo 20 minutos. Este foi escolhido para realização das análises, pois, além de apresentar maior área do pico, não aumentou demasiadamente o tempo de extração. Os coeficientes de variação (CVs) foram calculados em relação ao n-propanol e todos estão dentro dos limites aceitáveis.

A temperatura de aquecimento foi avaliada para verificar qual seria a ideal para a volatilização da acetona. A temperatura inicial testada foi de 70°C que é próxima à temperatura de ebulição desta substância (63°C) e a temperatura máxima utilizada no estudo foi de 95°C. A Tabela 3 demonstra que a área do pico de acetona se eleva com o aumento da temperatura, em 306%, comparando a mais baixa com a mais elevada. Para as análises foi escolhida a temperatura de 90

°C que forneceu boa sensibilidade e um CV adequado. A 95°C ocorreu volatilização significativa de água, o que poderia prejudicar as análises e comprometer o rendimento da coluna cromatográfica. Os CVs foram calculados em relação à área relativa ao n-propanol.

A adição de sal foi testada para verificar o efeito "salting out" na extração do analito, conforme indicado por alguns autores (JONES *et al.*, 1993; NÚÑEZ *et al.*, 1984; SETO, 1994; VITENBERG, 1991). SETO (1994) afirmou que a solubilidade de muitos não-eletrólitos diminui com a adição de sal, por produzir aumento no coeficiente de atividade (γ). A adição de sal diminui a ligação do hidrogênio da água com o analito e, assim, a água é "seqüestrada" pela hidratação do sal (JONES *et al.*, 1993). Neste estudo foram avaliados sulfato de sódio anidro e cloreto de sódio. Os dois tipos de sais promoveram o efeito esperado; porém o sulfato de sódio apresentou melhor sensibilidade, aumentando em 26% a área do pico de acetona em relação a não adição de sal, enquanto que o cloreto de sódio aumentou em 7% (Tabela 4). Os CVs foram calculados em relação à área relativa ao n-propanol.

Foi realizado, também, o estudo do volume de amostra que deveria ser usado. Foram testados os volumes: 2; 3 e 5 mL. O volume de 2 mL foi escolhido para as análises pois apresentou volatilização mais efetiva dos analitos de interesse em relação aos outros volumes testados (Tabela 5), provavelmente, devido ao maior espaço livre no frasco disponível para os vapores. Entre 3 e 5 mL a variação foi pequena, apenas 5 %, porém, quando utilizou-se 2 mL, o aumento da sensibilidade foi de 28% em relação a 5 mL.

Utilizou-se uma coluna *megabore* tipo Carbowax, que possui baixa polaridade permitindo uma separação adequada da acetona em relação ao padrão interno escolhido (n-propanol) e em relação a outros componentes voláteis existentes na urina, conforme relatado por BRUGNONE *et al.*, (1983) e JONES *et*

et al., 1993). O detector de ionização de chama é preconizado por vários autores para esta análise (BRUGNONE *et al.*, 1983; DIVINCENZO *et al.*, 1973; FUJINO *et al.*, 1992; JONES *et al.*, 1993; KAWAI *et al.*, 1990; SATOH *et al.*, 1996; WIGAEUS *et al.*, 1981). O espectrômetro de massa como detector também tem sido usado (GHITTORI *et al.*, 1987; GHITTORI *et al.*, 1996; PEZZAGNO *et al.*, 1988; WANG *et al.*, 1994).

O n-propanol foi escolhido como padrão interno devido à semelhança estrutural em relação à acetona, não ser encontrado normalmente na urina, ter ponto de ebulição relativamente próximo ao da acetona e tempo de eluição bastante satisfatório nas condições cromatográficas padronizadas. As duas substâncias são detectadas em menos de três minutos, tornando a análise bastante rápida. O n-propanol é recomendado por alguns autores como padrão interno adequado em análises de acetona (JONES *et al.*, 1993; DROZD & NAVÁK, 1979; WANG *et al.*, 1994).

Os parâmetros de identificação, tais como as temperaturas do injetor e do detector foram testadas até obter boa separação entre os picos de acetona, n-propanol e os interferentes da urina (Figura 4). O fluxo do gás de arraste, nitrogênio, foi determinado de acordo com as especificações da coluna, com a qualidade de separação e com o tempo de corrida. Devido ao curto tempo de análise, não foi necessário fazer programação de temperatura, sendo suficiente a utilização de corrida isotérmica em 90° C.

Alguns cuidados precisam ser tomados para a obtenção de resultados precisos quando se faz injeção manual no cromatógrafo, especialmente ao usar a técnica de extração por *headspace*.

A seringa deve estar previamente aquecida para evitar a condensação de vapores; as operações de retirada do frasco, perfuração do septo e injeção do

vapor devem ser feitas rapidamente, de modo e em tempos constantes (DROZD & NOVÁK, 1979; SETO, 1994), o que requer experiência do analista; a estufa deve ficar em local o mais próximo possível do cromatógrafo; o frasco deve ser mantido em isopor ao ser retirado da estufa até o momento da amostragem e injeção do vapor.

Foi utilizada a seringa de 1 mL BD[®] para a injeção dos vapores, pois apresenta boa reprodutibilidade dos resultados, como pode ser verificado no estudo de precisão intra-ensaio (Tabela 6). Foi testada a seringa tipo *gas-tight*, Hamilton[®], especial para injeção de vapores; porém, a seringa de 1 mL possui agulha de grande diâmetro, o que levava à deterioração precoce do septo usado no cromatógrafo. Neste caso é necessária a troca constante deste (a cada 3-5 injeções), o que prejudica e encarece as análises de rotina.

A validação do método foi realizada visando minimizar os erros e assegurar a máxima qualidade do trabalho, com base no que é proposto para as determinações analíticas (CHASIN *et al.*, 1998).

A composição complexa da matriz biológica pode ter grande influência na técnica de *headspace*, pois, os vários componentes podem afetar a volatilização dos analitos de interesse (SETO, 1994; VITENBERG, 1991). O estudo da interferência da matriz biológica (Figura 5) demonstrou que os coeficientes lineares (intercessão) e os coeficientes angulares (inclinação) das retas resultantes não foram similares. Assim, as curvas de calibração para a quantificação de acetona nas amostras de referência foram obtidas utilizando *pool* de urina fortificado com concentrações crescentes de acetona.

Os dados do estudo de linearidade mostraram que há concordância entre as concentrações de acetona (0,1 a 5 mg/L) e as áreas relativas (acetona/n-propanol), como representado na Figura 6. O coeficiente de determinação foi de

0,9994, que é satisfatório para considerar que o método gera resultados proporcionais às concentrações (CHASIN *et al.*, 1998). O intervalo das concentrações foi estabelecido de acordo com grupos controle determinados por alguns autores (BREGA *et al.*, 1991; GHITTORI *et al.*, 1996; JONES *et al.*, 1993; KAWAI *et al.*, 1990; KAWAI *et al.*, 1992a; KAWAI *et al.*, 1992b; PEZZAGNO *et al.*, 1988; WANG *et al.*, 1994).

As curvas de calibração foram feitas a cada lote de amostras para possibilitar a quantificação confiável da acetona urinária. A concentração de acetona existente no *pool* de urina utilizado para as adições de padrões foi diminuída dos adicionados antes de usá-los para quantificação nas amostras.

O limite de detecção (LD) para o método foi igual ao limite de quantificação (LQ) de 0,1 mg/L; tal concentração forneceu uma área cerca de três vezes maior que o ruído, com CV de 7%. Alguns autores obtiveram LD menores, cerca de 0,05 mg/L (GHITTORI *et al.*, 1996; JONES *et al.*, 1993; KAWAI *et al.*, 1990; PEZZAGNO *et al.*, 1988), porém estes trabalhos foram desenvolvidos em sistema *on line* ou utilizando o espectrômetro de massa como detector. O limite obtido neste estudo foi considerado satisfatório, pois todas as amostras apresentaram resultados acima deste valor.

A precisão do método (Tabela 6) foi verificada através do estudo intra e interensaio, para os quais foram utilizados *pools* de urina sem adição e fortificado com 1,0 e 3,0 mg/L de acetona, analisando os coeficientes de variação obtidos, respectivamente, de 5,0%; 4,0% e 5,0% (intra-ensaio) e 6,3%; 8,8% e 5,2% (interensaio). Todos os CVs mostraram precisão adequada (CHASIN *et al.*, 1998).

A estabilidade foi avaliada segundo três formas de conservação de amostras de urina: temperatura ambiente, geladeira e freezer. A acetona à temperatura ambiente apresentou ligeira queda em 48 horas, média de 17%, para as

concentrações estudadas: urina sem adição (- 11,8%), enriquecida com 1,0 mg/L de acetona (-25%) e 3mg/L (-16%). Porém, nesta temperatura observou-se aparecimento de picos de outros componentes, provavelmente formados na amostra, com tempos de retenção próximos ao da acetona, o que poderia levar à sobreposição, com perda de resolução e dificultar a integração.

A concentração de acetona na urina não se mostrou estável após 12 horas na geladeira. Neste ambiente ocorreu formação de acetona chegando a uma variação de 800% após 48 horas, para a urina sem adição. Isso é provavelmente devido à redução dos outros corpos cetônicos à acetona, conforme citado por HRADECKY & JAGOS (1978). A medida que a concentração aumenta a alteração do valor de acetona diminui, chegando a 330% a mais, para a urina fortificada com 1 mg/L de acetona e a 7,5% para a maior concentração estudada, 3 mg/L, ambas após 48 horas. Provavelmente, maiores concentrações de acetona deslocam a reação de redução de corpos cetônicos, inibindo sua formação. A acetona em urina permanece estável em geladeira por pelo menos doze horas. Assim, as amostras foram mantidas a esta temperatura até a análise, realizada no mesmo dia da coleta.

Neste estudo, foram avaliados três ciclos de congelamento/descongelamento. A acetona em urina mostrou-se estável por três ciclos nas concentrações estudadas (urina sem adição e fortificada com 1,0 e 3,0 mg/L de acetona). Porém, após o segundo ciclo ocorre formação de substâncias na urina que dificultam a integração e, portanto, a quantificação. Este tipo de estudo não foi encontrado na literatura pesquisada. Em situação de análises rotineiras é interessante saber que as amostras serão estáveis em, pelo menos, dois ciclos de congelamento/descongelamento.

Amostras de urina sem adição e fortificadas com 1,0 e 3,0 mg/L de acetona e congeladas a -20°C , em alíquotas, se mantêm estável por pelo menos dez dias,

com coeficientes de variação, respectivamente de, 6,0%; 8,0% e 5,0% (Tabela 7). Esta seria, portanto, a melhor forma de conservação da acetona urinária, como preconizado por vários autores (BREGA, *et al.*, 1991; FUJINO *et al.*, 1992; GHITTORI *et al.*, 1987; JONES *et al.*, 1993; KAWAI *et al.*, 1990; KAWAI *et al.*, 1992a; SATOH *et al.*, 1996).

Conforme já mencionado, foram avaliados 226 voluntários, dos quais, os resultados de 207 foram utilizados neste trabalho. A saúde dos voluntários foi atestada através dos resultados obtidos nos diversos parâmetros bioquímicos e hematológicos (Tabelas 14 e 15). A maioria dos valores estiveram no intervalo de referência do método usado, sendo que a média de todos estavam de acordo com a referência, indicando que a população foi adequada ao estudo. Os resultados dos valores de acetona urinária sem correção, corrigidos por creatinina, bem como, dados pessoais dos 207 voluntários da população de referência estão representados na Tabela 8.

A concentração média de acetona urinária, em mg/L (1,12) foi semelhante a valores considerados de referência por alguns autores (BREGA *et al.*, 1991; GHITTORI *et al.*, 1996; JONES *et al.*, 1993; KAWAI *et al.*, 1990; KAWAI *et al.*, 1992b; PEZZAGNO *et al.*, 1988; WANG *et al.*, 1994), com teores médios variando entre 0,84 e 3,85 mg/L. Entretanto, estes autores não visaram estabelecer VR para a acetona urinária, não tendo, assim, delineado seus trabalhos para tal. O VR encontrado neste trabalho (em mg/g de creatinina), expresso pela média $\pm$ desvio padrão, está dentro do VR preconizado por LAUWERYYS (1996), <2 mg/g de creatinina.

A análise estatística foi realizada separadamente para concentração de acetona urinária sem correção e corrigida por creatinina.

Os valores de acetona urinária sem correção não mostraram distribuição Gaussiana; por isso, estes valores foram transformados ($\log$ AcU) (Figura 11), conforme preconizado por DUCA, (1992) e POULSEN *et al.*, (1987). Dessa forma, o teste paramétrico *t*-Student para comparação das médias pôde ser utilizado.

Para os dados de AcU sem correção e transformados, não foi possível estabelecer correlação linear com a idade, como ilustra a Figura 13. Não foi encontrada na literatura pesquisada qualquer referência neste aspecto.

Foi detectado conteúdo médio de acetona urinária maior nos voluntários que faziam uso de bebidas alcoólicas em comparação com os que não bebiam. JONES *et al.* (1993) não constataram correlação significativa entre o uso de bebidas e acetona urinária. Porém, estudos realizados por SATOH *et al.*, (1995) demonstraram influência da ingestão de álcool na excreção de AcU em trabalhadores expostos.

Sabe-se que a interação do etanol com outros xenobióticos ocorre, muitas vezes, por alteração do nível da biotransformação e é dependente da quantidade e do tempo de uso da bebida, assim como do nível de exposição ambiental. Através do questionário, não foi possível precisar o tempo de uso ou a quantidade ingerida, pois as informações fornecidas por vários voluntários não foram exatas.

Voluntários do sexo masculino apresentavam nível maior de AcU (mg/L) com relação aos do sexo feminino. Na literatura pesquisada para este trabalho não foi encontrada nenhuma informação a respeito deste fato.

Quanto a variável uso de tabaco não foi detectada diferença nos valores de acetona urinária. Do mesmo modo, WANG *et al.* (1994) não encontraram diferenças significativas entre os valores sanguíneos de acetona em fumantes e não-fumantes.

Como a distribuição dos valores de acetona urinária corrigidos por creatinina também não foi Gaussiana, realizou-se uma transformação - $1/\sqrt{\text{acetona}}$ - nesta situação, foi possível estabelecer correlação negativa entre os valores transformados de acetona na população total e a idade, ainda que não elevada; ou seja, correlação positiva em relação a AcU (mg/g de creatinina).

Não houve diferença significativa quando analisou-se variáveis: tabaco, ingestão de bebidas alcoólicas e sexo.

A ACGIH não recomenda nenhum tipo de correção para expressão dos resultados de acetona urinária, excretada prioritariamente por difusão tubular, e propõe o Limite Biológico de Exposição (BEI) para este bioindicador de 50 mg/L (ACGIH, 2001). Entretanto, LAUWERYS (1996) preconiza a expressão em mg/g de creatinina. O presente trabalho demonstrou que existe correlação linear positiva entre os níveis de acetona sem correção e corrigidos creatinina; porém, os valores das formas de expressão são estatisticamente diferentes.

Apesar de ser um bioindicador inespecífico, a AcU pode ser um bom indicador de dose interna, pois os VR são bastante baixos e assim, distantes dos valores limites biológicos, permitindo diferenciar exposições ocupacionais de intensidades variadas, da não-exposição. Como foi visto, existem fatores fisiológicos e relacionados à dieta que podem elevar a acetona em urina, porém estes valores não ultrapassam 10 mg/L (WANG *et al.*, 1994).

7. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem concluir que:

- O método analítico por cromatografia em fase gasosa e extração por *headspace* para determinação de acetona urinária mostrou-se simples e rápido, com linearidade, limites de detecção e de quantificação e precisão adequados.
- O emprego da coluna Carbowax 745 (30m x 0,53 mm) permitiu a separação cromatográfica adequada da acetona e do n-propanol dos demais interferentes das amostras, possibilitando a quantificação do analito.
- O revestimento da tampa de borracha com papel alumínio, tempo de aquecimento de 20 minutos, temperatura de aquecimento de 90°C, a adição de sulfato de sódio anidro e uso de 2 mL de urina foram as condições mais adequadas para a análise de acetona urinária por *headspace*.
- A melhor forma de conservação de acetona em urina foi o congelamento a -20°C. Essa substância se manteve estável durante dois ciclos de congelamento/descongelamento e, em geladeira, durante doze horas.
- O percentil 95% estabelecido para a acetona urinária foi de 2,20 mg/L e pode ser utilizado para interpretação de resultados de biomonitorização em base individual.
- A distribuição dos valores não transformados de AcU pode ser usada para interpretação de resultados de biomonitorização de trabalhadores expostos quando avaliados como um grupo.

- Das características individuais dos voluntários avaliadas, apenas o sexo e o uso de bebidas alcóolicas parecem afetar significativamente os teores de AcU em indivíduos não expostos ocupacionalmente ao solvente, sendo que homens apresentaram valores superiores às mulheres, da mesma forma que os usuários de bebidas alcóolicas.
- Quando os valores de AcU foram corrigidos por creatinina, verificou-se fraca correlação com a idade dos voluntários.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACGIH - AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS. *Threshold limit values for chemical substances and physical agents. Biological exposure indices*. Cincinnati: ACGIH, 2001.

AITIO, A. Biological monitoring today and tomorrow. *Scand. Work Environm. Health*, Helsink, v.20, p.46-58, 1994.

AKUBUE, P. I.; BAGHO, D.; IHM, W. J.; STOHS, S. J. Excretion of malondialdehyde, formaldehyde, acetaldehyde, acetone and methyl ethyl ketone in the urine of rats given an acute dose of malondialdehyde. *Arch. Toxicol.*, Berlin, v.68, p.338-341, 1994.

ALESSIO, L. Reference values for the study of low doses of metals. *Int. Arch. Environm. Health*, Berlin, v.65, p.S23-S27, 1993.

AMERICAN INDUSTRIAL HYGIENE ASSOCIATION. *n-Propanol isopropanol*. New York, 1978. Hygienic Guide Series.

ANUÁRIO da indústria química brasileira. São Paulo, ABIQUIM, 2000/2001, 408pp.

APOSTOLI, P. Application of reference values in occupational health. *Int. Arch. Environm. Health*, Berlin, v.72, p.191-194, 1999.

APOSTOLI, P. Reference values for xenobiotics in biological matrixes: the state of the art. *G. Ital. Med. Lav.*, Milão, v.16, p.19-24, 1994.

APOSTOLI, P., Reference values for trace elements in biological fluids. *Ann. Ist. Super. Sanita*, Milão, v.31, p.261-274, 1995.

APOSTOLI, P.; ALESSANDRO, G.; PLACIDI, D.; ALESSIO, L. Metabolic interferences in subjects occupationally exposed to binary styrene-acetone mixtures. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v.71, p.445-452, 1998.

ASTRAND, I. Uptake of solvents from the lungs. *Br. J. Ind. Med.*, Londres, v.42, p.217-218, 1985.

BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; HASSOUN, E.; STOHS, S. J. Endrin-induced urinary excretion of formaldehyde, acetaldehyde, malondialdehyde and acetone in rats. *Toxicology*, Limerick, v.75, p.81-89, 1992.

BAILEY, D. N. Detection of isopropanol in acetone-mic patients not exposed to isopropanol. *Clin. Toxicol.*, Omaha, v.28, n.4, p.459-466, 1990.

BARTOLUCCI, G. B.; MARANELLI, G.; PAVAN, I. Aspetti metodologici nella produzione dei valori di riferimento. IN: APREA, C.; SCIARRA, G.; FIORENTINO, M. L.; MINOIA, C. *I valori di riferimento e i valori limite nella prevenzione ambientale e occupazionale*. Milão: Morgan, 1995. p. 131-142.

BERLIN, A. International seminar on the assessment of toxic agents at the workplace: roles of ambient and biological monitoring. *Int. Arch. Environm. Health*, Berlin, v.50, p.197-207, 1982.

BEZENER, P. D.; NETERLENBOS, J. C.; MULDER, C.; THEUNE, J. A.; STAMHUIS, I. H.; STRAUB, J. P. D. Determining reference ("normal") limits in medicine: an application. *Statistics in Medicine*, Amsterdam, v.2, p.191-198, 1983.

BRADY, J. F.; LI, D.; ISHIZAKI, H.; LEE, M.; NING, S. M.; XIAO, F.; YANG, C. S. Induction of cytochromes P450IIE1 and P450IIB1 by secondary ketones and role of P450IIE1 in chloroform metabolism. *Toxicol. Applied Pharmacol.*, San Diego, v.100, p.342-349, 1989.

BRASIL. Ministério do Trabalho - Secretaria de Segurança e Medicina do Trabalho. Álcool isopropílico. [Brasília], ficha toxicológica n.66, 1988.

BREGA, A.; VILLA, P.; QUADRINI, G.; QUADRI, A.; LUCARELLE, C. High-performance liquid chromatographic determination of acetone in blood and urine in the clinical diagnostic laboratory. *J. Chrom.*, Amsterdam, v.553, p.249-254, 1991.

BRUGNONE, F.; PERBELLINI, L.; APOSTOLI, P.; BELLOMI, M.; CARETTA, D. Isopropanol exposure: environmental and biological monitoring in a printing works. *Br. J. Ind. Med.*, Londres, v.40, p.160-168, 1983.

BRÜHL, C.; PÖSCHL, U.; CRUTZEN, P. J.; STEIL, B. Acetone and PAN in the upper troposphere: impact on ozone production from aircraft emissions. *Atmos. Environ.*, Oxford, v.34, p.3931-3938, 2000.

BURATTI, M. Problemi di interpretazione degli esami biologico, *Med. Lavoro*, Milão, v. 69, p. 91-93, 1978.

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

CEDERBAUM, A. I.; QURESHI, A.; MESSENGER, P. Oxidation of isopropanol by rat liver microsomes-possible role of hydroxyl radicals. *Bioch. Pharmacology*, Oxford, v.30, p.825-831, 1981.

CHAN, K. M.; WONG, E. T.; MATTHEWS, W. S. Severe isopropanolemia without acetonemia of isopropanol intoxication. *Clin. Chem.*, Washington D.C, v.39, n.9, p.1922-1925, 1993.

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.

CHEMICAL safety data sheets. Cambridge: the Royal Society of Chemistry, 1992. v.5, p.166-170.

COLEMAN, E. C.; CHENG, S.S. Trace composition of volatile compounds from backed potatoes. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v.29, n.1, p.42-48, 1981.

CORDING, C. J.; VALLARO, G. M.; DeLUCA, R.; CAMPORESE, T.; SPRATT, E. A fatality due to accidental PineSol® ingestion. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.24, p.664-667, 2000.

CUNNINGHAM, J.; SHARKAWI, M.; PLAA, G. Pharmacological and metabolic interactions between ethanol and methyl *n*-butyl ketone, methyl isobutyl ketone, methyl ethyl ketone, or ketone in mice. *Fund. Appl. Toxicol.*, Amsterdam, v.13, p.102-109, 1989.

DAY, E. A.; ANDERSON, D. F. Gas chromatographic and mass spectral identification of natural components of the aroma fraction of blue cheese. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v.13, n.1, p. 2-4, 1965.

DELLA ROSA, H. V.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; COLACIOPPO, S. Monitorização ambiental. IN: OGA, S. *Fundamentos de toxicologia*. São Paulo: Atheneu. 1996. p. 136-151.

DeZWART, L. L.; VENHORST, J.; GROOT, M.; COMMANDEUR, J. N. M.; HERMANN, R. C. A.; MEERMAN, J. H. M.; VANBAAR, B. L. M.; VERMEULEN, N. P. E. Simultaneous determination of eight lipid peroxidation degradation products in urine of rats treated with carbon tetrachloride using gas chromatography with electron-capture detection. *J. Chrom. B.*, Amsterdam, v.694, p.277-287, 1997.

DICK, R. B.; SETZER, J. V.; TAYLOR, B. J.; SHUKLA, R. Neurobehavioral effects of short duration exposures to acetone and methyl ethyl ketone. *Br. J. Ind. Med.*, Londres, v.46, p.111-121, 1989.

DIVINCENZO, G.D.; YANNO, F. J.; ASTILL, B.D. Exposure of man and dog to low concentration of acetone vapor. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, v.34, p.329-336, 1973.

DROZD, J.; NOVÁK, J. Headspace gas analysis by gas chromatography. *J. Chromatography*, Amsterdam, v.165, p.141-165, 1979.

DUCA, P. Statistical aspects of the estimation of reference limits. *Sci. Total Environm.*, Amsterdam, v.120, p.155-171, 1992.

DYBAER, R. The theory of reference values, part 6. Presentation of observed values related to reference values. *Clin. Chim. Acta.*, Amsterdam, v.127, p.441F-448F, 1983.

EGLE Jr., J. L. Retention of inhaled acetone and ammonia in the dog. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, v.34, p.533-539, 1973.

EMMETT, E. A. Parosmia and hyposmia induced by solvent exposure. *Br. J. Ind. Med.*, Londres, v.33, p.196-198, 1976.

ENCYCLOPEDIA of chemical technology. Jonh Willey & Sons: New York, 1991. v. 1, p.176-194.

ENCYCLOPEDIA of chemical technology. Jonh Willey & Sons: New York, 1992. p.216-240.

FISEROVA-BERGEROVA, V.; VLACH, J.; SINGHAL, K. Simulation and prediction of uptake, distribution, and exhalation of organic solvents. *Br. J. Ind. Med.*, Londres, v.31, p.45-52, 1974.

FUJINO, A.; SATOH, T.; TAKEBAYASHI, T.; NAKASHIMA, H.; SAKURAI, H.; HIGASHI, T.; MATUMURA, H.; MINAGUCHI, H.; KAWAI, T. Biological monitoring of workers exposed to acetone in acetate fiber plants. *Br. J. Ind. Med.*, Londres, v.49, p.654-657, 1992.

GAVINO, V. C.; VINET, B.; DAVID, F.; GARNEAU, M.; BRUNENGRABER, H. Determination of the concentration and specific activity of acetone in biological fluids. *Anal. Biochem.*, New York, v.152, p.256-261, 1986.

GHITTORI, S.; IMBRIANI, M.; PEZZAGNO, G.; CAPODAGLIO, E. The urinary concentration of solvents as a biological indicator of exposure: proposal for the biological equivalent exposure limit for nine solvents. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J* Akron, v.48, n.9, p.786-790, 1987.

GHITTORI, S.; MAESTRI, L.; MARACCINI, P.; IMBRIANI, M. Acetone in urine as biological index of occupational exposure to isopropyl alcohol. *Ind. Health*, Kawasaki, v.34, p.409-414, 1996.

GROSJEAN, D.; GROSJEAN, E.; CERTLER, A. W. On-road emissions of carbonyls from light-duty and heavy-duty vehicles. *Environ. Sci. Technol.*, Boston, v.35, p.45-53, 2001.

GROSJEAN, D.; MIGUEL, A. H.; TAVARES, T. M. Urban air pollution in Brazil: acetaldehyde and other carbonyls. *Atmos. Environ.*, Oxford, v.24B, p.101-106, 1990.

HAGGARD, H. W.; GREENBERG, L. A.; TURNER, M. The physiological principles governing the action of acetone together with determination of toxicity. *J. Ind. Hyg. Toxicol.*, Baltimore, v.26, p.133-151, 1994.

HALLIER, E.; FILSER, J. G.; BOLT, H. M. Inhalation pharmacokinetics based on gas uptake studies - II. Pharmacokinetics of acetone in rats. *Arch. Toxicol.*, Berlin, v.47, p.293-304, 1981.

HENDERSON, G. S.; McCONNELL, J. C.; EVANS, W. F. J. A comparison of model calculations and measurements of acetone in troposphere and stratosphere. *J. Atmos. Chem.*, Dordrecht, v.8, p.277-298, 1989.

HEWITT, W. R.; MIYAJIMA, H.; CÔTÉ, M. G.; PLAA, G. L. Acute alteration of chloroform-induced hepato- and nephrotoxicity by *n*-hexane, methyl *n*-butyl ketone, and 2,5-hexanodione. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, San Diego, v.53, p.230-248, 1980.

HRADECKÝ, P.; JAGOS, P. Gas chromatography head-space analysis of clinically interesting ketone bodies. *J. Chrom.*, Amsterdam, v.146, p.327-332, 1978.

IKEDA, M. Solvents in urine as exposure markers. *Toxicol. Lett.*, Amsterdam, v.108, p.99-106, 1999.

IOFFE, B. V. New applications of gas chromatographic headspace analysis. *J. Chrom.*, Amsterdam, v.290, p.363-375, 1984.

ISIDOROV, V. A.; ZENKEVICH, I. G.; IOFFE, B. V. Volatile organic compounds in the atmosphere of forests. *Atmos Environ.*, Oxford, v.19, n.1, p.1-8, 1985.

JOHANSON, G. Modeling of respiratory exchange of polar solvents. *Am. Occup. Hyg.*, Oxford, v.35, n.3, p.323-339, 1991.

JONES, A. W. Elimination half-life of acetone in humans: Case reports and review of the literature. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.24, p.8-10, 2000.

JONES, A. W.; ANDERSSON, L. Biotransformation of acetone to isopropanol observed in a motorist involved in a sobriety check. *J. Foren. Sci.*, Filadélfia, v.40, p.686-687, 1995.

JONES, A. W.; SAGARDUY, E.; ARNQVIST, H.J. Concentration of acetone in venous blood samples from drunk drivers, type-I diabetic outpatients, and healthy blood donors. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v.17, p.182-185, 1993.

JONSSON, A.; PERSSON, K. A.; GRIGORIADIS, V. Measurements of some low molecular weight oxygenated, aromatic, and chlorinated hydrocarbons in ambient air and in vehicle emissions. *Environ. International*, Boston, v.11, p.383-392, 1985.

KAMIL, I. A.; SMITH, J. N.; WILLIAMS, R. T. The metabolism of aliphatic alcohols. The glucuronic acid conjugation of acyclic aliphatic alcohols. *Biochemical J.*, London, v.53, p.129-130, 1953.

KAPP Jr. R. W.; BEVAN, C.; GARDINER, T. H. BANTON, M. I; TYLER, T. R.; WRIGHT, G. A. Isopropanol: summary of TSCA test rule studies and relevance to hazard identification. *Reg. Toxicol. Pharmacology*, Orlando, v.23, p.183-192, 1996.

KAWAI, T.; YASUGI, T.; HORIGUCHI, S.; UCHIDA, Y.; IWAMI, O.; IGUCHI, H.; INOUE, O.; WATANABE, T.; NAKATSUKA, H.; IKEDA, M. Biological monitoring of occupational exposure to isopropyl alcohol vapor by urinalysis for acetone. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v.62, p.409-413, 1990.

KAWAI, T.; YASUGI, T.; MIZUNUMA, K.; HORIGUCHI, S.; IGUCHI, H.; IKEDA, M. Curvi-linear relation between acetone in breathing zone air and acetone in urine among workers exposed to acetone vapor. *Toxicol. Letters*. Amsterdam, v.62, p.85-91, 1992a.

KAWAI, T.; YASUGI, T.; UCHIDA, Y.; IWAMI, O.; IKEDA, M. Urinary excretion of unmetabolized acetone as an indicator of occupational exposure to acetone. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v.62, p.165-169, 1992b.

KRASAVAGE, W. J.; O'DONOGHUE, J. L.; DIVINCENZO, G. D. Ketones - acetone. In: CLAYTON, G. D., CLAYTON, F. E. *Patty's Industrial Hygiene and Toxicology*. New York: Wiley-Interscience, 1982. p.4721-4727.

KUCERA, J.; BENCKO, V.; SABBIONI, E.; VANDerVENNE, M. T. Review of trace elements in blood, serum and urine for the Czech and Slovak populations and critical evaluation of their possible use as reference values. *Sci. Total Environ.*, Amsterdam, v.166, p.211-234, 1995.

KUMAGAI, S.; MATSUNAGA, I. Physiologically based pharmacokinetic model for acetone. *Occup. Environ. Med.*, Londres, v.52, p.344-352, 1995.

KUMAGAI, S.; MATSUNAGA, I.; TABUCHI, T. Effects of variation in exposure to airborne acetone and difference in work load on acetone concentration in blood, urine, and exhaled air. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, v.59, p.242-251, 1998.

KUNDU, S. K.; JUDILLA, A. M. Novel solid-phase assay of ketone bodies in urine. *Clin. Chem.*, Wiston-Salen, v.37, n.9, p.1565-1569, 1991.

LAUWERYS, R. R. Acetone. In: *Industrial chemical exposure: Guidelines for biological monitoring*, Biomedical Publications, Davis, p.104-105, 1980.

LAUWERYS, R. R. Occupational toxicology. IN: KLAASEN, C.D., AMADUR, M.O., DOULL'S, J. (eds.). *Casarett & Doull's toxicology: the basic science of poisons*. New York: Mc Millan Publish Company, 1996. p.987-1007.

LEITE, E. M. A. Solventes orgânicos. IN: OGA, S. *Fundamentos de toxicologia*. São Paulo: Atheneu, 1996. p.188-193.

LEWIS, R. J. *Hawley's condensed chemical dictionary*. New York: Van Nostrand Reinhold, 1997. p. 8-9.

LIPARI, F.; DASCH, J. M.; SCRUGGS, W. F. Aldehyde emissions from wood-burning fireplaces. *Environ. Sci. Technol.*, New York, v.18, p.326-330, 1984.

LOGAN, B. K.; GULLBERG, R.G.; ELENBAAS, J. K. Isopropanol interference with breath alcohol analysis: a case report. *J. Forensic Sci.*, Filadélfia, v.39, p.1107-1111, 1994.

LOVEGREN, N. V.; FISHER, G. S.; LEGENDRE, M. G.; SCHULLER, W. H. Volatile constituents of dried legumes. *J. Agric. Food Chem.*, Washington, v.27, n.4, p.851-853, 1979.

MANNING, D. L.; MARKARINEC, M. P.; JENKINS, R. A.; MARSHALL, A. High performance liquid chromatography determination of selected gas phase carbonyls in tobacco smoke. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Easton, v.66, n.1, p.8-11, 1983.

MARHUENDA, D.; PRIETO, M. J.; PERIAGO, J. F.; MARTI, J.; PERBELLINI, L.; CAEDONA, A. Biological monitoring of styrene exposure and interference of acetone co-exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, , Berlin, v.69, p.455-460, 1997.

MINOIA, C.; SARBIONI, E.; APOSTOLI, P.; PIETRA, R.; POZZOLI, L.; GALLORINI, M.; NICOLAU, G.; ALESSIO, L.; CAPODAGLIO, E. Trace element reference values in tissues from inhabitants of european community - I. A study of 46 elements in urine, blood and serum of italian subjects. *Sci. Tot. Environ.*, Amsterdam, v.93, p.89-103, 1990.

NATOWICZ, M.; DONAHUE, J.; GORMAN, L.; KANE, M.; McKISSICK, J.; SHAW, L. Pharmacokinetic analysis of a case of isopropanol intoxication. *Clin. Chem.*, New York, v.31, n.2, p.326-328, 1985.

NELSON, B. K.; BRIGHTWELL, W. S.; MACKENZIE-TAYLOR, D.R.; KHAN, A.; BURG, J. R.; WEIGEL, W. W. Teratogenicity of n-propanol and isopropanol administered at high inhalation concentrations to rats. *Food Chem. Toxicol.*, Oxford, v.26, n.3, p.247-254, 1988.

NIOSH/OSHA - *Occupational safety and health guidelines for chemical hazards* Cincinnati:U.S. Department of Health and Human Services, 1988. n. 89-104, Supplement II-OHG.

NORDBERG, G.; GERHARDSSON, L.; GRANDJEAN, P.; VESTERBERG, O.; WESTER, P.O. The ICOH and IUPAC international program for establish reference values of metals. *Sci. Total Environm.*, Amsterdam, v.120, p.17-21, 1992.

NUNEZ, A. J.; GONZÁLEZ, L. F.; JANÁK, J. Pre-concentration of headspace volatiles for trace organic analysis by gas chromatography. *J. Chrom.*, Amsterdam, v.300, p.127-162, 1984.

ODONE, P.; ZOCCHETTI, C.; GALLUS, G.; CASTOLDI, M. R.; COLOMBI, A. Limiti di riferimento: presupposto indispensabile al monitoraggio biologico. In: BERTAZZI, P.A.; ALESSIO, L.; DUCA, P.G.; MARUBINI. *Monitoraggio biologico negli ambienti de lavoro*. Milão: Franco Angeli, 1988. p.163-173.

ONG, C. N. Reference values and action levels of biological monitoring in occupational exposure. *Toxicol. Letters*, Amsterdam, v.108, p.127-135, 1999.

PALO, V.; ILKOVÁ, H. Direct gas chromatographic estimation of lower alcohols, acetaldehyde, acetone and diacetyl in milk products. *J. Chromat.*, Amsterdam, v.53, p.363-367, 1970.

PAPA, A. J. Propanols. In: *ULLMANN's encyclopedia of industrial chemistry*. Amsterdam: VCH, 1993.

PAPPAS, A. A.; ACKERMAN, B. H.; OLSEN, K. M. Isopropanol ingestion: report of six episodes with isopropanol and acetone serum concentration time data. *Clin. Toxicol*, Omaha, v.29, p.11-21, 1991.

PERBELLINI, L.; GHITTORI, S. Il monitoraggio biologico delle esposizioni professionali a solventi utilizzando le loro concentrazioni urinarie. *Med. Lav.*, Milão, v.89, p.375-386, 1998.

PETITCLERE, C.; WILDING, P. The theory of reference values. Part 2. Selection of individuals for the procedure of reference values. *Clin. Chim. Acta*, Amsterdam, v.139, p.205F-213F, 1984.

PEZZAGNO, G.; IMBRIANI, M.; GHITTORI, S.; CAPODAGLIO, E. Urinary concentration, environmental concentration, and respiratory uptake of some solvents: effect of work load. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, v.49, n.11, p.546-552, 1988.

PEZZAGNO, G.; IMBRIANI, M.; GHITTORI, S.; CAPODAGLIO, E.; HUANG, J. Urinary elimination of acetone in experimental and occupational exposure. *Scand. J. Work. Environ. Health*, Helsinki, v.12, p.603-608, 1986.

POULSEN, O. M.; HOLST, E.; CHRISTENSEN, J. M. Calculation and application of confidence and tolerance intervals of biological reference values. *Clin. Chim. Acta.*, Amsterdam, v.170, p.1-42, 1987.

SATOH, T.; OMAE, K.; NAKASHIMA, H.; TAKEBAYASHI, T.; MATSUMURA, H.; KAWAI, T.; NAKAZA, M.; SAKURAI, H. Relationship between acetone exposure concentration and health effects in acetate fiber plant workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Hlth*, Berlin, v.68, p.147-153, 1996.

SATOH, T.; OMAE, K.; TAKEBAYASHI, T.; NAKASHIMA, H.; HIGASHI, T.; SAKURAI, H. Acetone excretion into urine of workers exposed to acetone in acetate fiber plants. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v.67, p.131-134, 1995.

SAVOLAINEN, H.; PEKARI, K.; HELOJOKI, H. Neurochemical and behavioral effects of extended exposure to isopropanol vapor with simultaneous ethanol intake. *Chem. Biol. Int.*, New York, v.28, p.237-248, 1979.

SEPPÄLÄINEN, A. M.; HUSMAN, K.; MARTTENSEN, C. Neurophysiological effects of long-term exposure to a mixture of organic solvents. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, v.4, p.304-314, 1978.

SETO, Y. Determination of volatile substances in biological samples by headspace gas chromatography. *J. Chrom. A.*, Amsterdam, v.674, p.25-62, 1994.

SHAH, J. J.; SINGH, H. B. Distribution of volatile organic chemicals in outdoor and indoor air. *Environ. Sci. Technol.*, New York, v.22, n.12, p.1381-1388, 1988.

SIFNIADES, S. Acetone. In: *ULLMANN's encyclopedia of industrial chemistry*. Amsterdam: VCH, 1985. v.A1, p.79-91.

STAPLES, C. A. A screening level examination of the potential risks of acetone in aquatic and terrestrial environments using multi-media modeling. *Chemosphere*, Amsterdam, v.41, p.1529-1533, 2000.

TRAIGER, G. J.; PLAA, G. L. Chlorinated hydrocarbon toxicity-potential by isopropyl alcohol and acetone. *Arch. Environ. Health*, Berlin, v.28, p.276-278, 1974.

TREON, J. F. Isopropyl alcohol, $\text{CH}_3\text{CHOHCH}_3$ (propanol-2). IN: PATTY, F.A. *Industrial hygiene and toxicology*. New York: Wiley-Interscience, 1960. p.4561-4571.

TROTTER, M. D.; SULWAY, M. J.; TROTTER, E. The rapid determination of acetone in breath and plasma. *Clin. Chem. Acta.*, Amsterdam, v.35, p.137-143, 1971.

VAINIO, H.; ZITTING, A. Interaction of styrene and acetone with drug biotransformation enzymes in rat liver. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, v.4, p.47-52, 1978.

VITENBERG, A. G. Methods of equilibrium concentration for the gas chromatographic determination of trace volatiles. *J. Chrom.*, Amsterdam, v.556, p.1-24, 1991.

WANG, G.; MARANELLI, G.; PERBELLINI, L.; RAINERI, E.; BRUGNONE, F. Blood acetone concentration in "normal people" and in exposed workers 16h after the end of the workshift. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v.65, p.285-289, 1994.

WIGAEUS, E.; HOLM, S.; ASTRAND, I. Exposure to acetone-uptake and elimination in man. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, v.7, p.84-94, 1981.

WIGAEUS, E.; LÖF, A.; NORDQVIST, M.B. Uptake, distribution, metabolism, and elimination of styrene in man. A comparison between single exposure and co-exposure with acetone. *Br. J. Ind. Med.*, Londres, v.41, p.539-546, 1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Acetone [*Environmental health criteria n° 207*], Geneva, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Isopropanol [*Environmental health criteria n° 103*], Geneva, 1990.

WYSOCKI, C.; DALTON, P.; BRODY, M. J.; LAWLEY, H. J. Acetone odor and irritation thresholds obtained from acetone-exposed factory workers and from control (occupationally unexposed) subjects. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, v.58, p.704-712, 1997.

ZAHLSEN, K.; ARSTAD, K.; NILSEN, O.G. Inhalation of isopropanol: induction of activating and deactivating enzymes in rat kidney and liver. Increased microsomal metabolism of n-hexane. *Toxicology*, New York, v.34, p.57-66, 1985.

ZAKHARI, S.; LEIBOWITZ, M.; LEVY, P.; AVIADO, D. M. *Isopropanol and ketones in the environment*. Cleveland: CRC Press, 1982. p. 3-35.

ZERVAS, E.; MONTAGNE, X.; LAHAYE, J. Emissions of specific pollutants from a compression ignition engine. Influence of fuel hydrotreatment and fuel/air equivalence ratio. *Atmos. Environ.*, Oxford, v.35, p.1301-1306, 2001.

ZHAO, W.; MISUMI, J.; YASUI, T.; AOKI, K.; KIMURA, T. Effects of methyl ethyl ketone, acetone, or toluene coadministration on 2,5-hexanedione concentration in the sciatic nerve, serum, and urine of rats. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v.71, p.236-244, 1998.

ZHOU, X.; MOPPER, K. Apparent partition coefficient of 15 carbonyl compounds between air and seawater and between air and freshwater; Implications for air-sea exchange. *Environ. Sci. Technol.*, Boston, v.24, p.1864-1869, 1990.

ANEXO I**QUESTIONÁRIO: Valores de referência de bioindicadores****1. DADOS PESSOAIS**

Nome:
Sexo: () M () F Peso aproximado:Kg
Idade:anos
Residência:
rua:N°
bairro:
cidade:
UF:
Telefone:

2. ÁREA DE RESIDÊNCIA

- 2.1. Classificação da área: () urbana (centro)
 () urbana (bairro)
 () rural

- 2.2. Atividades industriais, oficinas, outras fontes poluidoras próximas à residência:

tipo:
nome:
distância aproximada:
tipo:
nome:
distância aproximada:

- 2.3. Intensidade do tráfego vizinho à residência:

() elevado
() moderado
() escasso

3. ATIVIDADE PROFISSIONAL

- 3.1 Setor de trabalho

() agricultura
() estudante
() indústria
() comércio

- ☐ serviço público
- ☐ oficina
- ☐ trabalho doméstico
- ☐ escolas
- ☐ não trabalha
- ☐ outras (especificar):.....

3.2 Tipo de empresa/atividade:

3.3 Tipo de trabalho anterior à ocupação atual:.....

.....

3.4 Jornada de trabalho (h/dia/turno).....

3.5 Eventuais atividade extraordinárias:.....

.....

3.6 Atividades de lazer ou de aulas práticas que envolvam acetona, hexano, metanol, propanol ou metais:

.....

.....

.....

...

4. HÁBITOS ALIMENTARES E TABAGISMO

4.1 Tipo de dieta (última semana)

- ☐ rica em gorduras
- ☐ rica em proteínas (carnes, ovos, soja...)
- ☐ rica em carboidratos (açúcar, pão, batata, arroz, massas...)
- ☐ vegetais frescos nos 2 últimos dias. Quais?.....
- ☐ frutas 2 últimos dias. Quais?
- ☐ adoçantes (aspartame)? ☐ sim ☐ não frequência?.....

4.2 Consumo de bebidas alcoólicas (última semana)

tipo:.....

freqüência:.....

quantidade:.....

4.3 Consumo de bebidas não-alcoólicas (última semana)

- ☐ refrigerantes. Quais?

freqüência:
() suco de frutas. Quais?.....
freqüência.....

4.4 Outras bebidas e freqüência de ingestão (última semana)

() café
() chá
() outras (especificar)

4.5 Uso de tabaco

tempo de uso:.....
quantidade/dia:.....
ex-fumante:.....

5. USO DE MEDICAMENTOS E QUEIXAS RELATIVAS AO ESTADO DE SAÚDE

5.1 Tipos de medicamentos e freqüência (último mês):.....

.....
.....
.....

5.2 Queixas relativas ao estado de saúde (último mês):

.....
.....
.....
.....
.....

5.3 Está de dieta de emagrecimento?

() sim () não

5.4 Existe algum caso de *diabetes* na família?

() não () sim - qual o parentesco?

ANEXO II**TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS INFORMAÇÃO**

I- Dados de identificação sobre o voluntário da pesquisa

Nome do
voluntário:.....
Documento de Identidade N°:..... sexo: ()M ()F
Data de nascimento:...../...../.....
Endereço:.....
N°:.....
Apto:..... Bairro:.....
Cidade:.....
CEP:.....
Telefone:.....

II- Dados sobre a pesquisa

1. Título do protocolo de pesquisa: "Valores de referência de acetona urinária em humanos".

2. Pesquisadora: Danielle Palma de Oliveira
Cargo/função: farmacêutica-bioquímica
Inscrição no Conselho Regional de Farmácia: 11.669
Documento de identidade N°: 26.239.503-4/SSP-SP
Departamento da FCF/USP: Análises toxicológicas

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA: RISCO MÍNIMO

4. Duração da pesquisa: um ano

III- Explicações da pesquisadora aos voluntários sobre a pesquisa

1. Justificativa e objetivos da pesquisa: o objetivo desta pesquisa é o estabelecimento dos valores de referência de acetona urinária em humanos, que é importante na monitorização de trabalhadores expostos à acetona e ao isopropanol.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos: serão coletadas amostras de sangue e urina. A amostra de sangue será utilizada para a realização dos exames

Danielle Palma de Oliveira

bioquímicos e hematológicos, e a amostra de urina será utilizada para a realização do exame de urina tipo I e para a determinação da acetona urinária.

3. Desconfortos e riscos esperados: o voluntário está sujeito a hematomas e nervosismo, podendo se sentir mal devido à retirada de sangue. A quantidade de sangue retirada (aproximadamente 15 mL) não oferece risco a saúde do voluntário.

4. Benefícios: o voluntário receberá os resultados de todos os exames realizados gratuitamente.

IV- Esclarecimentos sobre as garantias do voluntário da pesquisa

1. O voluntário terá livre acesso aos procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa a qualquer tempo, inclusive esclarecimento de qualquer dúvida relacionada à pesquisa.

2. O voluntário tem liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo.

3. Todos os dados do voluntário serão mantidos em completo sigilo, sendo garantidas a confiabilidade e privacidade.

V- 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.

Alfenas, de de

Assinatura do voluntário

Assinatura da pesquisadora

ANEXO III

Parâmetros hematológicos e bioquímicos

parâmetro	Kit/método	bibliografia
número de hemácias	automatizado	Coulter Micro Diff II
hematócrito	automatizado	Coulter Micro Diff II
hemoglobina	automatizado	Coulter Micro Diff II
leucograma	esfregaço em lâmina (coloração May Grunwald Giensa)	
Bilirrubina total e frações	Labtest® (Sims-Horn)	SIMS, F.H., HORN, <i>C.Am.J.Clin. Path.</i> 1958; 29:412 e outros
Alanina transaminase e aspartato transaminase	Labtest® (cinética-UV)	BASQUES, J.C.A XXI <i>Congresso brasileiro de patologia clínica.</i> São Paulo; 1987 e outros
uréia	Labtest® (enzimático-UV)	BERGMEYER, H. U. <i>Method of enzymatic analysis</i> , 3ª ed., v. 8, p. 444-449, VHC, Deerfield Beach, 1985 e outros
creatinina	Labtest® (picrato)	HENRY, R. J., CANNON, D.C., WINKELMAN, J.W. <i>Clinical Chemistry.</i> Principles and Technics. 2ª Nova York. 1974 e outros
Colesterol total	Bioclin®	ALLAIN, C. C., <i>et al.</i> <i>Clin.Chem.</i> p. 20-470, 1974. TONKS, D. B., Quality Control in Clinical Laboratories, 1982 e outros.
glicose	Bioclin® (enzimático)	TRINDER, P., <i>Na. Clin.</i> <i>Biochem.</i> , n. 6, p.24, 1969 TONKS, D.B., Quality Control in Clinical Laboratories, 1983 e outros.

Triglicerídeos	Bioclin®	BUCOLO, G., DAVID, H., <i>Clin. Chem.</i> , 476pp, 1973. TONKS, D. B., Quality Control in Clinical Laboratories, 1982 e outros.
Proteínas totais	Labtest® (biureto)	HENRY, R. J., CANNON, D.C., WINKELMAN, J.W. <i>Clinical Chemistry.</i> Principles and Technics. 2ª Nova York. 1974 e outros

ANEXO V
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
ESCOLA DE FARMÁCIA E ODONTOLOGIA DE ALFENAS

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

DECLARAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas declara para os devidos fins que se fizerem necessários que o projeto **“Valores de referência de acetona em humanos”** da **Profa. Dra. Maria Elisa P. B. de Siqueira** foi devidamente apreciado e aprovado por este Comitê.

Por ser verdade, firmo a presente Declaração.

Alfenas, 13 de novembro de 2000.

Profa. Elisabeth Pizzamiglio Vieira

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da Efoa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 580 - CEP: 05508-900
Tel. (011) 818-3677 - Fax: (011) 211-8986

Assistência Acadêmica
Of. CEP nº 18

São Paulo, 07 de abril de 2000.

Prezada Senhora

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada no dia 27 de março p.p., após apreciar o projeto "Valores de referência de acetona em humanos" apresentado por V.Sa., resolveu **aprovar** o citado projeto, devendo apenas substituir o Termo de Consentimento adequando-o ao modelo do CEP/FCF, bem como apresentar esclarecimento sobre a fonte financiadora da pesquisa e a previsão de ressarcimento de gastos aos indivíduos da pesquisa.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Dulcinéia Saes Parra Abdalla
Coordenadora do CEP/FCF

Ilma. Sra.
Danielle Palma Oliveira
Pós-Graduanda do FBC