UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós Graduação em Toxicologia e
Análises Toxicológicas

**Validação e aplicação de métodos para análise de amostras de
fenol em urina de trabalhadores e no ar do ambiente de trabalho**

Tiago Severo Peixe

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Henrique Vicente Della Rosa

São Paulo
2006

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós Graduação em Toxicologia e
Análises Toxicológicas

**Validação e aplicação de métodos para análise de amostras de
fenol em urina de trabalhadores e no ar do ambiente de trabalho**

Tiago Severo Peixe

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

Orientador:
Prof. Dr. Henrique Vicente Della Rosa

São Paulo
2006

Tiago Severo Peixe

Validação e aplicação de métodos para análise de amostras de fenol
em urina de trabalhadores e no ar do ambiente de trabalho

Comissão Julgadora
Da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre.

Prof. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento
Orientador/presidente

1 °examinador

2 °examinador

São Paulo, 04 de agosto de 2006.

“Desde a idade de seis anos eu tinha a mania de desenhar a forma dos objetos. Por volta dos cinqüenta havia publicado uma infinidade de desenhos, mas tudo o que produzi antes dos sessenta não deve ser levado em conta. Aos setenta e três compreendi mais ou menos a estrutura da verdadeira natureza, as plantas, as árvores, os pássaros, os peixes e os insetos. Em conseqüência, aos oitenta terei feito ainda mais progresso. Aos noventa penetrarei no mistério das coisas; aos cem, terei decididamente chegado a um grau de maravilhamento – e quando eu tiver cento e dez anos, para mim, seja um ponto ou uma linha, tudo será vivo.”

(Katsuhika Hokusai, sécs. 18 - 19)

Aos meus pais, pelo apoio e amor inconstantes, aos irmãos pelo companheirismo e contribuições, por ensinarem a arte do respeito e humildade junto aos homens.

Ao Prof. Dr. Henrique Vicente Della Rosa, pela orientação e paciência, mais que um Mestre, um amigo.

À Profa. Dra. Elizabeth de Souza Nascimento, pelo incentivo e receptividade, bem como pela demonstração de profissionalismo, perspicácia e entusiasmo.

A Deus, pela força, saúde e vida.

AGRADECIMENTOS

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

Aos Professores do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas pelos ensinamentos.

À Fundacentro (Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Saúde e Segurança do Trabalho) pelo apoio logístico e oportunidade de realização do trabalho.

Ao Professor Ailton Shafranski, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, pelo incentivo e por me apresentar a apaixonante área da Toxicologia.

Aos Professores Ana Paula de Melo Loureiro, Sérgio Colacioppo e Cláudia Regina dos Santos pelas sugestões e comentários feitos no exame de qualificação.

Aos Prof. Dr. Mauricio Yonamine e Prof. Dr. Ernani Pinto Junior pelo apoio na área analítica do trabalho e amizades desprendidas.

Aos colegas do Programa de Pós-Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas: Virgínia, Fabriciano, Alexandre, Igo, Silvio, Emerson, Danielle, Vânia, Fabiana, Alziana, Daniele, Simone, Renata, Zé Luiz, Sandra, Sidnei, e outros, pelo companheirismo e convivências agradáveis.

Aos amigos Rodrigo Spricigo, Fabriciano Pinheiro, Sidnei Moura, George Gualter, Renato Santana e Caesar, pela amizade e momentos agradáveis na república estudantil.

Aos amigos Pedro Fábio Ferreira, Hugo Cristiano, Emerson Augusto, Leandro Fonseca, Marcel Tonon Alves e demais colegas Farmacêuticos pelas palavras de conforto e vibrações positivas na busca pela felicidade pessoal e profissional.

Aos colegas professores da Universidade do Grande ABC, Luiz, Fátima, Roberto, Márcia, Milton e Miguel pela troca de experiências, respeito e amizade.

Ao estimável amigo sociólogo, advogado, matemático e economista Rolf Christian Zornig pela amizade.

Aos funcionários do Laboratório de Análises Toxicológicas LAT/USP meu agradecimento pela indubitável presteza.

A todos que contribuíram para a realização deste trabalho de pesquisa.

E aqueles que acreditam na área da Toxicologia, seu papel na comunidade e a importância Científica nacional e internacional.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	ii
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	iv
RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	05
2.1 Resinas Fenólicas.....	05
2.1.1 Propriedades Físico-químicas.....	05
2.1.2 Toxicidade das resinas fenólicas.....	08
2.1.2.1 Em animais.....	08
2.1.2.2 Em humanos.....	09
2.2 Fenol.....	10
2.2.1 Propriedades físico-químicas.....	10
2.2.2 Toxicidade do fenol.....	12
2.2.3 Toxicocinética.....	13
2.2.4 Toxicodinâmica.....	15
2.3 Indicadores biológicos de exposição (BEIs®).....	15
2.3.1 Parâmetros da NR-7.....	16
2.4 Limites de exposição (TLVs®).....	16
2.4.1 TLV-TWA® (Time Weighted Average)	17
2.4.2 STEL® (Short Time Exposure Limit).....	17
2.4.3 Parâmetros da NR-15	18
3 OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 População estudada.....	20
4.1.1 Descrição do ambiente de trabalho.....	21
4.2 Material.....	24
4.2.1 Solventes e reagentes.....	24

4.2.2 Padrões de referência.....	24
4.2.3 Equipamentos, vidrarias e acessórios.....	25
4.3 Métodos Analíticos.....	25
4.3.1 Amostras de ar do ambiente de trabalho.....	25
4.3.1.1 Coleta de amostras de ar.....	25
4.3.1.2 Determinação de fenol no ar.....	28
4.3.1.3 Método usada na análise do material coletado.....	28
4.3.1.4 Validação do método cromatográfico para determinação do fenol no ar por CG/FID, empregando-se tubos adsorventes tipo XAD.....	29
4.3.1.4.1 Limite de detecção e Limite de quantificação.....	29
4.3.1.4.2 Linearidade.....	30
4.3.1.4.3 Precisão intra-ensaio e inter-ensaio.....	30
4.3.1.4.4 Coeficiente de desorção para o ar.....	30
4.3.2 Amostras de urina de trabalhadores.....	31
4.3.2.1 Coleta de amostras de urina.....	31
4.3.2.2 Determinação do fenol na urina.....	31
4.3.3.3 Soluções – padrão.....	31
4.3.3.4 Método proposto para extração do fenol em urina.....	32
4.3.2.5 Validação do método para determinação da concentração de fenol em urina por CG-FID, empregando a técnica de extração líquido-líquido.....	33
4.3.2.5.1 Especificidade e seletividade.....	34
4.3.2.5.2 Linearidade.....	34
4.3.2.5.3 Limite de detecção e Limite de quantificação.....	35
4.3.2.5.4 Precisão intra-ensaio e inter-ensaio.....	35
4.3.2.5.5 Recuperação.....	35
4.3.2.5.6 Estabilidade.....	36
4.3.3 Determinação da densidade e da creatinina urinária.....	36
4.3.4 Otimização das condições cromatográficas.....	37
5 RESULTADOS.....	38
5.1 Determinação de fenol no ar do ambiente de trabalho.....	38

5.1.1 Otimização das condições cromatográficas na determinação de fenol no ar.....	38
5.1.2 Linearidade para o fenol no ar.....	39
5.1.3 Limite de detecção e quantificação para o fenol no ar.....	40
5.1.4 Coeficiente de desorção para o ar.....	41
5.1.5 Precisão intra-ensaio e interensaio para o fenol no ar.....	41
5.2 Determinação de fenol na urina de trabalhadores.....	41
5.2.1 Otimização das condições cromatográficas para determinação do fenol urinário.....	41
5.2.2 Linearidade para o fenol urinário.....	43
5.2.3 Limite de detecção e quantificação para o fenol urinário.....	44
5.2.4 Precisão intra-ensaio e interensaio para o fenol urinário.....	44
5.2.5 Recuperação para o fenol urinário.....	44
5.2.6 Estabilidade.....	44
5.3 Descrição do local de avaliação.....	45
5.4 Resultados observados quanto aos questionários.....	45
5.4.1 População da área de macharia.....	45
5.4.2 População da área de fusão e vazamento.....	46
5.4.3 População controle.....	46
5.5 Resultados observados para determinação de fenol no ar do ambiente de trabalho.....	46
5.6 Resultados observados para determinação de fenol na urina de trabalhadores considerados controles e expostos.....	47
6 DISCUSSÃO.....	48
7 CONCLUSÕES.....	52
8 RECOMENDAÇÕES.....	52
9 REFERÊNCIAS.....	53
10 ANEXOS.....	60
10.1 ANEXO 1 - Determinação da creatinina urinária e da gravidade específica dos trabalhadores da fundição e macharia.....	60
10.2 ANEXO 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido.....	61

10.3 ANEXO 3 – Questionário de hábitos alimentares, consumo de medicamentos e estado de saúde.....	66
10.4 ANEXO 4 – Folha de campo para coleta de amostras ambientais – FUNDACENTRO/SP.....	68
10. 5 ANEXO 5 - Artigo submetido e aprovado pelo Comitê Editorial da Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – RBCF a ser publicado no corrente ano.....	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – concentrações de produtos químicos gerados a partir da produção de moldes (machos).....	05
Tabela 2 – Propriedades físico-químicas do fenol.....	11
Tabela 3 - Parâmetros da NR-7.....	16
Tabela 4 – Parâmetros da NR-15.....	18
Tabela 5 – Valores obtidos em três replicatas utilizados na determinação de fenol no ar.....	40
Tabela 6 – Coeficiente de desorção para o ar.....	41
Tabela 7 – Precisão intra e interensaio obtido nas análises de fenol no ar.....	41
Tabela 8 - Valores de fenol urinário obtidos em triplicata utilizados para a construção da curva analítica.....	43
Tabela 9 – precisões intra e interensaio obtidas nas análises de urinário.....	44
Tabela 10 – Porcentagem de recuperação do fenol adicionado na urina	44
Tabela 11 – Estudo da estabilidade do fenol urinário à 50 µg/mL, mantido em geladeira a 4 °C.....	45
Tabela 12 – Estudo da estabilidade do fenol urinário à 50 µg/mL, mantido em freezer a – 20°C.....	45
Tabela 13 - Valores das concentrações para determinação de fenol no ar do ambiente de trabalho.....	46
Tabela 14 - Valores das concentrações para determinação de fenol na urina dos trabalhadores considerados expostos e controle.....	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Reação de polimerização dos fenóis contidos nas resinas fenólicas.....	7
Figura 2: Preenchimento feito pelo molde (macho) na peça metálica pós-vazamento do metal fundido.....	7
Figura 3 - Exemplo de preparo de molde em casca à base de resinas fenólicas (<i>shell cast molding</i>).....	8
Figura 4 - Exemplo de preparo de molde em caixa de macho à base de areia + resinas fenólicas.....	8
Figura 5 - Principais vias de Biotransformação do fenol no organismo.....	14
Figura 6 - Trabalhadores em área de fundição (vazamento e fusão).....	22
Figura 7 - Trabalhadores em área de macharia.....	22
Figura 8 – Planta do galpão de fundição com os setores de fundição (fusão e vazamento) e macharia.....	23
Figura 9 - Trabalhador na área de macharia – rebarbador.....	27
Figura 10 – Bomba portátil acoplada a uma resina adsorvente XAD 7 para coleta de amostra de ar ambiental.....	27
Figura 11 – Calibrador primário para procedimento de calibração das bombas amostradoras.....	27
Figura 12 – Local de coleta em ponto fixo. Área de macharia.....	27
Figura 13 – Coleta em zona respiratória de trabalhador (macharia)	28
Figura 14 – Fluxograma do método para determinação do fenol no ar coletado em tubos adsorventes tipo XAD (NIOSH 2546, 1994)..	29
Figura 15 - Marcha analítica usada na determinação de fenol urinário	32

Figura 16 - Cromatograma obtido do extrato controle de resinas XAD (submetido ao procedimento analítico descrito no item **4.3.1.3**, nas condições padronizadas) contendo padrão interno (nitrobenzeno – 0,26 ppm).....38

Figura 17 - Cromatograma obtido do extrato controle de resinas XAD adicionadas com fenol na concentração de 0,26 ppm e padrão interno nitrobenzeno – 0,26 ppm, submetido ao procedimento analítico descrito no item **4.3.1.3** nas condições padronizadas para amostras de ar.....39

Figura 18 - Curva analítica utilizada na determinação de fenol no ar..... 40

Figura 19 - Cromatograma do extrato de urina controle (submetido ao procedimento analítico descrito no item 4.3.2.4, nas condições padronizadas, contendo padrão interno).....42

Figura 20 - Cromatograma do extrato de urina controle (submetido ao procedimento analítico descrito no item **4.3.2.4**, nas condições padronizadas), adicionadas com fenol na concentração de 50 µg/mL e nitrobenzeno 50 µg/mL.....42

Figura 21 - Curva analítica d a determinação de fenol.....43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACGIH - AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS (Conferência Americana de Higienistas Industriais Governamentais).

BEI – BIOLOGICAL EXPOSURE INDICATOR (Indicador Biológico de Exposição).

CHEMINFO – CHEMISTRY INFORMATION (Informações Químicas) - IRIS.

CYP2E1 - CITOCROMO **P-450** FAMÍLIA **2** SUB-FAMÍLIA **E** GENE **1**.

CV – COEFICIENTE DE VARIAÇÃO.

DL₅₀ – DOSE LETAL 50%.

DNA – ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLÉICO.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (Agência de Proteção Ambiental Americana).

EPI - EQUIPAMENTO DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL

GC/FID - CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA COM DETECÇÃO DE IONIZAÇÃO POR CHAMA.

HPA's – HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS.

IBMP – ÍNDICE BIOLÓGICO MÁXIMO PERMITIDO.

IRIS - INTEGRATED RISK INFORMATION SYSTEM (Sistema Integrado de Informação de Risco).

L. D. – LIMITE DE DETECÇÃO.

L. Q. – LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO.

NIOSH – NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH (Instituto Nacional de Saúde e Segurança do Trabalho).

NQ01 - QUINONA OXIDOREDUTASE.

NR7 - NORMA REGULAMENTADORA nº7.

NR9 - NORMA REGULAMENTADORA nº9.

NR15 – NORMA REGULAMENTADORA nº 15.

MAC - MAXIMUM ALLOWABLE CONCENTRATION (Concentração Máxima Permitida).

OEL - OCCUPATIONAL EXPOSURE LIMIT (Limite de Exposição Ocupacional).

OPS – ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE.

PCMSO - PROGRAMA DE CONTROLE MÉDICO e SAÚDE OCUPACIONAL.

PI – PADRÃO INTERNO.

PPRA - PROGRAMA DE PREVENÇÃO A RISCOS AMBIENTAIS.

PV – PRESSÃO DE VAPOR.

REBLAS - REDE BRASILEIRA DE LABORATÓRIOS.

RNA – ÁCIDO RIBONUCLÉICO.

SPE – SOLID PHASE EXTRACTION (Extração em Fase Sólida)

STEL - SHORT-TERM EXPOSURE LIMIT (Limite para Exposição de Curta Duração).

TLV - THRESHOLD LIMIT VALUE (Limite de Exposição Ocupacional).

TWA - TIME-WEIGHTED AVERAGE (Média Ponderada pelo Tempo de Exposição).

TLV-C - THRESHOLD LIMIT VALUE-CEILING (Limite de Exposição Ocupacional).

VR – VALOR DE REFERÊNCIA.

XAD – RESINA ADSORVENTE DE SÍLICA AMBERLITE (SKC INC[®])

RESUMO

O fenol é utilizado na indústria como agente desinfetante, no preparo de resinas fenólicas e pigmentos de tintas. Apresenta-se no estado sólido à temperatura ambiente, com coloração fracamente rósea, odor acre e é higroscópico. Na exposição ocupacional aguda o composto pode levar a lesões eritematosas e sensação de calor, cronicamente, afetar a maturação celular no compartimento medular ósseo devido à formação de 1,4-benzoquinona. Os monitoramentos ambiental e biológico possuem relevância nas situações de exposições ocupacionais. O objetivo do trabalho foi validar e aplicar métodos apropriados na determinação de fenol em amostras de ar do ambiente de trabalho e urinas provenientes de trabalhadores do setor de macharia de uma indústria de peças sanitárias. Amostras de urina e ar foram analisadas, permitindo-se verificar a aplicação dos métodos cromatográficos para determinação de fenol.

Palavras chaves: Fenol; Resinas fenólicas; Cromatografia em fase gasosa; Monitoramento biológico; Monitoramento ambiental; Fundição.

ABSTRACT

Phenol is used as an industrial disinfectant agent, in the preparation of phenolic resins and paint pigments. When in solid state, it shows a light pink color, ocre odor and is hygroscopic. In acute occupational exposure, the compound can produce erythemic injuries and burn sensation and, chronically, affect the cellular maturation of bone marrow due the 1,4-benzoquinone. Environmental and biological monitoring are important in occupational exposure situations. The aim of this work was to validate a method to be applied in the determination of phenol concentration in air samples originated from work environment and urines taken from molding area workers at a sanitary devices foundry. Urine and air samples were analyzed, showing application of chromatography methods in phenol quantification.

Key Words: Phenol; Phenolic resins; Gas chromatography; Biological monitoring; Environmental monitoring; Foundry.

1 INTRODUÇÃO

As doenças associadas aos compostos tóxicos em ambientes de trabalho, vêm sendo reconhecidas a centenas de anos. Como exemplo, efeitos tóxicos do chumbo, tais como cólicas abdominais, anemias e paralisias musculares foram relatadas por gregos e romanos desde a antiguidade (WILLAMS *et al.*, 2000).

No século XVII, Bernadino Ramazzini (1633-1717), também chamado “o pai da medicina do trabalho”, em seu primeiro livro intitulado ***De Morbis Artificum Diatriba***, descrevia doenças ocupacionais e orientava médicos da época sobre doenças em indivíduos, relacionadas a atividades específicas em ambientes de trabalho (FUNDACENTRO, 1999).

No cenário atual, com todos os avanços científico-tecnológicos, ainda podem ser identificadas diversas formas e situações em que o trabalhador, em suas atividades laborais, encontra-se exposto a agentes químicos e, em decorrência destes, pode desenvolver a curto ou longo prazo, doenças ocupacionais (COLACIOPPO, 2003).

Na década de setenta, o Ministério do Trabalho publicou uma série de Normas Regulamentadoras (NR), destacando-se, as NR-7 e NR-9, que estabelecem, respectivamente, os parâmetros mínimos e as diretrizes gerais que serviram como base para, em 1994, a implantar os Programas de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO) e de Prevenção de Riscos Ambientais (PPRA) que vigoram nos dias atuais (BRASIL, 1978 , BRASIL, 1994).

A segurança e a saúde dos trabalhadores podem ser implantadas por meios de medidas e princípios de ação preventiva, tais como, evitar riscos, avaliar aqueles que não podem ser evitados, combater os riscos em sua origem, adaptar o trabalho ao indivíduo, atualizar o processo laboral de

acordo com a evolução tecnológica, substituir substâncias químicas por outras de menor toxicidade, planejar formas de prevenção, priorizar equipamentos de proteção coletiva em detrimento do individual e educar os trabalhadores (OPAS, 2004).

A ACGIH publica anualmente a relação dos limites de exposição ocupacional (TWA[®]) e limites biológicos de exposição (BEI's[®]), os quais são considerados no processo de avaliação da exposição a xenobióticos (ACGIH, 2005).

A ocorrência de efeitos adversos atribuídos a um toxicante, sob condições específicas, depende de: (I) das propriedades intrínsecas ou toxicidade, (II) seus usos e a correspondente exposição a diversos níveis e doses; e (III) da susceptibilidade dos indivíduos expostos (MUTTI, 1999).

A avaliação ambiental determina as concentrações dos xenobióticos no ar dos ambientes de trabalho, e é realizada visando avaliar e controlar a exposição às substâncias químicas (LAUWERYS, 1996).

A avaliação biológica – determinação de agentes químicos ou seus produtos de biotransformação em tecidos, secreções, excreções, ar exalado ou qualquer combinação destes para avaliar a exposição e o risco à saúde quando comparados com uma referência apropriada – possui papel relevante e complementar nas informações sobre situações de exposições laborais (VAINIO, 1998; MUTTI, 1999; VIAU, 2002).

Tais procedimentos de monitorização requerem estudos prévios de reconhecimento e avaliação frente a padrões existentes, para posterior proposta de controle, ou seja, um conjunto de ações destinadas a eliminar, quando possível, ou reduzir, a exposição ocupacional a um nível aceitável e compatível com a manutenção e promoção da saúde (FARIA, 2003).

Deste modo, na prática de avaliações ocupacionais são estabelecidos valores limites para a exposição a agentes químicos. Os níveis de exposição no ambiente de trabalho podem ser estimados e expressos em termos de concentrações atmosféricas, além da determinação de níveis do xenobiótico, de seus metabólitos ou de ligações a moléculas alvo em fluidos biológicos do trabalhador exposto (LAUWERYS, 1996).

A utilização de resinas fenólicas, na indústria de fundição, data da década de 1950 (BALMGÄRTEL, 1984). Segundo estatísticas da Associação Canadense de Produtores de Plásticos a produção nos anos de 2003 e 2004 de resinas fenólicas foi 4,5 milhões de toneladas/ano (APC - PLASTICS INDUSTRY PRODUCERS, 2004).

O processo usado na manufatura de moldes requer materiais moldantes, ligantes ou aglutinantes, compactantes e aceleradores de enrijecimento, com o intuito de manter a estabilidade e a resistência à compressão (MIRER, 1998).

Devido às suas diversas composições químicas, as resinas podem conter compostos voláteis, tais como fenol e formaldeído, os quais são lançados no ambiente em função da decomposição térmica dos insumos usados no preparo e processamento dos moldes (NIOSH, 1976; RUDMAN, K. B., 2000).

Alguns trabalhos, publicados nos últimos anos na literatura científica, apontam efeitos atribuídos ao fenol, tais como, dermatite de contato e irritação respiratória, em indivíduos expostos a resinas fenólicas (KANERVA *et al.*, 1994; ZIMERSON & BRUZE, 1997; OWEN & BECK, 2001; ISAKSSON, 2002; BOATTO, 2004).

O vapor de fenol causa corrosão ocular, dérmica e no trato respiratório. Além disso, o fenol é prontamente absorvido por via cutânea levando à desnaturação e precipitação protéica. Tal quadro reflete sua toxicidade aguda e, do ponto de vista de exposição crônica, pode levar ao aparecimento de lesões no sistema nervoso central (SNC), cardiovascular, renal e depressão na medula óssea (OSHA, 2001; CHEMINFO, 2003; BOATTO, 2004).

O objetivo do presente trabalho é validar e aplicar métodos para a determinação de fenol no ar e em urina de trabalhadores, a fim de avaliar a exposição ao composto, na etapa de preparo do molde em fundições, utilizando-se a técnica de cromatografia em fase gasosa com detector de ionização por chama (CG/FID).

2 REVISÃO DA LITERATURA

Embora sejam utilizados, em fundições, moldes produzidos a base de resina fenólica e areia, poucos são os artigos científicos disponíveis associando a formação de fenol no preparo dos moldes e suas implicações à saúde humana (MARIOTO, 1992; MARIOTO, 1994).

De acordo com RUDMAN (2000) os compostos gerados na produção de moldes são o fenol, seguido por benzeno, HPA's e compostos inorgânicos como SO₂ e H₂S (Tabela1).

Tabela 1 Concentrações de produtos químicos gerados a partir da produção de moldes (machos).

Emissão	ppm	Emissão	ppm	Emissão	ppm
NH ₃	39	Benzeno	11209	Fenol	975
Hidrocarbonetos totais	12159	Formaldeído	10	Tolueno	634
NO _x	29	HCN	29	Aminas aromáticas totais	49
SO ₂	15107	m-Xileno	97	Aldeídos totais C ₂ e C ₅	3070
H ₂ S	1462	o-Xileno	49	HPA'S totais	16174
Acroleína	5	Naftaleno	49	Total	44972

Fonte: Adaptado de RUDMAN, 2000.

Segundo o IPCS (2002), o formaldeído poderia degrada-se sob aquecimento a temperaturas maiores que 150 °C, assim o composto não foi considerado no presente estudo como substância alvo, pois o aquecimento no preparo do molde é superior aos 200 °C (THOMSEN, 1994).

2.1 Resinas Fenólicas

2.1.1 Propriedades Físico-químicas

As resinas fenólicas são formadas por polímeros de fenol ou misturas de fenóis e formaldeído. São resistentes ao aquecimento, bons isolantes

elétricos e apresentam características adesivas. A resina para-terc-butilfenol-formaldeído é a usada mais freqüentemente, em função de sua propriedade adesiva. Dentre outros tipos de resina, têm-se: resinas de fenol-formaldeído (PFR-2); resinas de fenol-formaldeído (Novolak[®]) e resinas de monometil-fenol. Em geral, são insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos. Apresentam certa resistência térmica, porém liberam compostos formadores dos polímeros, em média a 200 °C (THOMSE N, 1994).

No preparo de moldes à base de resinas fenólicas utiliza-se a técnica da moldagem em casca (*shell cast molding*). Nesta, a aglutinação da areia é obtida através de um sistema ligante constituído por uma resina fenólica do tipo Novolak[®], à quente. O calor necessário, cerca de 220 °C, é transmitido à mistura areia e resina, por maçaricos. As Figuras 2 e 3 apresentam o preenchimento feito pelo molde (macho) na peça metálica e um exemplo de preparo de molde em *shell* à base de resina fenólica, respectivamente (BAUMGÄRTEL, 1984; MARIOTTO, 1992; MARIOTTO, 1994). Assim, no preparo do molde utiliza-se o processo de vazamento da areia contendo resina fenólica na caixa de macho. Esta é colocada em contato com maçaricos, que fornecem calor ao sistema, possibilitando a formação do macho (Figura 4).

Os moldes em casca (Figura 3) e caixa de macho (Figura 4) encontram grande aplicação em fundição de ligas de latão, por associar precisão dimensional e acabamento superficial excelentes com alta produtividade por modelo, permitindo produção seriada (MARIOTTO, 1994).

Figura 1: Reação de polimerização dos fenóis contidos nas resinas fenólicas.

Fonte: Adaptado de THOMSEN, 1994.

Figura 2: Preenchimento feito pelo molde (macho) na peça metálica pós-vazamento do metal fundido.

Na confecção do molde em caixa de macho, a areia é adicionada à caixa e mantida sob aquecimento com maçarico. Depois de curado, o molde é levado ao setor de rebarba e às demais etapas de produção fabril (MARIOTO, 1984).

Figura 3: Exemplo de preparo de molde em casca à base de resinas fenólicas (*shell cast molding*).

Figura 4: Exemplo de preparo de molde em caixa de macho à base de areia + resinas fenólicas.

2.1.2 Toxicidade das resinas fenólicas

2.1.2.1 Em animais

As resinas fenólicas possuem toxicidade moderada. As doses letais (DL_{50}) são de 2.900 mg/Kg após administração oral por gavagem em ratos e 16 mg/Kg por exposição dérmica (THOMSEN, 1994).

2.1.2.2 Em humanos

Casos de exposição dérmica e toxicidade aguda foram relatados em acidentes ocupacionais, onde os trabalhadores entraram em contato com as resinas fenólicas (THOMSEN, 1994; KANERVA *et al.*, 1994; IAKSSON, 2002).

THOMSEN, 1994 indica um caso de irritação oftálmica severa em um trabalhador de indústria de fundição, este atuava junto à área de macharia. Houve contato direto entre o material empregado na confecção do molde e a mucosa oftálmica, culminando em eritema local e dor intensa na região ocular, o quadro clínico foi caracterizado como conjuntivite química, com posterior opacificação da córnea.

KANERVA *et al.*, 1994 relatam o caso de um trabalhador de fundição que se acidentou derramando na face resina fenólica tipo uréia-fenol-formaldeído. Ele lavou imediatamente a área exposta, porém, uma semana após o acidente, desenvolveu um quadro de eczema na área exposta. Dois anos depois, apresentou febre e insuficiência respiratória. Foi diagnosticado como quadro de alergia bronco-alveolar provocada pelo contato prévio com a resina, e afastado de seu vínculo empregatício.

IAKSSON, (2002) descreve outro caso de um trabalhador de fundição da área de macharia, exposto durante 5 anos aos materiais à base de resinas fenólicas, que apresentou lesões dérmicas nos membros superiores, sendo posteriormente classificado como alérgico a este tipo de material moldante.

2.2 Fenol

2.2.1 Propriedades físico-químicas

O fenol é um composto da classe dos hidrocarbonetos aromáticos mono-substituídos, produzido industrialmente a partir do alcatrão da hulha, sendo freqüentemente utilizado como desinfetante industrial, na produção de resinas fenólicas, na manufatura de *nylons*. Na área médica, é empregado em aplicações dérmicas com finalidades estéticas, tais como a técnica de *peeling* (HEE & SHANE, 1993; STORK, 1997; HODGSON & LEVI, 1997; OSHA, 2001; U. S. EPA, 2002; YAMAMOTO *et al.*, 2004).

A EPA, em seu programa denominado IRIS - *Integrated Risk Information System* - indica as propriedades físico-químicas do fenol, apresentadas na Tabela 2:

Tabela 2 - Propriedades físico-químicas do fenol

Número de identificação – registro: CAS number	108-95-2	LIDE, 1993
Sinônimos	Fenol, hidroxibenzeno, monofenol, álcool fenílico, fenil, fenil hidróxido, ácido fênico.	ATSDR, 1998
Nomes de registro – patentes e/ou produtos.	Ácido carbólico, ácido fênico, fenol, álcool fenílico	ATSDR, 1998
Fórmula molecular	C ₆ H ₆ O	LIDE, 1993
Estrutura química		LIDE, 1993
Peso molecular	94,12 g/mol	Calculado
Densidade, a 20 °C, relativo à densidade da H₂O a 4 °C	1,0576 g/cm ³	LIDE, 1993
Ponto de ignição (campo aberto)	85 °C	ATSDR, 1998
Solubilidade em água, g/L a 25 °C	87 g/L	LIDE, 1993
Ponto de fusão	43 °C	LIDE, 1993
Ponto de ebulição	181,8 °C	LIDE, 1993
Pressão de vapor a 25°C	0,3513 torr	HSDB, 1996
Fatores de conversão	1 ppm (v/v) = mg/m ³ x 0,260 1 mg/m ³ = ppm (v/v) x 3,85	Calculado
Coeficiente de partição Log K_{ow} (octanol-água)	1,46	HDSB, 1996
Limiar de odor	0,047 ppm (0,18 mg/m ³) ar	U.S.EPA, 1986

Fonte: Adaptado de U. S. EPA, 2002.

O fenol apresenta-se no estado sólido, com aspecto cristalino e coloração fracamente rósea ou branca, odor acre e caráter higroscópico em contato com o ar (WHO, 1994; CHEMINFO, 2003).

Este composto é moderadamente volátil à temperatura ambiente, fracamente ácido, sendo ionizado por reações eletrofílicas e de oxidação (WHO, 1994).

2.2.2 Toxicidade do fenol

O fenol possui toxicidade moderada nas exposições agudas. Em humanos a DL é estimada em 70 mg/kg e a DL₅₀ em ratos e coelhos é de 340 mg/kg e 850 mg/kg, respectivamente (WHO, 1994; U.S. EPA, 2002; CHEMINFO, 2003).

Autores de estudos clínicos de exposição dérmica constataam que o fenol é corrosivo à pele. Na exposição ocupacional, o fenol pode levar à sensação de queimação, com o aparecimento de lesões eritematosas, necrose e gangrena (KANERVA *et al.*, 1994; IAKSSON, 2002; CHEMINFO, 2003).

Em trabalho recente, RAYMOND & PRASHIELA (2004) estudaram a hipótese do fenol causar ou ser um fator promotor do vitiligo. De acordo com os autores, os metabólitos do fenol acarretariam a formação de espécies reativas de oxigênio, o que levariam à morte dos melanócitos, inibindo a formação de melanina. Os metabólitos gerados a partir da biotransformação do fenol, como exemplo a o-benzoquinona, competiriam pela enzima tirosinase devido a semelhanças estruturais com a tirosina. Tal enzima é co-fator fundamental na formação de melanina. Assim, a possibilidade de inibição competitiva diminuiria a formação de melanina resultando em despigmentação tecidual.

MCDONALD *et al.*, 2001, estudaram o fenol e a hidroquinona provenientes da dieta e da flora gastrointestinal, bem como os metabólitos hidroquinona e 1,4-benzoquinona que poderiam estar envolvidos com

fatores de desenvolvimento de leucemias. Devido à quantidade de mieloperoxidasas em leucócitos localizados na medula óssea e prostaglandinas sintetases (PG's) haveria a formação de quinonas reativas. Nesta situação, em indivíduos expostos ao fenol, os adutos de DNA formados alterariam a fisiologia normal dos estágios de diferenciação e crescimento celular na medula, podendo levar à leucemia.

Em estudos em animais expostos ao fenol por via inalatória observaram-se lesões na árvore brônquica, tais como dificuldades respiratórias, pneumonia lobular, inflamação, hiperplasia endotelial e trombose capilar (CHEMINFO, 2003).

2.2.3 Toxicocinética

O fenol é rapidamente absorvido após exposição inalatória, dérmica e oral, sendo distribuído por todos os tecidos. Os órgãos mais importantes envolvidos na biotransformação do fenol são: fígado, pulmões e mucosa gastrointestinal, onde são formados conjugados glicurônicos e sulfatos, bem como, catecol e hidroquinona (WHO, 1994; LEITE, 2003).

Segundo BENTUR *et al.*, 1998, na exposição dérmica de uma solução a 90 % (m/v) de fenol, acarretada pelo derrame na região plantar de um trabalhador, representando 3% da superfície corporal, a concentração sérica de fenol decresceu de 21,6 a 2,8 µg/mL nas primeiras 12 h. Os autores estimaram a meia-vida biológica ($t_{1/2}$) para o fenol de 13,86 h. A absorção e a curva de eliminação são mais rápidas em exposições a baixas concentrações, e este fato poderia estar relacionado à desnaturação protéica e à cinética de saturação.

Diferentemente do estudo realizado por BENTUR *et al.*, 1998 em animais de experimentação observa-se que o fenol é excretado mais rapidamente. Ratos expostos a doses de 300 mg/kg, próxima da DL₅₀,

indicaram concentração sérica de 26 µg/mL após 10 minutos de exposição, com níveis declinando até o valor basal após 1 hora da realização da exposição (HUMPHREY *et al.*, 1980)

O fenol é metabolizado no fígado sofrendo reações de fase I e II e seus metabólitos podem ser eliminados a partir de conjugações com grupamentos sulfatos, glutatonas e glicuronídeos, principalmente via P4502E1 (CYP2E1). Além disso, pode sofrer ação na medula por mieloperoxidases liberando quinonas reativas, que seriam, via NQO1, reduzidas novamente a hidroquinona. Tal situação metabólica poderia aumentar o estresse oxidativo e posteriormente alterar o crescimento e diferenciação celular no compartimento medular. A Figura 5 ilustra as principais vias de biotransformação do fenol (MCDONALD *et al.*, 2001).

Figura 5 – Principais vias de Biotransformação do fenol no organismo.
Fonte: Adaptado de MCDONALD, 2001.

O fenol é eliminado na urina, fezes, saliva e suor, sendo a primeira a principal via de excreção, correspondendo a cerca de 95% da excreção do xenobiótico. Sua meia vida biológica é de, em média, 12 horas (CHEMINFO, 1994).

2.2.4 Toxicodinâmica

Estudos *in vivo* e *in vitro* evidenciam a presença de ligações covalentes entre o fenol e as proteínas plasmáticas, além de tecidos. Alguns produtos de biotransformação também podem ligar-se às proteínas pelo fato do fenol e seus metabólitos possuírem caráter eletrofílico, e terem afinidade a sítios nucleofílicos de grupamentos N-, O- ou S- pertencentes às estruturas protéicas e/ou dos materiais genéticos RNA e DNA (WHO, 1994; SNYDER, 2004).

O fenol pode ser citotóxico às células e tecidos expostos, devido à sua capacidade de desnaturar proteínas. A facilidade de ligar-se a proteínas permite a fácil absorção através da pele e tecidos, causando o aparecimento de lesões alergênicas (WILLAMS *et al.*, 2000).

Os efeitos tóxicos associados ao fenol são: eritema, necrose tecidual, efeitos cardiovasculares, acidose metabólica, efeitos neurológicos e metahemoglobinemia severa. Casos fatais foram relatados após intoxicação dérmica e oral (WHO, 1994).

2.3 Indicadores biológicos de exposição (BEIs®)

Como já mencionado anteriormente, os **BEIs®** são valores guias de orientação ao clínico, que lhe permite avaliar os resultados da monitorização biológica (ACGIH, 2005).

Os indicadores biológicos de exposição podem ser classificados em indicadores dose-resposta e referem-se à correlação existente entre os níveis de exposição a uma substância tóxica (dose) durante um período de tempo e as alterações observadas em um indivíduo. Para tal, avaliam-se as alterações biológicas precoces e reversíveis que se desenvolvem no órgão

crítico. Os indicadores de dose interna expressam a presença e a concentração de uma substância ou seus metabólitos em fluidos biológicos. Os indicadores de susceptibilidade são aqueles que expressam uma condição adquirida ou congênita, baseada na capacidade limitada do organismo de fazer frente à exposição a uma substância química específica (DELLA ROSA *et al.*, 2003).

2.3.1 Parâmetros da NR-7 (Norma Regulamentadora N°7)

Tabela 3 - Parâmetros da NR-7 *.

Material	Indicador Biológico –IB	VR	IBMP	Método Analítico	Amostragem
Urina	Fenol	20 mg/g creat.	250 mg/g creat.	CG	FJ

* **VR** - valor de referência, **IBMP** - índice Biológico máximo Permitido, **CG** – Cromatografia Gasosa, **FJ** - Final de Jornada, exceto 1ª da semana, **creat.** - creatinina. (Brasil, NR - 7, 1994)

2.4 Limites de exposição (TLVs®)

Os limites de exposição (**TLVs®**) são valores expressos em unidades de concentração, e são utilizados na avaliação e controle dos riscos à saúde nos locais de trabalho.

Referem-se às concentrações das substâncias químicas dispersas no ar e representam condições as quais se acredita que a maioria dos trabalhadores possa estar exposta, repetidamente, dia após dia, sem sofrer efeitos adversos à saúde (ACGIH, 2005).

Os **TLVs®** baseiam-se em informações disponíveis provenientes de dados de estudos realizados em indústrias, em humanos ou em animais; e, sempre que possível, de uma combinação destes três (ACGIH, 2005).

2.4.1 TLV-TWA[®] (Threshold Limit Values - Time-Weighted Average)

O TLV-TWA do fenol no ar é de 5 ppm, e não é classificado como carcinogênico humano (A4) (ACGIH, 2005; IARC, 2005).

Este parâmetro está relacionado à concentração média ponderada pelo tempo de jornada de trabalho de 8 horas diárias e 40 horas semanais, para a qual a maioria dos trabalhadores possa estar exposta, dia após dia, sem sofrer efeitos adversos à saúde. É aplicado a substâncias que promovem efeitos a médio e longo prazo, o que possibilita que a concentração destas no ambiente de trabalho se encontre ligeiramente acima do TLV-TWA[®] por um curto período, desde que no período subsequente esse valor seja proporcionalmente inferior, compensando a exposição anterior (PEDROSO, 2003).

2.4.2 STEL[®] (Short Time Exposure Limit)

Refere-se à concentração a que os trabalhadores podem estar expostos continuamente por um período de 15 minutos, 4 vezes ao dia com intervalo mínimo de 60 minutos, sem sofrer: irritação, lesão tissular crônica ou irreversível ou narcose em grau suficiente para aumentar a predisposição a acidentes, impedir auto-salvamento ou reduzir significativamente a eficiência no trabalho (ACGIH, 2005).

2.4.3 Parâmetros da NR-15 (Norma Regulamentar N° 15 *)

Tabela 4 - Parâmetros da Norma Regulamentar -15, anexo 11*, para o fenol.

Agente químico	Valor teto	Absorção também p/ pele	ppm *	mg/m³ **	Grau de insalubridade a ser considerado no caso de sua caracterização
Fenol	--	+	4	15	máximo

* **ppm** – partes de vapor ou gás por milhão de partes de ar contaminado, ** **mg/m³** – miligramas por metro cúbico de ar, + - sim (Brasil, NR - 15, anexo 11, 1994).

O monitoramento da exposição juntamente com o monitoramento biológico são instrumentos de suma importância para a avaliação da exposição ocupacional às substâncias químicas. Assim, o presente trabalho foi desenvolvido visando aplicar métodos analíticos para a determinação de fenol em amostras de ar do ambiente de trabalho e urina de trabalhadores que utilizam resinas fenólicas no preparo de moldes em uma indústria de fundição de peças sanitárias.

Para tal, utilizou-se a técnica de cromatografia em fase gasosa com detector de ionização por chama (CG/FID) como método analítico visando sua aplicação na monitorização ocupacional ao fenol.

3 OBJETIVOS E PLANO DE TRABALHO

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a presença de fenol no ambiente laboral e na urina de trabalhadores dos setores da macharia – preparo de moldes e fundição - fusão e vazamento.

Os objetivos específicos foram validar e aplicar métodos desenvolvidos para quantificar as concentrações de fenol no ar do ambiente de trabalho e na urina dos trabalhadores de uma fundição que utilize material à base de resinas fenólicas para confecção de moldes.

O plano de trabalho foi constituído pelas seguintes etapas:

1 – Realizar revisão bibliográfica em relação à exposição ocupacional ao fenol em ambiente de fundições;

2 – Validar um método cromatográfico para determinação de fenol no ar por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG/FID);

3 – Validar um método para determinação de fenol urinário pela técnica de cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (CG/FID);

4 – Comparar os resultados obtidos com aqueles relatados na literatura.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 População estudada

O processo de avaliação da exposição foi realizado numa indústria de peças sanitárias localizada na cidade de São Paulo-SP, trabalho realizado em parceria, envolvendo a Faculdade de Ciências Farmacêuticas/USP e a Fundacentro - Regional São Paulo e Centro Tecnológico Nacional sediado nesta cidade.

As amostras de ar do ambiente de trabalho, provenientes de coletas com bombas de fluxo contínuo, em pontos fixos e zona respiratória de trabalhadores foram realizadas de acordo com protocolo elaborado pela Fundacentro. Foram coletadas urinas de 22 (vinte e dois) indivíduos, sendo 12 (doze) trabalhadores dos setores de fusão e vazamento e macharia e 10 (dez) funcionários, considerados como grupo controle, dos setores de embalagem e administração.

Todos os funcionários responderam ao questionário de avaliação de hábitos alimentares, uso de medicamentos, consumo de bebidas alcoólicas e estilo de vida (Anexo 3). Além disso, para a participação no projeto assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O protocolo de trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, conforme Ofício CEP nº 077/2004.

A carga horária dos trabalhadores envolvidos no estudo era de oito horas diárias, cinco dias por semana, totalizando 40 horas semanais. Para a avaliação ambiental foi coletado um volume de ar, correspondendo a 80 % da jornada de trabalho, ou seja, 6 horas e 40 minutos de exposição.

4.1.1 Descrição do ambiente de trabalho

A forma de exposição ao fenol na indústria envolvida no presente estudo está relacionada, de maneira geral, com o processo de fusão e vazamento, bem como, no setor de macharia, com o preparo do macho. A descrição detalhada da empresa é apresentada a seguir.

Empresa

Indústria com o total de 74 (setenta e quatro) empregados. Destes, 12 (doze) indivíduos foram considerados expostos, 8 (oito) situados no setor de fusão e vazamento e 4 (quatro) na área de macharia. O espaço, conforme planta do local, ilustrada na Figura 8, é constituído de um galpão com pé direito de 12 metros, sem janelas, com ventilação natural e exaustores tipo eólicos no teto. Neste local funcionam dois fornos com sistemas de exaustão aparentemente ineficientes.

Os trabalhadores (n=8) utilizam no setor de fundição (fusão e vazamento) como equipamentos de proteção individual (EPI's): máscaras para material particulado do tipo PFF-1 (peça facial filtrante)¹, protetores auriculares, avental, óculos de acrílico, luvas térmicas e botas de proteção. A Figura 6 ilustra o setor onde os trabalhadores desenvolvem as atividades consideradas como as do grupo exposto.

Os funcionários da macharia (n= 4), sendo três macheiros (Figura 7) e um rebarbeador (Figura 9), encontram-se com os EPI's: máscara PFF-1, protetores auriculares, óculos de acrílico e luvas térmicas.

¹ Respirador semifacial em formato concha, indicado na proteção contra poeiras e névoas tóxicas classe PFF-1 e gás fluoreto de hidrogênio em concentração até o limite de tolerância.

Figura 6: Trabalhadores em área de fundição (fusão e vazamento)

Figura 7: Trabalhadores em área de macharia.

Figura 8 – Planta do galpão da fundição, indicando os locais e tipos de coletas e nos setores macharia, fusão e vazamento.

● - ponto fixo. ● - zona respiratória.

Figura 9: Trabalhador na área de macharia – rebarbador.

4.2 Material

4.2.1 Solventes e reagentes

Metanol grau cromatográfico Merck[®] (Darmstadt, Alemanha).

Cloreto de Sódio P.A. Sigma[®] (Steinheim, Alemanha).

Ácido Clorídrico P. A. Synth[®] (São Paulo, Brasil).

Éter etílico P. A. Synth[®] (São Paulo, Brasil).

Kit para dosagem de creatinina Labtest[®];

Urodensímetro, Urinometer[®].

4.2.2 Padrões

Fenol: Padrão de Fenol P. A. 100g Riedel-de-Haën[®] (Seelze, Alemanha).

Nitrobenzeno: Padrão de Nitrobenzeno 1L Androl Produtos Químicos LTDA (Curitiba, Brasil).

4.2.3 Equipamentos, vidrarias e acessórios

- Cromatógrafo a gás Hewlett Packard® modelo HP 6890 series, equipado com detector por ionização de chama (FID) e injetor “split/splitless”. Integrador: Hewlett Packard® mod. HP 3395.
- Coluna capilar HP-1 (Crosslinked 5% de metilsiloxano), de 15,0m X 0,53mm X 1,5 µm (Hewlett Packard®, EUA).
- Seringa de vidro Hewlett-Packard® 10µL;
- Balança analítica Sartorius® – modelo R200D;
- Estufa Ética Equipamentos® modelo 410.1, 1 – 150°C;
- Balões volumétricos de 25 mL;
- Pipetas automáticas Finpipette® Labsystems (10-40; 40-200; 200-1000 e 1000-5000µL);
- Pipetas de vidro em volumes de 1, 2 e 5 mL.
- Béqueres;
- Tubos de vidro esmerilhados com rosca para 15 mL;
- Tubos de ensaio;
- Funis;
- Freezer e refrigerador;
- Banho de ultra-som Unique®;
- Tubos adsorventes resina amberlite XAD-7, SKC INC.®;
- Bomba portátil modelo Buck Genie VSS5, Empresa Buckgenie®, Fluxo 5 - 800 mL/min;

4.3 Métodos Analíticos

4.3.1 Amostras de ar do ambiente de trabalho

4.3.1.1 Coleta de amostras de ar

As amostras de ar das áreas em que trabalhavam os indivíduos considerados expostos - ponto fixo, zona respiratória e controle - foram

coletadas em três dias consecutivos, realizando-se a média das concentrações obtidas a partir das coletas, cuja forma de obtenção encontra-se ilustrada na Figura 14.

Como já citado anteriormente, a calibração das bombas foi feita de acordo com as Normas da Fundacentro, utilizando-se calibrador primário (Figura 11), no dia anterior à realização do trabalho. A vazão do equipamento foi de 31,2 mL/min e o tempo correspondendo a 80% da jornada de trabalho de 8h, coletando-se um volume de ar total de 20 L.

Foram coletadas amostras de ar, com o intuito de cobrir 80% da jornada de trabalho (dentro do período da exposição) por três dias consecutivos. A coleta foi realizada fixando-se bombas portáteis, como ilustram as Figuras 12 (ponto fixo) e 13 (zona respiratória), aos funcionários das áreas envolvidas no processo de preparo do molde na indústria de fundição.

Foi empregada a estratégia de “pior” situação de exposição, procedendo-se às coletas em pontos fixos junto à possível liberação de vapor de fenol devido à prática industrial correspondente ao preparo do molde [macho] (Figura 12).

No que tange à coleta do tipo individual, foi realizada de acordo com as funções dos trabalhadores no preparo de materiais moldantes em suas etapas operacionais (Figura 12). Bomba coletora foi calibrada com o uso de um calibrador primário. A Figura 11 ilustra esta forma de coleta.

Figura 10 – Bomba portátil (A) acoplada a tubo coletor com resina adsorvente XAD 7 (B) para coleta de amostra de fenol no ar.

Figura 11 – Calibrador primário para procedimento de calibração das bombas de coleta de ar (SKC INC®).

Figura 12 – Local de coleta de fenol no ar em ponto fixo, na área de macharia.

Figura 13 – Coleta de fenol no ar em zona respiratória de trabalhador.

Após a coleta, os tubos adsorventes foram mantidos à temperatura de 4°C e transportadas em caixas térmicas com gelo seco.

4.3.1.2 Determinação de fenol no ar

Foram preparadas duas soluções padrões, a primeira com fenol na concentração de 1000 mg/L e a segunda de nitrobenzeno como padrão interno na concentração de 1000 mg/L, para posteriores adições.

Foi desenvolvido um método cromatográfico para quantificação de fenol em amostras de ar coletadas com adição, em vial silanizado contendo material adsorvente XAD, de volumes conhecidos a partir da solução mãe resultando em soluções com concentrações definidas.

4.3.1.3 Método usado na análise do material coletado

Em vial silanizado com tampa, foram adicionados o material adsorvente XAD, 2,0 mL de metanol, 40 µL do padrão interno – PI (solução 1000 mg/L de nitrobenzeno), e volumes relativos às concentrações desejadas do padrão analítico a partir da solução mãe de fenol 1000 mg/L,

deixando-se a mistura por 30 minutos em ultra-som. Posteriormente, a fase sobrenadante foi coletada e 2,0 μ L foram injetados no cromatógrafo (GC-FID). A marcha analítica utilizada na determinação do fenol no ar é ilustrada na Figura 14.

Figura 14 - Fluxograma do método para determinação de fenol do ar coletado em tubos adsorventes tipo XAD (NIOSH 2546, 1994)

4.3.1.4 Validação do método cromatográfico para determinação do fenol no ar por GC/FID, empregando-se tubos adsorventes tipo XAD

Os parâmetros de confiabilidade analítica: limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ), linearidade, precisão intra-ensaio e precisão interensaios e coeficiente de desorção, foram adotados para o método de determinação de fenol no ar, as concentrações para determinação de fenol no ar do ambiente de trabalho estão em ppm.

4.3.1.4.1 Limite de detecção e Limite de quantificação

O limite de detecção (LD) foi determinado por diluições sucessivas da amostra adicionada de fenol até a menor concentração detectável, na qual foi possível obter picos integrados pelo equipamento, nas condições cromatográficas otimizadas em seis replicatas e coeficiente de variação menor que 20 % (CAUSON, 1997; CHASIN *et al.*, 1998; QUEIROZ *et al.*, 2001; ANVISA, 2003).

4.3.1.4.2 Linearidade

Foram construídas curvas analíticas com amostras adicionadas de soluções de trabalho nas concentrações de fenol, descritas no item 4.3.1.2, a fim de se obter concentrações crescentes de 0,13 a 4,00 ppm e 0,26 ppm do padrão interno (P.I.), submetidas ao procedimento de extração e análise cromatográfica descritos no item 4.3.1.3.

A linearidade das curvas foi avaliada por meio das equações da reta e coeficiente de determinação (r^2), o qual deve ser superior a 0,98 (CAUSON, 1997; CHASIN *et al.*, 1998; QUEIROZ *et al.*, 2001; ANVISA, 2003).

4.3.1.4.3 Precisão intra-ensaio e interensaio

As precisões intra-ensaio e interensaio foram determinadas por meio da extração em seis replicatas de amostras adicionadas nas concentrações de 0,16 e 3,50 ppm. A precisão foi calculada indiretamente, por meio da imprecisão dada pelo coeficiente de variação (CV) das áreas relativas obtidas, sendo que o CV não deve ser superior a 15% (CAUSON, 1997; CHASIN *et al.*, 1998; QUEIROZ *et al.*, 2001).

4.3.1.4.4 Coeficiente de desorção para o ar

Para o cálculo do coeficiente de desorção foi empregado o método de amostras adicionadas, com seis replicatas, no tempo zero, em que se quantificou a concentração existente na amostra. Após, seis amostras foram submetidas a processo de descanso num período de 24h, procedendo-se a quantificação do composto adicionado.

4.3.2 Amostras de urina de trabalhadores

4.3.2.1 Coleta de amostras de urina

A urina, proveniente de única micção, da sexta-feira às 17:00 h, foi coletada diretamente em frasco de polietileno, previamente descontaminado com hipoclorito de sódio e água deionizada. Após a coleta, as amostras foram mantidas em caixas térmicas com gelo seco e transportadas até o laboratório, onde foram realizadas as determinações de creatinina e da densidade urinária. As amostras foram conservadas a 4°C até o momento da análise.

4.3.2.2 Determinação do fenol na urina

4.3.2.3 Soluções - padrão

Foram preparadas soluções estoque de fenol a 1000 µg/mL e nitrobenzeno a 50 µg/mL, em metanol padrão cromatográfico.

A solução padrão estoque de fenol deu origem a seis soluções de trabalho, diluídas em metanol nas seguintes concentrações: 5; 10; 50; 100; 150; 200 µg/mL, bem como a solução de nitrobenzeno (padrão interno) que originou uma solução a 50 µg/mL, utilizadas durante o processo de

validação do método analítico. Estas soluções foram preparadas diariamente em frascos âmbar.

4.3.2.4 Método proposto para extração do fenol em urina

Em tubo de vidro, com tampa esmerilhada, foi adicionado 5,0 mL de urina (controle negativo), 50 μ L do padrão interno – PI, 1,0 mL de ácido clorídrico 37% e aquecimento em estufa a 95°C por 1,5 h. Posteriormente, adicionou-se 5,0 mL de éter etílico e 1,0 g de NaCl e agitou-se, em uma mesa agitadora por 10 minutos. Assim, coletou-se 3 mL da fase orgânica e 2,0 μ L foram injetados no Cromatógrafo (CG/FID) (Figura 15).

Figura 15 – Marcha analítica usada na determinação de fenol urinário.

4.3.2.5 Validação do método para determinação da concentração de fenol em urina por CG-FID, empregando a técnica de extração líquido-líquido.

Para a padronização do método analítico foi utilizado um *pool* de urina de voluntários sadios ($n = 6$), acadêmicos da Universidade de São Paulo, não possuindo histórico de contato com materiais à base de resinas fenólicas.

Além da exposição ocupacional, o fenol urinário pode ser proveniente de outras fontes tais como compostos presentes em alimentos e no ambiente que poderiam ser excretados na forma fenólica (SCALBERT, WILLIAMSON, 2000).

Assim, com a finalidade de minimizar essas diferenças individuais, um *pool* de urina, utilizada como controle, foi tratado com ácido clorídrico P. A., na concentração de 10 % em relação à urina (v/v), mantendo-se sob aquecimento até total evaporação, reconstituindo-se posteriormente com água mili-Q[®].

As amostras foram homogeneizadas e adicionadas de fenol em diferentes concentrações, para a escolha dos pontos da curva analítica e estudo dos parâmetros de validação, submetido ao procedimento de extração descrito no item 4.3.2.4 consideraram-se o valor de referência do NIOSH – 4,5 a 20,7 mg/g creatinina e a Legislação Brasileira com IBMP de 250 mg/g creatinina.

As condições de preparo das amostras juntamente com a etapa de análise cromatográfica do método foram validadas para assegurar a sua qualidade, confiabilidade e aplicabilidade.

No processo de validação dos métodos propostos foram avaliadas as seguintes figuras de mérito: especificidade e seletividade, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão intra-ensaio, precisão interensaio, recuperação e estabilidade, descritas à seguir.

4.3.2.5.1 Especificidade e seletividade

O parâmetro especificidade foi determinado através das análises do *pool* de amostras de urina obtidas de indivíduos (ONG *et al.*, 1989; NIOSH, 1994).

Como foi mencionado anteriormente, o fenol pode estar presente na urina à partir de possíveis interferentes endógenos, assim, as amostras foram submetidas ao procedimento descrito no item 4.3.2.4, realizadas em triplicata e os resultados comparados aos obtidos com solução metanólica do analito, em concentração próxima ao limite de quantificação e detecção, verificando a possível existência de picos interferentes nos tempos de retenção do analito e do padrão interno.

4.3.2.5.2 Linearidade

Foram construídas curvas analíticas com amostras adicionadas de soluções de trabalho nas concentrações de fenol, descritas no item 4.3.2.3, a fim de se obter concentrações crescentes de 5 a 200 µg/mL, e 50 µg/mL do P.I submetidas ao procedimento de extração e análise cromatográfica descritos no item 4.3.2.4.

A linearidade das curvas foi avaliada por meio das equações da reta e coeficiente de determinação (r^2), o qual deve ser superior a 0,98 (CAUSON, 1997; CHASIN *et al.*, 1998; QUEIROZ *et al.*, 2001; ANVISA, 2003).

4.3.2.5.3 Limite de detecção e Limite de quantificação

O limite de detecção (LD) foi determinado por diluições sucessivas da amostra adicionada de fenol até a menor concentração detectável, na qual foi possível obter picos integrados pelo equipamento, nas condições cromatográficas otimizadas em seis replicatas e coeficiente de variação menor que 20 % (CAUSON, 1997; CHASIN *et al.*, 1998; QUEIROZ *et al.*, 2001; ANVISA, 2003).

4.3.2.5.4 Precisão intra-ensaio e interensaio

As precisões intra-ensaio e inter-ensaio foram determinadas por meio da extração em seis replicatas de amostras fortificadas nas concentrações urinárias de 15, 85 e 150 µg/mL. A precisão foi calculada indiretamente, por meio da imprecisão dada pelo coeficiente de variação (CV) das áreas relativas obtidas, sendo que o CV não deve ser superior a 15% (CAUSON, 1997; CHASIN *et al.*, 1998; QUEIROZ *et al.*, 2001).

4.3.2.5.5 Recuperação

Com objetivo de se avaliar a eficiência do método de extração da amostra, após esta ter passado por hidrólise ácida, conforme descrito na Figura 4, e, verificarem-se possíveis alterações na determinação, amostras identificadas como controle foram analisadas. Por comparação da resposta obtida na adição prévia à extração *versus* a resposta da adição posterior à extração, obteve-se a porcentagem do analito recuperado (CAUSON, 1997; CHASIN *et al.*, 1998; BRASIL, 2003).

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{Concentração amostra} \times 100}{\text{Conc. após adição de padrão}}$$

4.3.2.5.6 Estabilidade

A estabilidade foi determinada pela quantificação de fenol adicionado em urina, nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Alíquotas de 5ml foram armazenadas (n=6) em freezer a (-20°C), sendo calculada a precisão por meio do CV das áreas relativas obtidas nas análises realizadas após 6, 12, 24 e 48 horas. Os resultados foram comparados com os obtidos no tempo zero (CAUSON, 1997).

4.3.3 Determinação da densidade e da creatinina urinária

As amostras de urina foram corrigidas e ajustadas pela medição da densidade e a determinação da creatinina urinária. A densidade foi medida com auxílio de um urodensímetro e os teores de creatinina foram determinados por método espectrofotométrico utilizando-se um “Kit” da marca Labtest®.

4.3.4 Otimização das condições cromatográficas

Para melhor resolução na determinação do fenol, foram estabelecidas as seguintes condições cromatográficas, tanto para as amostras provenientes do ar como para as de urina. A coluna utilizada foi HP (Hewlett-Packard®) -1, com 15 m de comprimento, diâmetro interno (ID) de 0,53mm, e tamanho de partícula de 1.5 µm:

- **Detector:** Temperatura de 200°C; Fluxo Ar: 450 mL/min; Fluxo N₂: 50 mL/min (*“make up”*);
- **Injetor:** Temperatura: 200°C (isotérmico); Injeção tipo *“split ratio”* 1/10, *“split flow”* 1/20;
- **Coluna (forno):** Temperatura inicial do forno 60°C.
 - 1º plateau: 60°C/ 2 min;
 - 2º plateau: 10 °C/min;
 - 3º plateau: 120°C por 2 min;Fluxo constante de H₂: 40 mL/min.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação de fenol no ar do ambiente de trabalho

5.1.1 Otimização das condições cromatográficas na determinação de fenol no ar

A Figura 16 ilustra um cromatograma do controle, sem a adição de padrão de fenol, contendo padrão interno, onde não se observam picos interferentes.

A análise cromatográfica do padrão de fenol e padrão interno nitrobenzeno foi considerada satisfatória quanto ao tempo da análise e perfil cromatográfico (Figura 17).

Figura 16 - Cromatograma obtido do extrato controle de resinas XAD (submetido ao procedimento analítico descrito no item **4.3.1.3**, nas condições padronizadas), contendo padrão interno (nitrobenzeno – 0,26 ppm).

Figura 17 - Cromatograma obtido do extrato controle de resinas XAD adicionadas com fenol na concentração de 0,26 ppm e padrão interno nitrobenzeno – 0,26 ppm, submetido ao procedimento analítico descrito no item **4.3.1.3** nas condições padronizadas para amostras de ar.

5.1.2 Linearidade para o fenol no ar

Na Figura 18 apresenta a curva analítica do fenol, em amostras de XAD, nas concentrações de 0,13; 0,26; 1,30; 2,60 e 4,00 ppm. Cada ponto corresponde à média em triplicata de cada amostra dos valores encontrados na análise de cinco concentrações. A curva analítica foi obtida por meio dos dados apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Valores obtidos em três replicatas utilizados na determinação de fenol no ar.

Concentração (ppm)	Área relativa *
0,13	0,226
0,26	0,461
1,30	2,227
2,60	4,805
4,00	7,942

Figura 18 - Curva analítica utilizada na determinação de fenol no ar.

5.1.3 Limite de detecção e quantificação para o fenol no ar

Para as amostras de tubos adsorventes XAD, adicionadas, o limite de detecção foi de 0,08 ppm (n=6), e o coeficiente de variação foi igual a 5,9%. Já, o limite de quantificação foi de 0,13 ppm, com coeficiente de variação de 8,1 %.

5.1.4 Coeficiente de desorção para o ar

Os resultados do coeficiente de desorção para o fenol no ar podem ser observados na Tabela 6 e correspondem à média de seis replicatas.

Tabela 6 – Eficiência de desorção para o fenol no ar.

Concentração de fenol no ar (ppm)	ED (%)
0,16*	100*
0,16	99,2

* tempo zero, **ED** – Eficiência de desorção.

5.1.5 Precisão intra-ensaio e interensaio para o fenol no ar

A Tabela 7 apresenta as precisões intra e interensaio para o fenol no ar nas diferentes concentrações.

Tabela 7 – Precisão intra e interensaio obtido nas análises de fenol no ar

Concentração Ppm	Média ± DP	CV% INTRA	CV% INTER
0,16* (CB)	0,290 ± 0,025	4,4	4,7
3,50* (CA)	7,941 ± 0,512	4,4	3,5

CV: Coeficiente de Variação, DP: Desvio Padrão, n: número de amostras analisadas. CB: Concentração baixa. CA: Concentração alta. (*) n = 6

5.2 Determinação de fenol urinário

5.2.1 Otimização das condições cromatográficas para determinação do fenol urinário

A Figura 19 apresenta um cromatograma do extrato obtido por meio de *pool* de urina controle negativo, em que permite verificar a ausência de picos interferentes.

A análise cromatográfica do padrão de fenol e padrão interno nitrobenzeno na coluna foi considerada satisfatória quanto ao tempo da análise e perfil cromatográfico (Figura 20).

Figura 19 - Cromatograma do extrato de urina controle (submetido ao procedimento analítico descrito no item 4.3.2.4, nas condições padronizadas, contendo padrão interno).

Figura 20: Cromatograma do extrato de urina controle (submetido ao procedimento analítico descrito no item 4.3.2.4, nas condições padronizadas), adicionadas com fenol na concentração de 50 µg/mL e nitrobenzeno 50 µg/mL.

5.2.2 Linearidade para o fenol urinário

A Figura 21 ilustra a curva analítica de fenol, em amostras de um *pool* de urina, nas concentrações de 5, 10, 50, 100, 150, 200 µg/mL. A curva analítica foi obtida por meio dos dados apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Valores de fenol urinário obtidos em triplicata utilizados para a construção da curva analítica.

Concentração (µg/mL)	Área relativa *
5	0,557
10	0,700
50	3,858
100	8,370
150	13,256
200	15,868

* valores correspondentes à média em seis triplicatas.

Figura 21 - Curva analítica da determinação de fenol.

5.2.3 Limite de detecção e quantificação para o fenol urinário

Nas amostras de urina adicionadas de fenol, o limite de detecção do método foi de 2 µg/mL (n=6), e o limite de quantificação foi de 5,0 µg/mL(n=6), e ambos apresentaram coeficiente de variação de 8,2%.

5.2.4 Precisão intra-ensaio e interensaio para o fenol urinário

A Tabela 9 apresenta as precisões intra e interensaio obtidas nas análises de urinário.

Concentração µg/mL	Média ± DP	CV% INTRA	CV% INTER
15* (CB)	1,323 ± 0,101	8,9	14,6
85* (CM)	7,066 ± 0,599	4,8	5,7
150* (CA)	13,339 ± 0,353	4,5	8,9

CV: Coeficiente de Variação, DP: Desvio Padrão, n: número de amostras analisadas. CB: Concentração baixa. CM: Concentração Média. CA: Concentração alta. (*) n = 6

5.2.5 Recuperação do fenol urinário

Os resultados da recuperação do fenol adicionado em urina podem ser observados na Tabela 10 e correspondem à média de seis replicatas.

Tabela 10 – Porcentagem de recuperação do fenol adicionado na urina.

Concentração de fenol urinário (µg/mL)	recuperação (%)
15	96
85	88
150	97
% média = 94	

5.2.6 Estabilidade

Os resultados do estudo da estabilidade do fenol em urina, adicionados na concentração de 50 µg/mL, são indicados nas Tabelas 11 e

12, referindo-se, respectivamente, a estabilidade nas concentrações de 50 µg/mL, em três replicatas de 5 mL de urina armazenadas em geladeira a 4 °C e em congelador a (-20°C), após 06, 12, 24 e 48 horas.

Tabela 11 – Estudo da estabilidade do fenol urinário na concentração de 50 µg/mL, mantido em geladeira a 4 °C.

Tempo (horas)	Concentração %
0 *	100
06*	92,5
12*	100,7
24*	108,5
48*	91,9

(*) n = 3.

Tabela 12 – Estudo da estabilidade do fenol urinário na concentração 50 µg/mL, mantido em freezer a – 20°C.

Tempo (horas)	Concentração %
0 *	100
06*	98,6
12*	97,1
24*	96,4
48*	98,7

(*) n = 3.

5.4 Resultados observados quanto aos questionários

5.4.1 População da área de macharia

Os indivíduos são do sexo masculino, com média de idade de 34 anos e tempo de atividade de 2 anos. Em relação ao estilo de vida, somente

1 (um) trabalhador é fumante e 3 (três) deles ingerem bebida alcoólica de maneira moderada.

5.4.2 População da área de fusão e vazamento

Os indivíduos são do sexo masculino, com média de idade de 34,5 anos e tempo de atividade de 2,5 anos. Em relação ao estilo de vida 3 (três) indivíduos são fumantes e 4 (quatro) deles ingerem bebida alcoólica de maneira moderada.

5.4.3 População controle

Os indivíduos são do sexo masculino, com média de idade de 24,5 anos e tempo de atividade de 4,1 anos. Em relação ao estilo de vida 3 (três) indivíduos são fumantes e 4 (quatro) deles ingerem bebida alcoólica de maneira moderada.

5.5 Resultados para determinação de fenol no ar do ambiente de trabalho

Tabela 13 - Valores das concentrações para determinação de fenol no ar do ambiente de trabalho.

Local	Concentração mg/m ³
Zona respiratória (macharia)	N. D. ^{*,α}
Ponto fixo (macharia)	N. D. ^{*,α}
Ponto fixo (fusão e vazamento)	N. D. ^{*,α}

* N.D. – abaixo do limite de quantificação (0,08 ppm).

^α - média de três determinações em dias subseqüentes.

5.6 Resultados para determinação de fenol na urina dos trabalhadores considerados expostos e controle

Tabela 14 - Valores das concentrações para determinação de fenol na urina dos trabalhadores considerados expostos e controle.

Trabalhador	(mg/L)*	mg/g creatinina
Controle 1	2,96	1,85
Controle 2	3,39	5,65
Controle 3	0,86	1,72
Controle 4	25,2	8,40
Controle 5	1,42	1,58
Controle 6	1,52	1,89
Controle 7	1,80	1,38
Controle 8	5,76	1,92
Controle 9	3,06	2,55
Controle 10	1,78	1,19
Exposto 1 (macharia)	7,49	6,24
Exposto 2 (fusão e vazamento)	7,16	17,89
Exposto 3 (fusão e vazamento)	8,16	2,72
Exposto 4 (macharia)	5,19	3,70
Exposto 5 (fusão e vazamento)	2,42	1,34
Exposto 6 (fusão e vazamento)	12,61	11,46
Exposto 7 (macharia)	9,95	11,05
Exposto 8 (fusão e vazamento)	6,78	3,23
Exposto 9 (fusão e vazamento)	2,58	2,34
Exposto 10 (fusão e vazamento)	2,96	1,85
Exposto 11 (macharia)	6,85	4,89
Exposto 12 (fusão e vazamento)	1,40	2,33

* valores corrigidos pela gravidade específica.

6 DISCUSSÃO

Segundo a NR-7, o fenol urinário é considerado indicador biológico de exposição ao fenol. Embora o fenol seja encontrado na urina, oriundo do metabolismo de componentes alimentares ou de exposições a compostos cujos metabólitos finais são fenol, este é aplicado no monitoramento biológico com valor de referência conhecido e é considerado na correta avaliação da exposição ocupacional (BRASIL, 1994).

Alguns métodos para determinação de fenol em amostras biológicas têm sido relatados na literatura científica, utilizando a técnica de espectrofotometria UV/VIS (YAMAGUCHI, HAYASHI, 1977), cromatografia líquida de alta eficiência (MUTTI, 1999), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (MANINI *et al.*, 2004), cromatografia em fase gasosa com detector de ionização por chama (ONG, *et al.*, 1989), cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (LAURENS, 2002; BOATTO *et al.*, 2004). Os resultados obtidos com esses métodos indicam a possibilidade de utilizá-las na determinação do fenol urinário de trabalhadores expostos no ambiente ocupacional.

A legislação brasileira preconiza a determinação do fenol urinário na monitorização biológica por método de cromatografia em fase gasosa com detector de ionização por chama, de acordo com a Tabela da NR-7 (BRASIL, 1994).

Outras entidades nacionais americanas, tais como a ACGIH, o NIOSH, bem como a OSHA também preconizam a determinação de fenol urinário, como indicador biológico da exposição ao fenol (NIOSH, 1994; OSHA, 2001; ACGIH, 2005).

No presente trabalho, a cromatografia em fase gasosa com detector de ionização por chama foi utilizada como técnica para a quantificação de

fenol urinário. O método, baseado na extração líquido-líquido, demonstrou ser procedimento prático e rápido, em comparação a métodos que utilizam SPE (MANINI *et al.*, 2004) ou hidrólise enzimática (ADLARD *et al.*, 1981).

Este método permite a quantificação de 40 amostras de urina diárias, oferecendo mais agilidade na determinação analítica comparando-se ao método validado por ONG *et al.*, 1989, devido a modificações na coluna empregada e na programação da rampa analítica, com tempo de corrida de 10 minutos, em oposição aos 15 minutos observados no trabalho daquele autor.

No estudo da especificidade foi observada boa separação cromatográfica; os estudos de precisão intra e inter-ensaios, com CV < 15% demonstraram ser suficientes alíquotas de 5 mL de urina para a determinação de fenol urinário. Além disso, a utilização de éter etílico (5mL) para a extração do metabólito fenol da fase aquosa demonstrou ser eficaz na técnica empregada. A temperatura da estufa de 95 °C não promoveu degradação importante do fenol e seu padrão interno, provavelmente pelo uso de tubo esmerilhado com tampa, que permitiu um equilíbrio entre a pV do solvente e a pV do ambiente tamponado. Após o aquecimento, os tubos eram acondicionados em recipiente contendo gelo para ofertar uma menor influência na evaporação do fenol.

A adição do sal NaCl foi importante para promover o efeito “salting out”, que diminui a ligação do hidrogênio da água com o analito e, assim, a água é “seqüestrada” pela hidratação do sal (ONG *et al.*, 1989).

O nitrobenzeno foi escolhido como padrão interno devido à semelhança estrutural em relação ao fenol, e pelo fato de não ser encontrado normalmente na urina, ter ponto de ebulição relativamente próximo ao do fenol e tempo de eluição bastante satisfatório nas condições cromatográficas padronizadas. As duas substâncias são detectadas em

menos de dez minutos, permitindo uma análise rápida (ONG *et al.*, 1989; NIOSH, 1994).

A técnica analítica proposta para a determinação de fenol urinário demonstrou ser altamente precisa e exata com o emprego do padrão interno nitrobenzeno. Valores adequados de sensibilidade e linearidade também foram obtidos para o analito. No parâmetro de recuperação a técnica empregada apresentou-se satisfatória demonstrando, por meio dos valores encontrados, uma perda aceitável frente às condições propostas (recuperação superior a 87% para o fenol). O coeficiente de determinação (r^2) foi superior a 0,99 dentro da faixa de interesse de 5 – 200 µg/mL, estando de acordo com o preconizado pela Legislação vigente (CAUSON, 1997; CHASIN *et al.*, 1998; QUEIROZ *et al.*, 2001; BRASIL, 2003).

A estabilidade para determinações de fenol urinário foi avaliada segundo duas formas de conservação de amostras de urina: geladeira e freezer, as respectivas análises de estabilidade demonstraram que o método é estável nas condições preconizadas pela legislação em vigor, e, no caso de transporte das amostras estas poderiam ser acondicionadas em caixa de isopor com manutenção, por 48h, sem alteração significativa na perda do analito (CHASIN *et al.*, 1998).

O NIOSH considera como valor de referência de fenol urinário o intervalo entre 4,5 – 20,7 mg/g creatinina. Já, a legislação brasileira preconiza VR de 20 mg/g creatinina e IBMP de 250 mg/g creatinina. Assim, as amostras urinárias, demonstram que os indivíduos não se encontram expostos ao fenol em indústria de fundição com preparo de matérias à base de resinas fenólicas, portanto, apresentam valores considerados seguros para a saúde e bem estar do indivíduo no ambiente de trabalho.

As determinações de níveis urinários do fenol podem ser empregadas no monitoramento biológico dos trabalhadores e há a necessidade de ampliar o estudo em questão, aumentando-se o número de indivíduos amostrados para se fazerem maiores considerações entre os valores encontrados e os setores do ambiente de trabalho.

As amostras provenientes das coletas de ponto fixo nas áreas da fundição e macharia, bem como zona respiratória para o trabalhador de área da macharia, revelaram concentrações inferiores ao L.Q. da técnica empregada na determinação de fenol em amostras ambientais. Há possibilidade deste quadro, em função do volume coletado de 20L de ar, com fluxo da bomba de 31,2 mL/min, num período de 6h e 40 minutos (NIOSH, 1994). Tal volume poderia diluir o fenol coletado em função do volume de ar, podendo-se realizar um estudo na coleta de ar num período de 15 minutos, com uma vazão maior.

No presente trabalho foi avaliado o método cromatográfico para determinação de fenol no ar. Porém, não foi realizada uma validação da etapa de coleta, que é essencial na monitorização ambiental.

Na amostragem, como citado anteriormente, foi utilizada uma técnica rotineiramente aplicada pela Fundacentro, não sendo empregada a norma do (NIOSH, 1995), como guia para amostragens ambientais e desenvolvimento e avaliação de métodos analíticos.

Os procedimentos indicados nesta norma serão aplicados nas coletas de amostras de ar em outras fundições, trabalhos estes já agendados.

7 CONCLUSÕES

Os métodos validados para determinação de fenol urinário e no ar do ambiente de trabalho por cromatografia em fase gasosa com detecção de ionização por chama demonstraram ser simples, rápidos e eficientes, podendo ser aplicados em laboratórios de toxicologia que dispõem deste equipamento para monitoramento biológico e quantificação de amostras ambientais.

As amostras analisadas permitiram verificar a aplicabilidade do método validado na determinação de fenol urinário no monitoramento biológico a trabalhadores.

As etapas de validação do método cromatográfico, tanto para o ar como para o fenol urinário demonstraram ser adequadas.

Os resultados das amostras de ar provenientes do ar do ambiente de trabalho mostraram-se inferiores ao L.Q. do método analítico utilizado.

Nas situações de exposição avaliadas no presente trabalho em uma fundição nas áreas de macharia e fusão e vazamento, em que trabalhadores utilizam matérias à base de resinas fenólicas, não se verificou exposição ao fenol nesta indústria.

8 RECOMENDAÇÕES

Sugere-se que o estudo seja ampliado e possa avaliar outras possibilidades de exposições ao fenol, seguindo-se protocolos internacionalmente reconhecidos.

9 REFERÊNCIAS

- [ABHO] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HIGIENISTAS OCUPACIONAIS. 2003 **Limites de Exposição - TLVs® e Índices Biológicos - BEIs®**. ACGIH, 219 p., 2005.
- [ACGIH], AMERICAN CONFERENCE of GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HIGYENISTS. 2005 **TLVs® e BEIs® based on the documentation for threshold limit values for chemicals substances and physical agents and biological exposure indices**. Cincinnati: ACGIH, 219 p., 2005.
- ADLARD, E.R.; MILNE, P. E.; TINDLE, P. E. Determination of phenol by gas chromatography with enzymatic hydrolysis. *Chromatographia*, New York, v.14, p. 507, 1981.
- APC AMERICAN PLASTICS INDUSTRY PRODUCERS. **APC year-end statistics for 2003 with production, sales & captive use of resins – Canadian Statistcs**.2004 Disponível em: <http://www.americanplasticsconcil.org/s-apc/docs/1100/1014.pdf> Acesso em: 15/07/2004.
- BAUMGÄRTEL, I. **Dangerous Working Substances in Foundries – Mold Materials**. Vienna: International Section for the Prevention of Occupational Accidents and Diseases in the Iron and Metal Manufacturing Industry of the International Social Security Association, 43 p., 1984.
- BENTUR, Y., SHOSHANI, A. O., TABAK, E. Prolonged elimination half-life of phenol after dermal exposure. *J Toxicol Clin Toxicol.*, Baltimore, 36(7): 707 -711, 1998.
- BOATTO, G.; NIEDDU, M.; CARLA, A.; PAU, A.; LORENZONI, S.; MANCONI, P., SERRA, D. Determination of phenol and o-cresol by GC/MS in a fatal poisoning case. *Forens. Sci. Int.*, Dublin, p. 191 – 194, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. [ANVISA] – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Resoluções. **Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Anexo I: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03re.htm. Acesso em: 13/10/2003.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. **NORMA REGULAMENTADORA nº 7**. Brasil: Ministério do Trabalho e Emprego, 1978. Disponível em:

http://www.mte.gov.br/empregador/segau/legislacao/normas/cont_eudo/nr07/default.asp Acesso em: 07/03/2005.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. **NORMA REGULAMENTADORA nº 15**. Brasil: Ministério do Trabalho e Previdência, 1978. Disponível em:

http://www.mte.gov.br/empregador/segau/legislacao/normas/cont_eudo/nr15/default.asp Acesso em: 07/03/2005.

BROSCH, C. D. **Idéias fundamentais sobre areias de moldagem e estudo comparativo entre os tipos de areia natural e sintética**. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo S. A. – IPT, 9 p., 199?. (Publicação do IPT n. 236 e.3)

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis – Viewpoint and discussion. **J. Chromatogr. B.**, Amsterdam, 689, p. 175-180, 1997.

CHASIN, A.A.M.; NASCIMENTO, E. S.; NETO, L.M.R.; 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. Tox.**, São Paulo, v. 11 (1), 1-6, 1999.

[CHEMINFO] Chemistry Information. **Phenol**. Canadian Centre for Occupational Health and Safety, 19 p., 2003.

COLACIOPPO, S. **Higiene e Toxicologia Ocupacional**. Apostila da disciplina de Higiene e Toxicologia Ocupacional - HSA 5740. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 135 p., 2003.

DECAPRIO, A. P. The toxicology of hydroquinone – relevance to occupational and environmental exposure. **Crit. Rev. Tox.**, Albuquerque, V. 29, n. 3, p. 283 – 330, 1999.

DELLA ROSA, H. V.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; COLACIOPPO, S. **Monitorização Ambiental e Biológica**. In: OGA, S. Fundamentos de Toxicologia. 2. ed. São Paulo: Atheneu, p. 148-161, 2003.

FARIA, P. M. **Avaliação da exposição ocupacional aos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPA's) em uma usina de asfalto**. São Paulo, 2003. 162 p. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

FUNDACENTRO – Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho. **Bernadino Ramazini: As Doenças dos Trabalhadores.** Tradução de Raimundo Estrela. 2. ed. São Paulo: Fundacentro, 242 p., 1999.

GASKELL, M.; MCLUCKIE, K. I. E.; FARMER, P. B. Comparison of the repair of DNA damage induce by the benzene metabolites hydroquinones and p-benzoquinone: a role for hydroquinone in benzene genotoxicity. **Carcinogenesis**, London, v. 26, n. 3, p. 673 – 680, 2005.

GEORGIEVA, T. MICHAILOVA, A. PANEV, T., POPOV, T. Possibles to control the health risk of petrochemical workers. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlin, v. 75, Suppl: S21 - S26, 2002.

HEE, Q., SHANE, S. **Biological Monitoring: an introduction.** 1. ed. New York: Van Nostrand Reinhold, p. 471, 1993.

HETTER, G. P. An examination of the Phenol-croton Oil pell: part I. Dissecting the formula. **Plast. Reconstr. Surg.**, Le Rouret, v. 1 (1), 227-239, 1999.

HODGSON, E., LEVI, P. E., **A textbook of Modern Toxicology.** 2. ed. Connecticut: Stamford, p. 244 – 247, 1997.

HUMPHREY, M.J., FILER, C.W., JEFFERY, D.J. The availability of carfecillin and its phenol moiety in rat and dog. **Xenobiotica**. Guildford, v.10: 771-778, 1980.

IAKSSON, M. Occupational allergic contact dermatitis from cured and used casting sand. **Contact Derm.**, Copenhagën, v. 46, p. 239 – 240, 2002.

[IPSC], International Program on Chemical Safety. **Formaldehyde.** Geneva: Word Health Organization, 151 p., 2002.

KANERVA, L.; TARVAINEN, K.; PINOLA, A.; LEINO, T.; GRANLUND, H.; ESTLANDER, T.; JOLANKI, R.; FÖRSTRÖM, L. A single accidental exposure may result in a chemical burn, primary sensitization and allergic contact dermatitis. **Contact Derm.**, Copenhagën, v. 31, p. 229 – 235, 1994.

LAURENS, J. B.; MBIANDA, X. Y.; SPIES, J. H.; UBBINK, J. B.; VERMAAK, W.J.H. Validated method for quantification of biomarkers for benzene and its alkylated analogues in urine. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v. 774, p. 173 – 185, 2002.

- LAUWERYS, R. R. **Occupational toxicology**. In: Klassen, C. D.; AMDUR, M.O., DOULL, J., eds. *Casarett & Doll's Toxicology: the basic science of poisons*. 5. ed. New York: Mac-Graw Hill, cap. 33, p. 987 – 1010, 1996.
- LEITE, E. M. A. **Solventes Orgânicos**. In: OGA, S. *Fundamentos de Toxicologia*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, p. 181-185, 2003.
- MANINI, P. ANDREOLI, R. NIESSEN, W. M. A. Liquid chromatography – mass spectrometry in occupational toxicology: A novel approach to the study of biotransformation of industrial chemicals. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 1058, p. 21 – 37, 2004.
- MCDONALD, T. A, HOLLAND, N. T., SKIBOLA, C., DURAMAD, P., SMITH, M. T. Hypothesis: Phenol and hydroquinone derived from diet and gastrointestinal flora activity are causal factors in leukemia. *Leukemia*, London, v. 15, p. 10 – 20, 2001.
- MARIOTTO, C. L. **Evolução dos sistemas ligantes de areia para moldes e machos**. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo S. A. – IPT. 24 p., 1992. (Publicação IPT n. 1959 e.3)
- MARIOTTO, C. L. **Fundição em areias, estudo dos materiais e processos especiais de moldagem em areia**. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas de São Paulo S. A. – IPT., 69 p., 1994. (Publicação do IPT n. 2137 e.1)
- MIRER, F. E. **Fudiciones**. In: STELLMANN, L. *Enciclopedia de Salud Y Seguridad en el Trabajo*, 3. ed. v. II Madrid: Oficina International del Trabajo - OIT Ministerio del Trabajo Y Assuntos Sociales, p. 8215 - 22, 1998.
- MUTTI, A. Biological monitoring in occupational and environmental toxicology. *Toxicol. Lett.*, Amsterdam, v. 108, p. 77 – 89, 1999.
- [NIOSH], NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH. **Health and Safety Guide for Foundries**. Cincinnati: National Institute for Occupational Safety and Health. p. 9 - 14, 1976.
- [NMAM-NIOSH], **Manual of Analytical Methods - Phenol and p-Cresol in urine**. 4. ed. Washington: National Institute For Occupational Safety and Health, 5 p., 1994. (Method 8305, Issue 2, dated 15 august 1994).

[NMAM-NIOSH], **Manual of Analitical Methods - Phenol and Cresol isomers in air**. 4. ed. Washington: National Institute For Occupational Safety and Health, 5 p., 1994. (Method 2546, Issue 1, dated 15 august 1994).

[NMAM-NIOSH], **Guidelines for air sampling and analytical method development and evaluation**. 1. ed. Washington: National Institute For Occupational Safety and Health, 112 p., 1995. (Method 95- 117).

ONG, C. N.; LEE, B. L.; ONG, H. Y.; HENG, L. E. Determination of urinary fenol by acid hydrolysis and Gas Chromatography. **J. Anal. Toxicol.**, New York, v. 12, p. 159 – 161, 1988.

[OPAS] ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE. **Saúde do trabalhador**. 1999. Disponível em: <http://www.opas.org.br/saudedotrabalhador/Sala/Salas.cfm?HOBSNUMCOD=17#Gestão%20de%20Substâncias%20Químicas>
Acesso em: 01/03/2005.

[OSHA] OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH ADMINISTRATION. **Phenol**. International Chemical Safety Cards. Washington: OSHA, 5 p., 2001. (International Safety Cards, 70).

OWEN, C. M.; BECK, M. Occupational allergic contact dermatitis from phenol-formaldehyde resins. **Contact Derm**, Copenhagên, v. 45, p. 294 – 295, 2001.

PEDROSO, M. F. M. **Toxicovigilância (monitorização) da exposição de populações a agentes tóxicos**. In. As Bases Toxicológicas da Ecotoxicologia. 1. ed. São Paulo: Intertox, p. 167 – 219, 2003.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em eluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quim. Nova.**, São Paulo, V. 1, p. 68 - 76, 2001.

RAYMOND, E. B. e PRASHIELA, M. On the Etiology of Contact/ Occupational Vitiligo. **Pigment Cell. Res.**, London, v. 17, p. 208 – 214. 2004.

- RAPPAPORT, S. M.; WAIDYANATHA, S.; CONNELL, K. Y.; ROTHMAN, N.; SMITH, M. T.; ZHANG, L.; SHORE, Q. Q. R.; LI, G.; YIN, S. Protein adduct as biomarkers of human benzene metabolism. **Chem. Bio. Int.**, Columbus, V. 153 – 154, p. 103 – 109, 2005.
- [REBLAS] REDE BRASILEIRA DE LABORATÓRIOS. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Levantamento dos ensaios realizados por laboratórios prestadores de serviços na área de saúde do trabalhador**. 61 p., 2004.
- RUDMAN, K. B. **Metal casting**. Department of Materials Science and Engineering. Michigan Technology University. MY 4130, 154p., 2000.
- SCALBERT, A.; WILLIANSOM, G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. **J. Nutr.**, Rockville, v. 130, n. 8, p. 2073S – 2085S, 2000.
- SNYDER, R. Xenobiotic metabolism and the mechanism(s) of benzene toxicity. **Drug Met. Rev.**, Little Rock, v. 36., n. 3&4, p. 531 – 547, 2004.
- STORK, C. M. **Domestic and building maintenance workers**. In: GREENBERG, M. I. Occupational, industrial and environmental toxicology. 1. ed. Washington: Library of Congress, p. 67 – 68, 1997.
- THOMSEN, K. G. **Health effects of selected chemicals – phenol-formaldehyde resins**. Danish Technological Institute. v. 3. 17 p., 1994.
- UNITED STATES – ATSDR. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Register. **Toxicological profile for phenol**. 1998. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/phenol69.html> Acesso em: 14/02/2005.
- [U.S.EPA] UNITED STATES – ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Toxicological review of Phenol**. Integrated Risk Information System (IRIS). Washington: U.S. EPA, 213 p., 2002. (Integrated Risk Information System (IRIS) n. EPA/635/R-02/006)
- VAINIO, H. Use of biomarkers – new frontiers in occupational toxicology and epidemiology. **Toxicol. Lett.**, Amsterdam, v. 102 - 103, p. 581 – 589, 1998.

- VIAU, C. Biological monitoring of exposure to mixtures. **Toxicol. Lett.**, Amsterdam, v. 134, p. 9 -16, 2002.
- VIONE, D.; MAURINO, V.; MINERO, C.; LUCCHIARI, M.; PELIZZETI, E. Nitration and hydroxylation of benzene in the presence of nitrite/nitrous acid in aqueous solution. **Chemosphere**, Chicago, V. 56, p. 1049 – 1059, 2004.
- [WHO], WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Phenol**. International Programme on Chemical Safety. Geneva: WHO, 98 p., 1994. (Environmental Health Criteria, 412).
- WILLAMS, P. L.; JAMES, R. C.; ROBERTS, S. M. **Principles of toxicology: environmental and industrial applications**. 2. ed. New York: John Wiley & Sons, p. 384 – 385, 2000.
- YAMAGUCHI, Y.; HAYASHI, C. Determination of urinary total phenolic compounds with use of 4-aminoantipyrine: suggested screening test for hyperthyroidism and for catecholamine-producing tumor. **Clin. Chem.**, Washington, V. 23, 2151–2154, 1977.
- YAMAMOTO, Y., YONEI, N., KAMINAKA, C., KISHIOKA, A., UEDE, K., FURUKAWA, F. Effects of phenol peeling on dermal endothelial cells. **J. Derm. Sci.**, Amsterdam, V. 35, p. 158 – 161, 2004.
- ZIMERSON, E.; BRUZE, M. Cross-reaction in patients with contact allergy to simple methylol phenols. **Contact. Derm.**, Copenhagn, p. 8286, 1997.

10 NEXOS

10.1 ANEXO 1 - Determinação da creatinina urinária e da gravidade específica dos trabalhadores da fundição e macharia.

Trabalhador	Creatinina (g/L)	Gravidade específica
Controle 1	1,6	1,024
Controle 2	0,6	1,012
Controle 3	0,5	1,005
Controle 4	3,0	1,022
Controle 5	0,9	1,016
Controle 6	0,8	1,016
Controle 7	1,3	1,020
Controle 8	3,0	1,030
Controle 9	1,2	1,030
Controle 10	1,5	1,022
Exposto 1 (macharia)	1,2	1,022
Exposto 2 (fusão e vazamento)	0,4	1,020
Exposto 3 (fusão e vazamento)	3,0	1,034
Exposto 4 (macharia)	1,4	1,024
Exposto 5 (fusão e vazamento)	1,8	1,022
Exposto 6	1,1	1,014
Exposto 7 (macharia)	0,9	1,020
Exposto 8 (fusão e vazamento)	2,1	1,030
Exposto 9 (fusão e vazamento)	1,1	1,022
Exposto 10 (fusão e vazamento)	1,6	1,024
Exposto 11 (macharia)	1,4	1,020
Exposto 12 (fusão e vazamento)	0,6	1,008

10.2 ANEXO 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU LEGAL RESPONSÁVEL

1. Nome do Sujeito da Pesquisa:.....

Documento de Identidade NºSexo: ()M ()F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº:.....Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....

CEP:.....Telefone:.....

2. Responsável Legal:.....

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.):.....

Documento de Identidade Nº:.....Sexo: ()M ()F

Data de Nascimento:...../...../.....

Endereço:.....Nº:Apto:.....

Bairro:.....Cidade:.....CEP:.....Tel:.....

II – DADOS SOBRE A PESQUISA

1. Título do Protocolo de Pesquisa: “VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE FENOL EM URINA DE TRABALHADORES E AR DO AMBIENTE DE TRABALHO”.

2. Pesquisador: Tiago Severo Peixe

Cargo/Função: Mestrando

Departamento da FCF/USP: Departamento de Toxicologia e Análises Toxicológicas – Programa de Pós Graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas.

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA

Sem Risco () Risco Mínimo () Risco Médio ()
Risco Baixo (**X**) Risco Maior ()

4. Duração da Pesquisa: 2 anos

II – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1. Este estudo tem como objetivo determinar a quantidade de fenol no ar e seu respectivo indicador biológico, fenol urinário, uma vez que as formulações empregadas no preparo das resinas contêm o composto fenol. Será permitindo avaliar o risco ao qual o Sr. está diariamente exposto, e ainda se a condição de trabalho está ou não adequada. Esclarecemos ainda que esta amostra terá a finalidade de avaliar somente os itens descritos acima, não sendo, portanto utilizada para análise de outras substâncias.
2. Aceitando participar deste estudo, haverá um procedimento de coleta de amostra ambiental, por meio de uso de coletor ambiental com filtro específico e será coletada de sua pessoa uma amostra de urina (50-

100 mL) ou por ventura uma segunda amostra se for necessária nova avaliação. Ainda, no dia da coleta de sua amostra você preencherá um questionário que tem por objetivo conhecer um pouco de seus hábitos, seu estado de saúde ou o uso de medicamentos que possam interferir na análise.

3. A coleta será realizada por profissional qualificado, utilizando material descartável, seguindo os procedimentos de assepsia adequados, garantindo assim a sua integridade física.
4. Este estudo pretende avaliar as condições de trabalho e ,se oportuno, sugerir a implementação de mudanças coletivas e individuais, para que se necessário após uma segunda avaliação seja possível assegurar que a sua condição de trabalho não implica em riscos para sua saúde.
5. Todas as análises serão realizadas, de modo a não representar nenhum custo financeiro, para você ou sua empresa.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

1. Você tem assegurado o direito de a qualquer momento do estudo solicitar informações esclarecedoras sobre o andamento dos procedimentos, bem como dos eventuais riscos e benefícios relacionados à sua participação neste estudo. Desta forma, como Pesquisador eu Tiago Severo Peixe, coloco-me a disposição para quaisquer dúvidas que necessitem esclarecimento, relacionados a este projeto.
2. Fica assegurado que a sua posição no seu emprego não será prejudicada, independente de você decidir ou não pela participação neste projeto, bem como do resultado da avaliação da condição de trabalho.
3. Fica assegurado ainda a confidencialidade de sua identidade, bem como sigilo dos resultados obtidos, garantindo assim sua privacidade.

Os resultados do estudo serão publicados sem revelar sua identidade, entretanto estarão disponíveis para consulta pela equipe envolvida no projeto, e pelo Comitê de Ética.

4. Fica assegurado também que no caso de eventual intercorrência no momento da coleta, o Sr. receberá tratamento adequado e será monitorado até que sua condição de saúde se restabeleça. (Não são esperados problemas deste tipo, no entanto é importante garantir assistência no caso de qualquer intercorrência relacionada ao projeto).

V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Pesquisador: Tiago Severo Peixe

Farmacêutico – Bioquímico CRF SP 35747

Faculdade de Ciências Farmacêuticas / Departamento de Toxicologia Bl. 13B / FCF/USP.

Telefone de contato: (11) 3091-2194 com. / 3763-8230 res. / 8351-9678 cel.

VI – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

.....

.....

.....

.....

.....

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

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

São Paulo, _____ de _____ de 2005.

Assinatura do sujeito de pesquisa
ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

INSTRUÇÕES PARA PREENCHIMENTO DO TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

1. Este termo conterá o registro das informações que o pesquisador fornecerá ao sujeito da pesquisa, em linguagem clara e acessível, evitando-se vocábulos técnicos não compatíveis com o grau de conhecimento do interlocutor.
2. A avaliação do grau de risco deve ser minuciosa, levando em conta qualquer possibilidade de intervenção e de dano à integridade física do sujeito da pesquisa.
3. O formulário poderá ser em letra de forma legível, datilografia ou meios eletrônicos.
4. A vida do Termo de Consentimento Pós-Informação submetida à análise do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-FCF) deverá ser idêntica àquela que será fornecida ao sujeito da pesquisa.

10.3 ANEXO 3 – Questionário de hábitos alimentares, consumo de medicamentos e estado de saúde.

São Paulo, _____ de _____ de 2005.

Projeto – VALIDAÇÃO E APLICAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE FENOL EM URINA DE TRABALHADORES E AR DO AMBIENTE DE TRABALHO EM FUNDIÇÕES

QUESTIONÁRIO

Amostra nº: _____

I. Identificação

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

II. Sobre seu trabalho

1. Quantas horas trabalha por dia? _____
2. Quantas vezes por semana você trabalha neste setor?
() 1 () 2 () 3 () 4 () Todos os dias
3. Há quanto tempo tem este emprego? _____
4. Tem algum outro emprego ou bico? () sim () não
Se sim, o que faz? _____
5. Qual a profissão anterior? _____

III. Hábitos pessoais

1. **Fuma?** () sim () não () Parei de fumar Há quantos anos? ____
Quantos cigarros por dia? _____ Há quantos anos? _____

Bebidas Alcoólicas () sim () não

Qual bebida? _____ Quanto por dia? _____ doses

Refrigerante () sim () não

Suco de fruta () sim () não

Qual(is) fruta(s)? _____

Alimentação

Manteiga ou margarina ? () sim () não

Qual a quantidade ? - ex. 15g. uma colher de sopa. _____

4. **Medicamentos** () sim () não Qual (is)? _____

Quantas vezes por semana? _____

Complexos vitamínicos () sim () não Qual (is)? _____

Quantas vezes por semana? _____

5 **Alguma doença crônica?** () sim () não

Qual(is)? _____

10.4 ANEXO 4 – Folha de campo para coleta de amostras ambientais – Fundacentro.

FOLHA DE CAMPO – COLETA DE AMOSTRAS AMBIENTAIS

Empresa	
Responsável pela Coleta	
Data da Coleta	

<i>DADOS DE COLETA DE AMOSTRA</i>
Número de Ponto:
Número da Bomba:
Código de Filtro:

HORÁRIO	1º	HORÁRIO	2º
<i>Liga</i>		Liga	
Desliga		Desliga	
Subtotal (min)		Subtotal	
Tempo Total (min)		Tempo Total (min.)	

<i>TIPO DE COLETA DE AMOSTRA</i>			
	Individual		Total
	Estática		Respirável

Setor	
Operação/Equipamento/avaliados	
Nome do Trabalhador	
Horário de Trabalho	

<i>DESCRIÇÃO DA OPERAÇÃO/EQUIPAMENTO</i>

OBSERVAÇÕES (ventilação, controle etc)

DE			DE		
CALIRAÇÃO			CALIRAÇÃO		
Q (%)			Q_m		

OUTRAS INFORMAÇÕES
Substância amostrada:
Outros componentes:

Tempo amostrado (min)	Volume Amostrado (m³)	Massa (mg)	Concentração (mg/m³)

OBSERVAÇÕES GERAIS

10. 5 ANEXO 5 - Artigo submetido e aprovado pelo Comitê Editorial da Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – RBCF a ser publicado no corrente ano.

Determinação de fenol urinário por cromatografia em fase gasosa em trabalhadores que utilizam resinas fenólicas em fundições

**Tiago Severo Peixe^{1*}, Elizabeth de Souza Nascimento^{*2},
Henrique Vicente Della Rosa^{3*}**

^{1,2,3} Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

O fenol é utilizado na indústria como agente desinfetante, no preparo de resinas fenólicas e pigmentos de tintas. Apresenta-se no estado sólido à temperatura ambiente, com coloração fracamente rósea, odor acre e higroscópico. Na exposição ocupacional aguda o composto pode levar a lesões eritematosas e, cronicamente, afetar a maturação celular no compartimento medular ósseo devido à formação de quinonas livres e 1,4—benzoquinona, proveniente do metabolismo hepático da hidroquinona via CYP2E1. A monitorização biológica possui relevância nas situações de exposições ocupacionais. Para tal, utiliza-se o fenol urinário, considerado bioindicador de exposição a este composto. O objetivo do presente trabalho foi validar uma técnica de extração líquido-líquido para quantificar o fenol urinário, por meio da cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização por chama (CG/DIC) em urina de trabalhadores expostos ao fenol em fundições. O método mostrou-se linear de 5 a 200 µg/mL; coeficiente de regressão linear (r^2) de 0,999; limites de detecção e quantificação 2,0 e 5,0 µg/mL, respectivamente; precisão intra-ensaio entre 4,5 e 8,9% e inter-ensaio entre 5,7 e 14,2%; exatidão entre 6,2 e 11,9% e recuperação superior a 87%. O método demonstrou ser simples e rápido. Amostras provenientes de trabalhadores expostos ao fenol foram analisadas comprovando a aplicação da técnica na monitorização biológica.

Unitermos: Fenol; Cromatografia em fase gasosa; Monitorização biológica.

Correspondência

T. S. Peixe

Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP, Av. Prof. Lineu Prestes, 580, BI 13B.

CEP: 05590-140 – São Paulo – Brasil E-mail: tpeixe@usp.br.

INTRODUÇÃO

A utilização de resinas fenólicas na indústria de fundição data da década de 1950, onde foram amplamente empregadas em substituição aos cimentos naturais, tais como a bentonita para a confecção de moldes em área de macharia ou preparo de molde (Balmgärtel, 1984).

O processo usado na manufatura de moldes requer materiais moldantes, ligantes ou aglutinantes, compactantes e aceleradores de enrijecimento, dentre eles o fenol, com intuito de manter a estabilidade e a resistência à compressão (Mirer, 1998).

Neste contexto, o fenol é um composto da classe dos hidrocarbonetos aromáticos mono-substituídos, obtido naturalmente a partir do alcatrão da hulha e sendo freqüentemente utilizado como desinfetante industrial, na manufatura de nylons, bem como na indústria de petróleo. Apresenta-se no estado sólido, com aspecto cristalino e coloração fracamente rósea ou branca, odor acre, higroscópico, moderadamente volátil à temperatura ambiente, fracamente ácido e ionizado por reações eletrofílicas e de oxidação (Hee, Shane, 1993; WHO, 1994; Stork, 1997; Hodgson, Levi, 1997; OSHA, 2001; U. S. EPA, 2002; CHEMINFO, 2003).

Em exposições agudas o fenol apresenta toxicidade de moderada à alta. Em humanos, a dose letal (DL) é estimada em 70 mg/kg e a DL₅₀ em ratos e coelhos é de 340 mg/kg e 850 mg/kg, respectivamente. Estudos clínicos dermatológicos afirmam que o fenol é agressivo à pele e é utilizado em processos de *peeling*. Em exposições ocupacionais, o fenol pode levar a *rash* cutâneo, com o aparecimento de lesões eritematosas e necrose

tecidual (WHO, 1994; Zimerson, 1997; Owen, Beck, 2001; U.S. EPA, 2002; CHEMINFO, 2003).

O fenol é rapidamente absorvido, após exposição por via inalatória, dérmica e oral, sendo distribuído por todos os tecidos. É biotransformado no fígado sofrendo reações de fase I e II e seus produtos de biotransformação podem ser eliminados a partir de conjugações com sulfato, glutatona e ácido glicurônico, principalmente via P4502E1 (CYP2E1). Além disso, pode sofrer ação na medula por mieloperoxidases liberando quinonas reativas, que seriam, via NQO1 (quinona oxidoreductase), reduzidas novamente a hidroquinona. Tal situação metabólica poderia aumentar o estresse oxidativo e posteriormente alterar o crescimento e diferenciação celular no compartimento medular (McDonald *et al.*, 2001).

O fenol é eliminado pela urina, fezes, saliva e suor, sendo a primeira a principal via de excreção. Seu tempo de meia-vida biológica é de, em média, 12 horas (CHEMINFO, 1994).

Estudos *in vivo* e *in vitro* evidenciam a presença de ligações covalentes entre o fenol e proteínas plasmáticas, além de tecidos. Alguns produtos de biotransformação podem, também, ligarem-se às proteínas pelo fato de que o fenol e seus produtos de biotransformação, possuindo caráter eletrofílico, teriam afinidade com sítios nucleofílicos de grupamentos N-, O- ou S- pertencentes a estruturas protéicas e/ou ao material genético (Kanerva *et al.*, 1994; WHO, 1994; Snyder, 2004).

Dessa forma, a monitorização biológica – mensurações periódicas de biomarcadores, que podem ser definidos como “substâncias exógenas,

metabólitos ou produtos da interação entre xenobióticos e algum alvo celular que é quantificado num compartimento do organismo” – possui papel relevante e complementar nas informações sobre situações de exposições laborais (Mutti, 1999; Vainio, 1998; Viau, 2002).

Para tal, a presença de fenol na urina é considerada indicador biológico da exposição ocupacional ao composto, sendo quantificado de acordo com a legislação específica (NR-7), em função da concentração da creatinina urinária (Tabela I) (Brasil, 1994).

Tabela I - Parâmetros da NR-7 * relativos à exposição ocupacional ao fenol.

Material	Indicador Biológico –IB	VR	IBMP	Método Analítico	Amostragem
Urina	Fenol	20 mg/g creat.	250 mg/g creat.	CG	FJ

* **VR** - Valor de referência, **IBMP** - Índice biológico máximo permitido, **CG** – Cromatografia gasosa, **FJ** - Final de jornada, exceto 1ª dia da semana, **creat.** - creatinina. (Brasil, NR - 7, 1994)

No que se refere à metodologia utilizada na determinação biológica do fenol urinário vários autores sugerem técnicas analíticas tais como GC/FID (cromatografia gasosa com detetor de ionização por chama), HPLC (cromatografia líquida de alto desempenho), GC/MS (cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa), LC/MS (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa) e espectrofotometria UV/VIS (Yamaguci, Hayashi, 1977; Ong *et al.*, 1989; Mutti, 1999; Georgieva *et al.*, 2002; Laurens *et al.*, 2002; Boatto *et al.*, 2004; Manini *et al.*, 2004).

O presente trabalho teve por objetivo validar um método analítico para determinar fenol na urina, utilizando-se a técnica de cromatografia em fase

gasosa com detetor de ionização por chama (CG/DIC) com a finalidade de sua aplicação na monitorização biológica de trabalhadores possivelmente expostos ao fenol em material à base de resinas fenólicas.

MATERIAL E MÉTODOS

Soluções-padrão

Foram preparadas soluções padrão de fenol e nitrobenzeno, utilizado como padrão interno, (PI) em metanol nas concentrações de 1000 µg/mL, obtidos das empresas Riedel-de-Haën® e Androl Produtos Químicos®, respectivamente.

Amostras de trabalhadores expostos

Amostras provenientes de 10 (dez) trabalhadores de indústria de fundição, 7(sete) em contato com materiais à base de resinas fenólicas na área de macharia e 3(três) considerados controles não expostos, que trabalhavam na área de montagem e embalagem das peças metálicas, foram coletadas como preconizado pela Legislação (NR-7) vigente, de acordo com o projeto de pesquisa aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP (Ofício CEP nº 077/2004) e analisadas no Laboratório de Pesquisas Toxicológicas, da Universidade de São Paulo.

Preparo das amostras

Para a padronização do método analítico foi utilizado um *pool* de urina de voluntários homens e mulheres sadios, acadêmicos da Universidade de São Paulo, que declararam não terem sido expostos ocupacionalmente a compostos fenólicos.

Além de uma exposição ocupacional, o fenol urinário pode ser proveniente de outras fontes tais como substâncias presentes em alimentos e no ambiente (Scalbert, Williamson, 2000). Assim, com a finalidade de minimizar estas possibilidades, um *pool* de urina foi tratado com ácido clorídrico 37%, na concentração de 10 % em relação à urina, mantendo-se sob aquecimento até total evaporação. Esta urina foi considerada como controle negativo ou branco após ter sido reconstituída com água mili-Q®.

Otimização das condições cromatográficas

Para melhor resolução cromatográfica do fenol foram estabelecidas as condições cromatográficas para a realização do experimento analítico.

Foi utilizado equipamento de cromatografia em fase gasosa Hewlett-Packard® 6890 equipado com detector de ionização por chama (CG/DIC) nas seguintes condições: razão de divisão no injetor (1:20); coluna megabore de sílica fundida 100 % de polidimetilsiloxano com as dimensões de 15m x 0,53 mm x 1,50 µm (HP-1); temperatura do injetor 200 °C; gás de arraste, nitrogênio a uma vazão de 50 mL/min; programação da temperatura do forno: 60 °C (2 min), 10 °C/min até 120°C e 120°C por 2 min.

Método proposto para determinação de fenol em urina

Em um tubo de vidro esmerilhado foram colocados 5,0 mL de urina controle negativo, 50 µL do padrão interno, volumes relativos às concentrações desejadas do padrão analítico (a partir da solução-mãe de fenol 1000 µg/mL) e 1,0 mL de ácido clorídrico 37%. A mistura foi submetida a aquecimento em estufa a 95°C por 1h e 30. Após resfriamento, adicionou-se à mistura 5,0 mL de éter etílico e 1,0 g de NaCl agitando-se, em uma mesa agitadora, por 10 minutos. Coletou-se 3 mL da fase orgânica e 2,0 µL da mesma foram injetadas no cromatógrafo (CG-DIC).

Determinação da densidade e da creatinina urinária

As amostras de urina obtidas foram corrigidas e ajustadas pela medição da densidade e a determinação da creatinina urinária. A densidade foi medida com auxílio de um urodensímetro e os teores de creatinina foram determinados por método espectrofotométrico usando-se um Kit Labtest®.

Validação do método

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

A validação foi implementada pelo estabelecimento dos valores de limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, precisão intra e inter-ensaio, exatidão, recuperação e estabilidade do analito na matriz.

Limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção (LD) foi determinado por meio de diluições sucessivas da amostra adicionada de fenol até a menor concentração detectável, na qual foi possível obter picos integrados pelo equipamento na relação de 3 vezes a relação sinal/ruído, nas condições cromatográficas otimizadas, em seis replicatas e coeficiente de variação menor que 20 % (Causon, 1997; Chasin *et al.*, 1998; Queiroz *et al.*, 2001).

O limite de quantificação (LQ) do método foi avaliado por meio da análise de amostra adicionada com concentrações decrescentes do composto até a menor concentração determinável com precisão e exatidão aceitáveis e com coeficiente de variação (CV) menor ou igual a 10%. Para a realização das análises foi usado o procedimento descrito acima (n=6) (Causon, 1997; Chasin *et al.*, 1998).

Linearidade

Foram utilizadas as seguintes concentrações: 5, 10, 50, 100, 150 e 200 µg/mL de fenol em urina, analisadas em triplicata/concentração, juntamente com 50 µg/mL de padrão interno.

A linearidade da curva foi avaliada por meio da equação da reta e do coeficiente de determinação (r^2) da curva, o qual deve ser superior a 0,98 (Causon, 1997; Chasin *et al.*, 1998; Queiroz *et al.*, 2001; BRASIL, 2003).

Precisão intra e inter-ensaio

As precisões intra e inter-ensaio foram determinadas por meio da extração em sextuplicata de amostras fortificadas nas concentrações urinárias de 15, 85 e 150 µg/mL analisadas no dia e em três dias consecutivos. A precisão foi calculada indiretamente, por meio da imprecisão, dada pelo coeficiente de variação (CV) das áreas relativas obtidas, sendo que este não deve ser superior a 15% (Causon, 1997; Chasin *et al.*, 1998; Queiroz *et al.*, 2001).

Exatidão

Para o estudo da exatidão, foi determinada a concentração de fenol presente em amostras consideradas como referência negativa, analisando-se o *pool* de amostras de urina obtidas de indivíduos controle negativo nas concentrações de 15, 85 e 150 µg/mL em sextuplicata. A inexatidão foi calculada pela tendenciosidade (*bias*) de acordo com a equação:

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

Esta não deve ser superior a 15% (Chasin *et al.*, 1998; Queiroz *et al.*, 2001; BRASIL, 2003).

Recuperação

Com objetivo de se avaliar a eficiência do método de extração da amostra, após esta ter sido submetida à hidrólise ácida, conforme descrito acima, e, verificarem-se possíveis alterações na determinação, amostras identificadas como brancos foram analisadas. Por comparação da resposta quando a adição foi feita antes da extração *versus* a resposta quando a adição foi realizada após o procedimento de extração, obteve-se a porcentagem do analito recuperado, posteriormente à hidrólise ácida (Chasin *et al.*, 1998; Causon, 1997; BRASIL, 2003).

Estabilidade do analito

A estabilidade do analito foi determinada pela quantificação do fenol adicionado na urina numa concentração de 50 µg/mL. Alíquotas de 5 mL foram armazenadas (n=3) em geladeira a 4 °C e em congelador a (-20°C). A estabilidade do analito foi calculada por meio do coeficiente de variação (CV) das áreas dos picos relativos às análises realizadas após 06, 12, 24 e 48 horas. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos nas análises do tempo zero (Causon, 1997).

RESULTADOS

A Figura 2 apresenta cromatogramas obtidos na análise de amostras de urina: adicionada de fenol a 50 µg/mL, de trabalhador exposto e branco. A análise revela a presença de fenol na concentração de 38,1 mg/g creatinina.

A curva de calibração demonstrou ser linear (5 - 200 µg/mL). A equação de regressão linear e o coeficiente de determinação foram, respectivamente: $y = 0,0791x + 0,0558$ e $r^2 = 0,999$.

Figura 2 – (A) amostra adicionada na concentração de 50 µg/mL. (B) amostra de trabalhador exposto na concentração de 38,1 mg/g creatinina. (C) Perfil cromatográfico obtido na análise de uma amostra branco. PI – padrão interno.

Os parâmetros de validação do método (LD, LQ, precisão intra e inter-ensaio, exatidão e recuperação) para determinação do fenol urinário estão dispostos na Tabela II.

Tabela II - Parâmetros de confiança na validação do método de determinação de fenol urinário.

Parâmetro	Fenol em urina
LD ($\mu\text{g/mL}$)	2,0
LQ ($\mu\text{g/mL}$)	5,0
Precisão intra-ensaio (CV, %)	
C ₁	8,9
C ₂	4,8
C ₃	4,5
Precisão inter-ensaio (CV, %)	
C ₁	14,2
C ₂	5,7
C ₃	8,9
Recuperação (%)	
C ₁	95,7
C ₂	87,9
C ₃	96,2
Inexatidão (CV,%)	
C ₁	6,2
C ₂	11,3
C ₃	11,9

LD: Limite de detecção; LQ: Limite de quantificação; C₁ = 15 $\mu\text{g/mL}$; C₂ = 85 $\mu\text{g/mL}$; C₃ = 150 $\mu\text{g/mL}$; CV: Coeficiente de variação.

Estabilidade

Os resultados do estudo da estabilidade do fenol em amostras de urina, adicionadas na concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$, são indicados nas Tabelas III e IV, referindo-se, respectivamente, à estabilidade do analito nas

concentrações de 50 µg/mL, em alíquotas de 5 mL de urina armazenadas (n=3) em geladeira a 4 °C e em congelador a (-20°C), após 06, 12, 24 e 48 horas. A concentração obtida, corresponde à média da determinação realizada em triplicata da alíquota analisada.

Tabela III – Estudo da estabilidade do fenol em amostras de urina (50 µg/mL), mantidas em geladeira a 4 °C.

Tempo (horas)	Concentração (µg/mL)
0 *	100
06*	46,2
12*	50,3
24*	54,3
48*	45,9

* n: número de amostras analisadas = 3.

Tabela IV – Estudo da estabilidade do fenol em amostras de urina (50 µg/mL), mantidas em freezer a – 20°C.

Tempo (horas)	Concentração (µg/mL)
0 *	50
06*	49,3
12*	48,5
24*	48,2
48*	49,3

* n: número de amostras analisadas = 3.

As amostras de 10 (dez) trabalhadores, 3 (três) delas consideradas controles provenientes de indivíduos não expostos ao fenol, bem como 7 (sete) delas consideradas como sujeitos expostos, foram analisadas apresentando valores entre 7,7 – 38,1 mg/g creatinina. Os resultados das análises, por trabalhador, estão dispostos na Tabela V.

Tabela V – Resultados das determinações de fenol urinário em trabalhadores não-expostos e expostos ocupacionalmente ao fenol.

Amostra	Concentração (mg/g creatinina)
Controle 1	N.D.
Controle 2	7,7
Controle 3	6,9
Amostra 1	9,7
Amostra 2	14,7
Amostra 3	38,1
Amostra 4	10,5
Amostra 5	26,0
Amostra 6	30,3
Amostra 7	34,7

Observação: (N.D.) = abaixo do LQ (5,0 µg/mL).

DISCUSSÃO

Segundo a NR-7, fenol urinário é considerado indicador biológico de exposição ocupacional ao fenol. Este composto, apesar de ser encontrado na urina, originário de outras vias metabólicas (proveniente de alimentos ou de exposições a compostos que possuem o fenol como produto de biotransformação), é utilizado na monitorização biológica com valor de referência conhecido (Tabela I) e considerado para a correta avaliação da exposição ocupacional (BRASIL, 1994).

Alguns métodos para determinação de fenol em amostras biológicas têm sido relatados na literatura científica, utilizando-se técnica de espectrofotometria UV/VIS (Yamaguchi, Hayashi, 1977), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Mutti, 1999), cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (CL/EM) (Manini *et al.*, 2004), cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização por chama (CG/DIC) (Ong *et al.*, 1989), cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM) (Laurens, 2002; Boatto *et al.*, 2004). Resultados obtidos com esses métodos têm demonstrado a possibilidade de utilizá-las para determinação de fenol urinário em trabalhadores expostos em ambiente ocupacional.

A legislação brasileira recomenda a determinação do fenol urinário na monitorização biológica por método de cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização por chama, de acordo com a Tabela I (BRASIL, 1994).

Outras entidades internacionais, tais como a *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (ACGIH), o *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH), bem como a *Organization for Safety and Health Administration* (OSHA) preconizam a quantificação de fenol urinário, como indicador biológico da exposição ao fenol (NIOSH, 1994; OSHA, 2001; ACGIH, 2005).

No presente trabalho, a cromatografia em fase gasosa com detetor de ionização por chama foi utilizada como técnica para a quantificação de fenol urinário. O método, baseado na extração líquido-líquido, demonstrou ser procedimento prático e rápido, em comparação a métodos que utilizam

extração em fase sólida (SPE) (Manini *et al.*, 2004) ou hidrólise enzimática (Adlard *et al.*, 1981). O método utilizado neste trabalho permite a análise de 40 amostras diárias, oferecendo mais agilidade na determinação analítica comparando-se ao método similar validado por Ong *et al.*, 1989, devido a modificações na coluna empregada e na programação na rampa analítica, com tempo de desenvolvimento de 10 minutos, em oposição aos 15 minutos observados no trabalho do autor.

No estudo da especificidade foi observada boa separação cromatográfica, os estudos de precisão intra e interensaios, com CV < 15% demonstraram que alíquotas de 5 mL de urina para a determinação de fenol urinário são suficientes. Além disso, a utilização de éter etílico (5mL) para a extração do fenol da fase aquosa demonstrou ser eficaz na técnica empregada.

A temperatura da estufa de 95 °C não promoveu degradação importante do fenol e seu padrão interno, provavelmente pelo uso de tubo com tampa esmerilhada. Este permitiu um equilíbrio entre a pressão de vapor (pV) do solvente e a do ambiente tamponado. Após o aquecimento os tubos eram acondicionados em recipiente contendo gelo para oferecer uma menor influência na evaporação do fenol.

A adição de NaCl foi importante para promover o efeito “salting out”, em que a adição do sal diminui a ligação do hidrogênio da água com o analito e, assim, a água é “seqüestrada” pela hidratação do sal (Ong *et al.*, 1989).

O nitrobenzeno foi escolhido como padrão interno devido à semelhança estrutural em relação ao fenol, não ser encontrado normalmente na urina, ter ponto de ebulição relativamente próximo ao do fenol e tempo de eluição bastante satisfatório nas condições cromatográficas padronizadas. As duas substâncias são detectadas em menos de dez minutos, permitindo uma análise rápida (Ong *et al.*, 1989; NIOSH, 1994).

A técnica analítica proposta demonstrou ser altamente precisa e exata com o emprego do padrão interno nitrobenzeno. Valores adequados de sensibilidade e linearidade também foram obtidos para o analito. No parâmetro de recuperação a técnica empregada apresentou-se satisfatória demonstrando, por meio dos valores encontrados, uma perda aceitável frente às condições propostas (recuperação superior a 87% para o fenol). O coeficiente de determinação (r^2) foi superior a 0,99 dentro da faixa de interesse de 5 – 200 µg/mL, sendo, portanto, apropriado (Causon, 1997; Chasin *et al.*, 1998; Queiroz *et al.*, 2001; BRASIL, 2003).

A estabilidade foi avaliada segundo duas formas de conservação de amostras de urina: geladeira e freezer. As respectivas análises de estabilidade demonstraram que o método é estável nas condições preconizadas pela legislação em vigor, e, no caso de transporte das amostras, estas podem ser acondicionadas em caixa de isopor com manutenção, por 48h, sem alteração significativa na perda do analito (Adlard *et al.*, 1981).

O NIOSH considera como valor de referência de fenol urinário o intervalo entre 4,5 – 20,7 mg/g creatinina. Já, a Legislação brasileira

preconiza VR (valor de referência) de 20 mg/g creatinina e Índice Biológico Máximo Permitido (IBMP) de 250 mg/g creatinina. Assim, valores de fenol urinário em amostras dos trabalhadores indicam que os indivíduos expostos, em indústria de fundição com preparo de materiais à base de resinas fenólicas, encontram-se abaixo do valor-limite considerado seguro para a saúde e bem estar do indivíduo no ambiente de trabalho.

CONCLUSÕES

O método validado para determinação de fenol urinário por cromatografia em fase gasosa com detecção de ionização por chama demonstrou ser simples, rápido, eficiente, podendo ser facilmente aplicado na monitorização biológica de indivíduos expostos ao fenol.

O método validado pode ser usado na determinação de fenol urinário para monitorização biológica da exposição ocupacional.

ABSTRACT

Determination of urinary phenol by gas chromatography in workers using phenolic resins in foundries

Phenol is used as an industrial chemical, disinfectant agent, in the preparation of phenolic resins and paint pigments. When in solid state, it shows a light pink color, ocre odor, and is hygroscopic. In acute occupational exposure, the compound can produce erythemic injuries and burn sensation and, chronically, affect the cellular maturation of bone marrow due the free quinones and 1,4-benzoquinone, deriving from hepatic metabolism of the hydroquinone by P450 isozyme (CYP2E1). The biological monitoring is important in occupational exposure situations. So, urinary phenol, considered the biological indicator of phenol exposure has to be determined. The aim of this work was to validate a method for urinary phenol quantification, using liquid-liquid extraction. Gas chromatography with flame ionization detector (GC/FID) was used in this method. The analytical procedure showed linearity in the dynamic range of the assay from 5 – 200 µg/mL. The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) were: 2,0 and 5,0 µg/mL, respectively. Intra-assay precision coefficient was between 4,5 – 8,9 % and the inter-assay precision coefficient was between 5,7 – 14,2 %. The accuracy coefficient was between 6,2 – 11,9 %. Recovery values were higher than 87 %. The coefficient of correlation was 0,999. The method is simple, rapid and efficient. Urine samples from workers exposed to phenolic resins were analyzed to show the method application in biological monitoring.

Uniterms: *Phenol; Gas chromatography; Biological monitoring.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMERICAN CONFERENCE of GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS. (ACGIH). 2005 *TLVs® and BEIs® based on the documentation for threshold limit values for chemical substances, physical agents and biological exposure indices*. Cincinnati: ACGIH, 219p, 2005.
- ADLARD, E.R.; MILNE, P. E.; TINDLE, P. E. Determination of phenol by Gas Chromatography with enzymatic hydrolysis. *Chromatographia*, New York, v.14, p. 507, 1981.
- BAUMGÄRTEL, I. Dangerous working substances in foundries - mold materials. Vienna: International Section for the Prevention of Occupational Accidents and Diseases in the Iron and Metal Manufacturing Industry of the International Social Security Association, 43 p., 1984.
- BOATTO, G.; NIEDDU, M.; CARLA, A.; PAU, A.; LORENZONI, S.; MANCONI, P., SERRA, D. Determination of phenol and o-cresol by GC/MS in a fatal poisoning case. *Forens. Sci. Int.*, Dublin, v. 139, p. 191 – 194, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. [ANVISA] – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Resoluções. *Resolução nº 899, de 29 de maio de 2003. Anexo I: Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos*. 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/re/899_03.htm. Acesso em: 13 out. 2004.
- BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. *NORMA REGULAMENTADORA nº7*. Brasil: Ministério do Trabalho e Emprego, 1994. Disponível em: http://www.mte.gov.br/empregador/segau/legislacao/normas/cont_eudo/nr07/default.asp. Acesso em: 07 mar. 2005.
- CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analyses – Viewpoint and discussion. *J. Chromatogr. B.*, Amsterdam, v. 689, p. 175-180, 1997.
- CHASIN, A.A.M.; NASCIMENTO, E. S.; NETO, L.M.R.; 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. Tox.*, São Paulo, v. 11, n.1, p. 1-6, 1999.

CHEMISTRY INFORMATION. (CHEMINFO) *Phenol*. Canadian Centre for Occupational Health and Safety, 19 p., 2003.

GEORGIEVA, T. MICHAILOVA, A. PANEV, T., POPOV, T. Possible to control the health risk of petrochemical workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v. 75, S 21 – S 26, 2002.

HEE, Q., SHANE, S. *Biological monitoring: an introduction*. 1. ed. New York: Van Nostrand Reinhold, p. 471, 1993.

HODGSON, E., LEVI, P. E., *A textbook of modern toxicology*. 2. ed. Connecticut: Stamford, 1997, p. 244 – 247.

KANERVA, L.; TARVAINEN, K.; PINOLA, A.; LEINO, T.; GRANLUND, H.; ESTLANDER, T.; JOLANKI, R.; FÖRSTRÖM, L. A single accidental exposure may result in a chemical burn, primary sensitization and allergic contact dermatitis. *Contact Derm.*, Copenhagen, v. 31, p. 229 – 235, 1994.

LAURENS, J.B.; MBIANDA, X. Y.; SPIES, J. H.; UBBINK, J. B.; VERMAAK, W.J.H. Validated method for quantification of biomarkers for benzene and its alkylated analogues in urine. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 774, p. 173 – 185, 2002.

MANINI, P; ANDREOLI, R; NIESSEN, W. M. A. Liquid cromatography – mass spectrometry in occupational toxicology: A novel approach to the study of biotransformation of industrial chemicals. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 1058, p. 21 – 37, 2004.

MCDONALD, T. A; HOLLAND, N. T.; SKIBOLA, C.; DURAMAD, P.; SMITH, M. T. Hypothesis: Phenol and hydroquinone derived from diet and gastrointestinal flora activity are causal factors in leukemia. *Leukemia*, London, v. 15, p. 10 – 20, 2001.

MIRER, F. E. Fudiciones. In. STELLMANN, L. Enciclopedia de Salud Y Seguridad en el Trabajo, 3. ed. v. II Madrid: Oficina International del Trabajo - OIT Ministério del Trabajo Y Assuntos Sociales, p. 8215 - 22, 1998.

MUTTI, A. Biological monitoring in occupational and environmental toxicology. *Toxicol. Lett.*, Amsterdam, v. 108, p. 77 – 89, 1999.

NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL AND SAFETY HEALTH. (NIOSH). *Manual of Analitical Methods - Phenol and cresol isomers*. 4. ed. Washington: NIOSH, 1994, 5 p. (Method 2546, Issue 1, dated 15 august 1994).

- ONG, C. N.; LEE, B. L.; ONG, H. Y.; HENG, L. E. Determination of urinary phenol by acid hydrolysis and gas chromatography. *J. Anal. Toxicol.*, Niles, v. 12, p. 159 – 161, 1989.
- OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH ADMINISTRATION. (OSHA). *Phenol*. International Chemical Safety Cards. Washington: OSHA, 2001, 5 p., (International Safety Cards, 70).
- OWEN, C. M.; BECK, M. Occupational allergic contact dermatitis from phenol-formaldehyde resins. *Contact Derm*, Copenhagen, v. 45, p. 294 – 295, 2001.
- QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. S.F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em eluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Quim. Nova.*, São Paulo, v. 1, p. 68 - 76, 2001.
- SCALBERT, A.; WILLIANSOM, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J. Nutr.*, Rockville, v. 130, n. 8, suppl., 2000, S 2073 – S 2085.
- SNYDER, R. Xenobiotic metabolism and the mechanism(s) of benzene toxicity. *Drug Met. Rev.*, Little Rock, v. 36, n. 4, p. 531 – 547, 2004.
- UNITED STATES – ATSDR. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Register. *Toxicological profile for phenol*. 1998. Disponível em: <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/phenol69.html>. Acesso em: 14 fev. 2005.
- VAINIO, H. Use of biomarkers – new frontiers in occupational toxicology and epidemiology. *Toxicol. Lett.*, Amsterdam, v. 102 - 103, p. 581 – 589, 1998.
- VIAU, C. Biological monitoring of exposure to mixtures. *Toxicol. Lett.*, Amsterdam, v. 134, p. 9 -16, 2002.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. (WHO). *Phenol*. International Programme on Chemical Safety. Geneva: WHO, 1994, 98 p., (Environmental Health Criteria, 412).
- YAMAGUCHI, Y.; HAYASHI, C. Determination of urinary total phenolic compounds with use of 4-aminoantipyrine: suggested screening test for hyperthyroidism and for catecholamine-producing tumor. *Clin. Chem.*, Washington, v. 23, p. 2151–2154, 1977.

ZIMERSON, E.; BRUZE, M. Cross-reaction in patients with contact allergy to simple methylol phenols. *Contact. Derm.*, Copenhagen, v. 37, n. 2, p. 82 - 86, 1997.