

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

20/10/04

Karineth

in Cilau

Dados: 139158

DBOCC: 2654

terminal: OK

**ÁCIDOS BILIARES COMO BIOMARCADORES PRECOSES DA  
HEPATOTOXICIDADE EM TRABALHADORES EXPOSTOS A  
SOLVENTES EM OFICINAS DE REPINTURA DE VEÍCULOS**

**MARIA JOSÉ NUNES DE PAIVA**

Dissertação para obtenção do grau de  
**MESTRE**

Orientador:

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Elisa P. B. Siqueira

São Paulo  
2003

17909

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

**ÁCIDOS BILIARES COMO BIOMARCADORES PRECOSES DA  
HEPATOTOXICIDADE EM TRABALHADORES EXPOSTOS A  
SOLVENTES EM OFICINAS DE REPINTURA DE VEÍCULOS**

**MARIA JOSÉ NUNES DE PAIVA**

Dissertação para obtenção do grau de  
**MESTRE**

Orientador:  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Elisa P. B. Siqueira

São Paulo  
2003

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS  
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS

ÁCIDOS BILIARES COMO BIOMARCADORES PRECOSES DA HEPATOTOXICIDADE EM TRABALHADORES EXPOSTOS A SOLVENTES EM OFICINAS DE REPINTURA DE VEÍCULOS

AVIAÇÃO DE SÃO PAULO

**Ficha Catalográfica**

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

P149a Paiva, Maria José Nunes de  
Ácidos biliares como biomarcadores precoces da hepatotoxicidade em trabalhadores expostos a solventes em oficinas de repintura de veículos. / Maria José Nunes de Paiva. -- São Paulo, 2003.  
115p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas.

Orientador: Siqueira, Maria Elisa Pereira Bastos de

1. Toxicologia ocupacional 2. Solvente : Toxicologia ocupacional 3. Monitorização biológica : Toxicologia ocupacional  
I. T. II. Siqueira, Maria Elisa Pereira Bastos de, orientador.

615.902 CDD

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

**Maria José Nunes de Paiva**

**ÁCIDOS BILIARES COMO BIOMARCADORES PRECOSES DA  
HEPATOTOXICIDADE EM TRABALHADORES EXPOSTOS A  
SOLVENTES EM OFICINAS DE REPINTURA DE VEÍCULOS**

**Comissão Julgadora  
da  
Dissertação para obtenção do grau de Mestre**

---

**Profa. Dra. Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira  
orientador/presidente**

---

**Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata  
1º. examinador**

---

**Profa. Dra. Silvia Berlanga de Moraes Barros  
2º. examinador**

**São Paulo 17 de setembro de 2003.**

**Dedico este trabalho**

*Ao meu pai **Jorge** e a minha mãe **Conceição**,  
pelo carinho, incentivo, **PACIÊNCIA**, amor e confiança.  
E por me ensinar o valor de todas as coisas  
conquistadas.*

*Ao meu irmãos **Zé** e **Fernanda**,  
por aturar a minha chatice, nervosismo e impaciência.*

*A minha querida **tia Cândida**.*

*A **KKMO**, que nunca mediu esforços pra me ajudar,  
E principalmente por me escutar nas horas de desabafo.*

*A professora **Maria Elisa**,  
pela compreensão e ajuda em todos os momentos difíceis ,  
e pelos ensinamentos, amizade, carinho e confiança.  
A minha gratidão não tem tamanho.*

## **Agradecimentos**

***À minha amiga sempre presente, Patrícia Penido Maia, por tudo que me ajudou.***

***A Miriam Godoy, pela sua amizade e incentivo e pelas boas conversas.***

***Aos colegas da pós-graduação, Bismark, Cláudia Isabel, Cláudia Esteban, Jadson, Michela, Isarita, Fábio, Danielle, Dani Punk, pelos bons momentos que passamos juntos***

***À Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas/Centro Universitário Federal, que proporcionou meios para a realização do trabalho.***

***Aos amigos e funcionários do Laboratório de Análises Toxicológicas da EFOA/Ceufe.***

***Aos professores Henrique Vicente Della Rosa e Mário H. Hirata, pelas sugestões no exame de qualificação.***

***Aos voluntários da pesquisa.***

***Aos coordenadores do programa de pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.***

***Aos professores do curso de Pós-Graduação, pelos ensinamentos.***

***Aos amigos e funcionários do Laboratório de Análises Clínicas EFOA/Ceufe, em especial a Gorete.***

*Aos meus amigos, Vanessa, Flávia, Adilma, Selma e Ronelão, e em especial a Milva, pela compreensão nos momentos difíceis.*

*Aos meus tios e primos e amigos de Cambuí e do Korgo, que com seu apoio e amizade ajudaram a superar os momentos difíceis.*



## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS  
LISTA DE FIGURAS  
LISTA DE QUADROS  
RESUMO  
SUMMARY

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 Bioindicadores de dose interna na exposição ao tolueno</b>	<b>5</b>
<b>2.2 Biomarcadores de hepatotoxicidade.....</b>	<b>9</b>
<b>2.3 Microextração em fase sólida.....</b>	<b>19</b>
2.3.1 <i>Tratamento teórico.....</i>	<i>22</i>
2.3.2 <i>Tipo de sorvente .....</i>	<i>24</i>
2.3.3 <i>Modo de extração .....</i>	<i>25</i>
2.3.4 <i>Condições de extração .....</i>	<i>26</i>
2.3.5 <i>Dessorção.....</i>	<i>29</i>
2.3.6 <i>Vantagens.....</i>	<i>30</i>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>31</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODO .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1 População estudada e ambiente de trabalho .....</b>	<b>33</b>
<b>4.2 Orto - cresol em urina.....</b>	<b>38</b>
4.2.1 <i>Material.....</i>	<i>38</i>
4.2.1.1 <i>Soluções - padrão .....</i>	<i>38</i>
4.2.1.2 <i>Reagentes e solventes.....</i>	<i>39</i>
4.2.1.3 <i>Aparelhos, vidraria e acessórios. ....</i>	<i>39</i>
4.2.2 <i>Método .....</i>	<i>40</i>
4.2.2.1 <i>Otimização da microextração em fase sólida (SPME) .....</i>	<i>40</i>

4.2.2.2 Otimização das condições cromatográficas .....	41
4.2.2.3 Validação do método.....	41
<b>4.3 Ácidos biliares no soro .....</b>	<b>43</b>
4.3.1 <i>Material</i> .....	43
4.3.1.1 Padrões e reagentes.....	43
4.3.1.2 Aparelhagem e vidraria .....	44
4.3.2 <i>Método</i> .....	44
<b>4.4 Ácido hipúrico na urina.....</b>	<b>46</b>
4.4.1 <i>Material</i> .....	46
4.4.1.1 Soluções-padrão .....	46
4.4.1.2 Reagentes e solventes.....	46
4.4.1.3 Aparelhagem e vidraria .....	47
4.4.2 <i>Método</i> .....	48
<b>4.5 Parâmetros bioquímicos .....</b>	<b>50</b>
4.5.1 <i>Material</i> .....	50
<b>4.6 Análise estatística.....</b>	<b>50</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
<b>5.1 Orto-cresol em urina.....</b>	<b>52</b>
5.1.1 <i>Otimização da microextração em fase sólida</i> .....	52
5.1.2 <i>Otimização das condições cromatográficas</i> .....	55
5.1.3 <i>Parâmetros de validação</i> .....	56
<b>5.2 Ácidos biliares em soro.....</b>	<b>59</b>
<b>5.3 Ácido hipúrico na urina.....</b>	<b>60</b>
<b>5.4 Bioindicadores de dose interna, ácidos biliares e parâmetros bioquímicos na população avaliada.....</b>	<b>61</b>
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>

<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>93</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>95</b>
<b>9. ANEXOS .....</b>	<b>106</b>

## LISTA DE TABELAS

1 - Tipos de fibras utilizadas em SPME (Supelco®).....	26
2 - Características da população <b>exposta</b> a solventes nas oficinas de funilaria e pintura.....	35
3 - Características da população <b>controle</b> .....	37
4 - Precisão intra e interensaio (% CV) do método para determinação de orto-cresol em urina por microextração em fase sólida.....	58
5 - Recuperação do método para o orto-cresol urinário.....	58
6 - Precisão intra-ensaio do método para análise de ácidos biliares...	60
7 - Precisão interensaio do método para análise de ácidos biliares....	60
8 - Precisão do método para determinação de ácido hipúrico em urina.....	61
9 - Valores de orto-cresol (OC) e ácido hipúrico (AH) em urina e ácidos biliares (AB) no soro do <b>grupo de exposto</b> .....	62
10 - Valores de ácido hipúrico (AH) em urina e ácidos biliares (AB) no soro no <b>grupo controle</b> .....	64
11 - Medidas descritivas para orto-cresol ( mg/mL e mg /g de creatinina) em trabalhadores do <b>grupo exposto</b> .....	66
12 - Medidas descritivas para o ácido hipúrico (g/L e g/g de creatinina) em voluntários do <b>grupo exposto</b> e do <b>grupo controle</b> ..	66
13 - Medidas descritivas para as concentrações dos ácidos biliares ( $\mu\text{mol/L}$ ) nos <b>grupos exposto e controle</b> .....	68
14 - Parâmetros bioquímicos nos indivíduos do <b>grupo exposto</b> .....	70
15 - Parâmetros bioquímicos nos indivíduos do <b>grupo controle</b> .....	72
16 - Influência dos hábitos individuais e de trabalho sobre os parâmetros avaliados nos trabalhadores expostos.....	74

<b>17 - Diferenças entre os grupos controle e exposto, quanto ao número de indivíduos com valores acima do limite superior do intervalo de referência para cada parâmetro analisado (teste do qui quadrado).....</b>	<b>75</b>
<b>18 – Correlações entre os parâmetros analisados nos grupos exposto e controle.....</b>	<b>77</b>

## LISTA DE FIGURAS

1 – Representação esquemática da biotransformação do tolueno com formação de ácido hipúrico.....	7
2 – Representação esquemática da biotransformação do tolueno a cresóis.....	9
3 - Interconversão dos aminoácidos pelas transaminases.....	12
4 – Representação esquemática da formação do ácido cólico.....	17
5 - Dispositivo para microextração em fase sólida.....	21
6 - Fluxograma do método de extração do orto-cresol urinário.....	43
7 - Fluxograma da extração líquido-líquido do ácido hipúrico.....	49
8 – Áreas dos picos de orto-cresol obtidas em diferentes tempos de exposição da fibra CW/DVB em urina fortificada com orto-cresol (2 mg/L)	52
9 – Áreas dos picos de orto-cresol (2 mg/L) obtidas em diferentes tempos de dessorção da fibra CW/DVB no injetor do CG a 210°C.....	53
10 - Áreas dos picos de orto-cresol (2 mg/L) obtidas de amostras submetidas ou não à agitação com exposição da fibra CW/DVB.....	53
11- Áreas dos picos de orto-cresol obtidos com a adição de quantidades variadas de Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> às amostras com a exposição da fibra CW/DVB.....	54
12 - Áreas dos picos de orto-cresol (2 mg/L) obtidas com a variação do pH das amostras com a exposição da fibra CW/DVB.....	54
13 - Cromatograma de amostra de urina fortificada com orto-cresol (0,5 mg/L) e padrão interno (NA, 1,0 mg/L), após extração por SPME.....	56
14 - Curva de linearidade do orto-cresol (OC) urinário. Áreas relativas à <i>p</i> -nitroanilina (PI).....	57
15 - Curva de linearidade dos ácidos biliares em soro.....	59
16 - Representação das concentrações do ácido hipúrico (g/g de creatinina) encontrados no grupo de trabalhadores expostos e no grupo controle.....	67

---

<b>17 - Distribuição dos valores do ácido hipúrico na população exposta ocupacionalmente aos solventes (Shapiro-Wilk, <math>w=0,82349</math> <math>p &lt; 0,0001</math>)...</b>	<b>67</b>
<b>18 - Representação das concentrações dos ácidos biliares (<math>\mu\text{mol/L}</math>) encontrados no grupo exposto e no grupo controle.....</b>	<b>68</b>
<b>19 - Distribuição dos valores dos ácidos biliares na população exposta ocupacionalmente aos solventes (Shapiro-Wilk, <math>w=0,85195</math> <math>p &lt; 0,0001</math>)...</b>	<b>69</b>
<b>20 - Correlação dos valores de orto-cresol (<math>\text{mg/L}</math>) e ácido hipúrico urinários (<math>\text{g/L}</math>), expressos pela creatinina, em trabalhadores do grupo exposto.....</b>	<b>78</b>

## LISTA DE QUADROS

1 – Tempo de profissão em meses (TP), sintomas relatados (*) e total de sintomas por pintor.....	79
--	----



## Resumo

Nas oficinas de repintura automotiva os trabalhadores se expõem a múltiplos solventes, principalmente o tolueno. Estes solventes apresentam risco à saúde dos trabalhadores e a prevenção, assim como a vigilância à saúde dos trabalhadores, são atividades que devem ser implantadas nestes ambientes. Recentemente, tem sido sugerido que os ácidos biliares (AB) no plasma podem ser biomarcadores precoces da hepatotoxicidade na exposição às substâncias químicas. Este trabalho objetivou estudar a aplicabilidade dos ácidos biliares como biomarcadores precoces do dano hepático na exposição de trabalhadores de oficinas de repintura de veículos expostos a múltiplos solventes orgânicos e comparar o seu desempenho com alguns parâmetros bioquímicos clássicos de hepatopatias. A proposição e validação de método por microextração em fase sólida (SPME) de orto-cresol (OC) em urina, assim como a análise de ácido hipúrico urinário, metabólitos do tolueno, também foram finalidades desta pesquisa. Um grupo de 57 trabalhadores expostos a tintas e tintneres, e 51 voluntários não expostos ocupacionalmente a solventes constituíram o grupo exposto e controle respectivamente. Todos os indivíduos responderam a um questionário sobre hábitos pessoais e de trabalho. Os ácidos biliares no soro foram analisados por método enzimático espectrofotométrico e a identificação e quantificação do OC e AH em urina foram feitas por cromatografia gasosa/detector de ionização de chama. Todos os fatores que intervêm no rendimento da extração por SPME foram otimizadas e o método validado. O melhor rendimento para a SPME foi obtido com a hidrólise ácida da urina e expondo a fibra carbowax/divinilbenzeno 70  $\mu\text{m}$  por 20 minutos em pH neutro com a adição de 3,0 g de sulfato de sódio sobre agitação. A linearidade, precisão intra-ensaio, recuperação, limites de detecção e de quantificação foram satisfatórios para a análise de OC em urina de trabalhadores expostos. Os valores médios ( $\pm\text{DP}$ ) para os ácidos biliares em plasma foram, respectivamente, de 10,4 ( $\pm 6,6$ )  $\mu\text{mol/L}$  para o grupo exposto e de 5,62 ( $\pm 3,70$ )  $\mu\text{mol/L}$  para o controle. O OC não foi detectado na população não exposta ocupacionalmente a solventes e nos expostos, em 45%, com valores médios ( $\pm\text{DP}$ ) de 0,26 ( $\pm 0,17$ ) mg/g de creatinina. Para o AH os valores médios ( $\pm\text{DP}$ ) foram de 0,65 ( $\pm 0,56$ ) e 0,30 ( $\pm 0,32$ ) g/g de creatinina para o grupo exposto e controle respectivamente. O método proposto para a análise de OC em urina apresentou características adequadas para o uso na biomonitorização de trabalhadores expostos ao tolueno. Os ácidos biliares foram o parâmetro bioquímico mais alterado nos trabalhadores expostos com relação aos demais testes bioquímicos de hepatotoxicidade e o que apresentou diferença mais significativa entre os dois grupos, e pode ser aplicado na detecção precoce de dano hepático na exposição a múltiplos solventes orgânicos.

## SUMMARY

In automotive body repair shops, workers are normally exposed to multiple solvents, mainly toluene. The solvents are dangerous to the workers' health and prevention measures must be implemented as well as health surveillance programs. Recently, serum bile acids (SBA) have been proposed as early hepatotoxicity biomarker in subjects exposed to several chemical substances. This study aims to evaluate SBA applicability as early biomarker of hepatic injury in workers exposed to multiples organic solvents in automotive body repair shops and to compare its performance with others hepatotoxicity biochemical parameters. The development and validation of a solid phase microextraction (SPME) method for ortho-cresol (OC) in urine, as well as the analysis of urinary hippuric acid (HA), metabolites of toluene, were also objectives of this research. A group of 57 workers exposed to solvents from paints and tinnings and 51 subjects nonoccupationally exposed formed the exposed and control group respectively. All participants answered to a questionnaire about their private and work habits. The serum bile acids were analysed by a spectrophotometric enzymatic method and the urinary OC and HA by gas-chromatography/flame ionization detector methods. All factors, which interfere in SPME extraction output, were optimised and the method was validated. The best output for SPME was reached with urine acid hydrolysis and Cabowax /divinylbenzene 70µm fiber, exposed by 1 to 20 minutes in neutral pH urine, with addition of sodium sulphate under agitation. The linearity, intra-assay precision, recovery, detection and quantification limits were satisfactory to analysis of OC in the exposed workers. The mean values ( $\pm$ SD) to serum bile acids were respectively 10.4 ( $\pm$ 6.6) µmol/L to the exposed group and of 5.62 ( $\pm$ 3.70) µmol/L to the control group. Ortho-cresol was not detected in the nonoccupationally exposed subjects and only in 45% of those who were exposed to solvents, with mean value ( $\pm$ SD) of 0.26 ( $\pm$ 0.17) mg/g of creatinine. The mean values ( $\pm$ SD) to urinary HA were of 0.65 ( $\pm$ 0.56) to the exposed group and of 0.30 ( $\pm$ 0.32) g/g of creatinine to the control. The SPME method proposed to OC analysis shows characteristics that permit its use on biomonitoring of workers exposed to toluene. The serum bile acids was the biochemical parameter more altered in exposed workers than any other hepatotoxicity test performed. On the other hand, it was the most significantly altered taking into account the results from the two groups studied. Then, the measurement of serum bile acids concentrations seems to be helpful in detecting early changes of hepatic function due to exposure of workers to solvents in automotive body repair shops.

# INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

Os solventes orgânicos são substâncias extensamente utilizadas em tintas, tineres, vernizes, laquês, colas, entre outros (ALVAREZ-LEITE, 2003; ANGERER, 1979; ANGERER & KRAMER, 1997; CHEN et al., 1991). A experiência em saúde ocupacional demonstra que o homem tem se exposto simultânea ou seqüencialmente a múltiplos solventes, e não apenas a um deles (IKEDA, 1995). A composição do solvente varia de acordo com a finalidade do produto, entretanto, o tolueno ainda é o mais prevalente, misturado a outros compostos como éteres, cetonas e hexano (BERGERET & NESTLER, 1991).

Nas oficinas de reparo e repintura automotiva são utilizadas tintas e diluentes contendo solventes. De acordo com os pintores, para cada litro de tinta utilizada é consumido um litro de tiner para as diluições correspondentes, sendo este diluente também usado na limpeza das peças a serem repintadas e do revólver de aplicação da tinta, como também para a lavagem das mãos. Na maioria dos rótulos das tintas encontra-se somente a classe de solventes neles contidas e os dizeres "não contém benzeno".

Os Estados Unidos, o Japão e os países do oeste da Europa são os maiores produtores de tolueno do mundo, produzindo por ano aproximadamente 10 milhões de toneladas. Até a década de 80 o Brasil importava 20% do que consumia e com o aumento da produção nacional, o País passou a exportar parte da sua produção (ANUÁRIO, 2002).

Nos anos de 1998 e 1999 o Brasil produziu 212.950 toneladas de tolueno por ano em média e em 2001, 389.402 toneladas foram obtidas, sendo 17% exportadas (ANUÁRIO, 2002).

A indústria de corantes e pigmentos, que utiliza o tolueno como solvente, vem passando por grandes transformações, transferindo os centros produtores da Europa para países como a China e a Índia, cujos custos de produção são mais baixos. Estas transformações afetaram o Brasil no período de 1995 a 2001, que teve metade das suas unidades produtivas fechadas. Apesar desta queda, a produção aumentou 2,8% em 2001 em

relação a 2000 e as exportações cresceram 5,6% em volume. Segundo a Associação Brasileira dos Fabricantes de Tintas (Abrafati), a produção de tintas rendeu 1,4 bilhões de dólares para os fabricantes e as vendas internas aumentaram em 43,9% em 2001 (ANUÁRIO, 2002).

Infelizmente, a exposição ocupacional a solventes apresenta risco à saúde dos trabalhadores. Os efeitos *agudos* são caracterizados por euforia, desorientação, vertigem, evoluindo conforme o aumento da exposição, para inconsciência, paralisia, convulsão e parada cardio-respiratória, além de irritação dos olhos e das vias aéreas superiores. Os efeitos *crônicos*, manifestados principalmente sobre o sistema nervoso central são: fadiga, distúrbios do sono, disfunção na visão das cores, irritabilidade, dificuldade de concentração, problemas de memória recente, disfunção psicomotora e cefaléia. Efeitos nocivos sobre o fígado e rins também são relatados (ALVAREZ-LEITE, 2003; BAKER, 1994; BERGERET & NESTLER, 1991; BOSCH et al., 1989; ESCALONA et al., 1995; GREENBERG, 1997; SAITO & WADA, 1993). As exposições a baixas concentrações de solventes e por longo tempo podem originar efeitos neurocomportamentais persistentes (MAYAN et al., 1999).

Além de medidas de engenharia de segurança do trabalho, para se prevenir intoxicações dos trabalhadores, deve ser realizada a monitorização do ambiente de trabalho e a biológica. No Brasil, a Norma Regulamentadora nº15, Portaria 3214 do Ministério do Trabalho, recomenda um Limite de Tolerância de 78 ppm para o tolueno (BRASIL, 1978). A monitorização do ambiente de trabalho pode não expressar a concentração efetiva da substância no organismo, devido aos fatores interindividuais como uso de equipamento de proteção individual, movimentação no ambiente, hábitos pessoais, entre outros (GOBBA et al., 1997; NISE, 1992; PIERCE et al., 1998).

A monitorização biológica da exposição a solventes, até o momento, é feita através de bioindicadores de dose interna, que permitem a avaliação da exposição a cada substância individualmente, sendo os valores limites do bioindicador interpretados também deste modo (ACGIH, 2001; BRASIL,

1994). Tais bioindicadores são representados por alguns de seus metabólitos, excretados em urina, ou pelo próprio solvente inalterado em sangue e/ou urina (AITIO & KALLIO, 1999; CAPEROS & FERNANDES, 1997; GOBBA et al., 1997; JANG et al., 1993). Para o tolueno, os metabólitos mais usados são o ácido hipúrico (AH) e o orto-cresol (OC), ambos em urina. De 62 a 80% do tolueno absorvido é biotransformado em ácido hipúrico. A oxidação do anel aromático forma em menor proporção o orto-cresol. Apesar de presente em quantidades mais baixas, o orto-cresol é considerado um bioindicador mais específico para a exposição ao tolueno (DOSSING et al., 1983; HASEGAWA et al., 1983; NISE, 1992).

Pode ocorrer interações entre os diversos solventes absorvidos pelo indivíduo exposto, especialmente ao nível de biotransformação e de alguns órgãos. As interações metabólicas afetam a eliminação dos produtos formados, aumentando uns e diminuindo outros. Deste modo, a avaliação da exposição realizada pela determinação do metabólito urinário pode subestimar o nível real da absorção de um determinado solvente (COHR & STOKHOLM, 1979; LOF & JOHANSON, 1998).

Tem sido recomendado, que ao lado da biomonitorização de dose interna, através do solvente inalterado ou de seus metabólitos urinários, se pesquise alterações relacionadas aos seus efeitos nos órgãos afetados, estas sim, refletindo mecanismos interativos das exposições simultâneas (FRANCO et al., 1986).

Um biomarcador de dano ou disfunção de um órgão seria *uma alteração mensurável em células ou produtos celulares causados por um efeito anormal em um órgão em particular* (WHO, 1993).

Segundo IKEDA (1999) um biomarcador deste tipo ao ser aplicado em atividades de vigilância à saúde do trabalhador visando a detecção precoce de efeitos nocivos deve estar relacionado com alterações reversíveis.

Alguns estudos têm sido realizados para investigar a relação entre a injúria hepática e a exposição simultânea a múltiplos solventes presentes nas tintas e colas. A maioria desses estudos envolve a avaliação de parâmetros bioquímicos clássicos e pouco sensíveis, principalmente das

atividades das transaminases, fosfatase alcalina e  $\gamma$ -glutamyl-transferase (CHEN et al., 1991; DRISCOLL et al., 1992; LIU et al., 1996).

A necessidade de detecção precoce de disfunção hepática tornou-se mais importante na atualidade, quando o uso de solventes mais danosos tem sido restringido e as medidas de higiene industrial são cada vez mais aplicadas. Assim, a preocupação é maior com os efeitos crônicos, advindos de exposição a baixas concentrações ambientais de solventes, que podem causar doenças subclínicas ou danos hepáticos crônicos.

Estudos de testes mais sensíveis de hepatotoxicidade têm sido implementados, como o dos ácidos biliares. Pelo fato da regulação do metabolismo dos ácidos biliares ser uma das principais funções do fígado, alterações detectáveis em seus valores refletem a disfunção deste órgão (FRANCO et al., 1986; LIU et al., 1996).

Na avaliação do dano hepático precoce é também importante comparar a sensibilidade de ácidos biliares séricos com os demais testes mais usados de hepatopatia como a bilirubina, a fosfatase alcalina, as transaminases e a  $\gamma$ -glutamyl-transferase.

O aumento de sais biliares no sangue parece decorrer de alterações de sua captura hepatocelular provocadas por substâncias químicas. Foi demonstrado por KUKONGVIRIYAPAN et al. (1990) que o tetracloreto de carbono e demais solventes halogenados alteram significativamente esses sais. Porém, não se têm dados concretos sobre a utilidade deste biomarcador na detecção de dano hepático na exposição a múltiplos solventes orgânicos, entre eles, o n-hexano, tolueno, cetonas e xilenos o que motivou o desenvolvimento desta pesquisa.

# REVISÃO DA LITERATURA



## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

Neste item será feita uma revisão de alguns aspectos considerados mais relevantes com relação ao objetivo desta pesquisa, ou seja:

- dos bioindicadores de dose interna preconizados para a avaliação da exposição ao tolueno, escolhido por ser o solvente mais prevalente nas tintas e tinturas usados na repintura de veículos;
- dos bioindicadores de hepatotoxicidade, especialmente os ácidos biliares;
- da técnica analítica de microextração em fase sólida (SPME), de introdução recente em análises toxicológicas no País, e usada na análise do orto-cresol.

### **2.1 Bioindicadores de dose interna na exposição ao tolueno**

O tolueno no sangue, no ar exalado e na urina, e os metabólitos urinários - ácido hipúrico e orto-cresol - têm sido utilizados para a monitorização biológica de trabalhadores expostos a este solvente, em diversos tipos de atividades.

Mesmo expressando a intensidade da exposição e representando uma estimativa da carga corpórea, as concentrações de tolueno no sangue podem variar em segundos devido à rápida migração para outros tecidos. Desta forma, uma criteriosa padronização da amostragem de sangue se faz necessária para validar a interpretação dos resultados (ANGERER & KRÄMER, 1997; NISE & ORBAEK, 1988).

Há uma boa correlação entre as concentrações ambientais de tolueno com as do solvente no sangue, porém, esta análise é limitada pela rápida distribuição do tolueno para os tecidos (NISE & ORBAEK, 1988; PIERCE et al., 1998). Portanto, a coleta das amostras durante a jornada de trabalho reflete a exposição recente e não a exposição média ocorrida ao longo do dia.

ANGERER & KRÄMER (1997) verificaram que uma exposição a 65 ppm de tolueno no ambiente proporciona correlação significativa com as concentrações médias sanguíneas de tolueno, de 0,91 mg/L.

No ar exalado, a concentração de tolueno representa cerca de 15 a 20% da quantidade absorvida do solvente (ANGERER & KRÄMER, 1997; PIERCE et al., 1998). Até 1996 a *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* 1996, preconizava o tolueno no ar exalado como bioindicador, o qual a coleta deve ser feita no final da jornada de trabalho. A atual utilização deste bioindicador está suspensa (ACGIH, 2001).

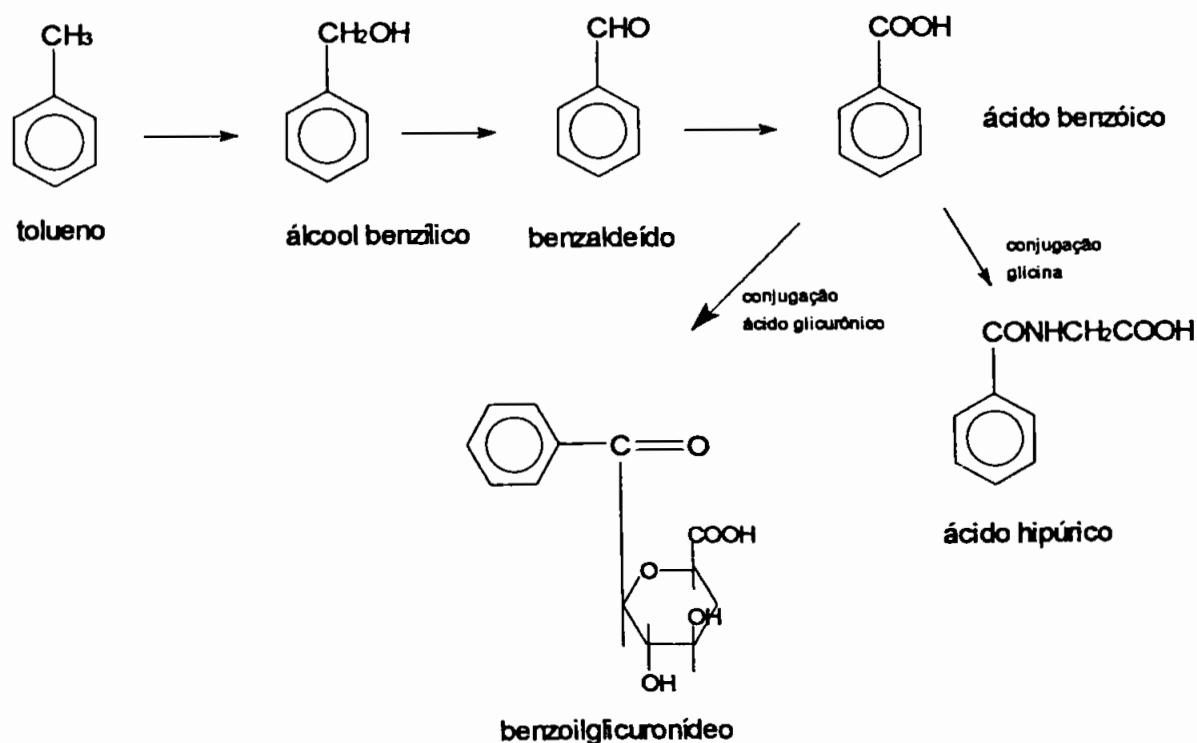
Considerando-se a urina como matriz biológica para a determinação dos solventes inalterados observa-se que essas substâncias não estão habitualmente presentes, com raras exceções como a acetona. Conseqüentemente a determinação do solvente inalterado na urina pode constituir indicador específico da exposição, ao contrário dos seus metabólitos. Da quantidade de tolueno absorvida, apenas 0,06% pode ser excretado inalterado na urina (GOBBA et al., 1997; INOUE et al., 1998).

KAWAI et al, (1996) evidenciaram boa correlação entre tolueno no ambiente e o tolueno inalterado em urina ( $r = 0,8$ ). Entretanto, apesar de ser bioindicador específico e a coleta não ser invasiva, este bioindicador ainda apresenta limitações para uso rotineiro em monitorização biológica devido à pequena quantidade excretada dificultar a análise.

O metabólito do tolueno excretado em maiores proporções na urina é o ácido hipúrico. A oxidação do grupamento metila da cadeia lateral é a principal via de biotransformação do tolueno. Inicialmente é formado o álcool benzílico pelo sistema microsômico do citocromo P-450, que pela ação da álcool desidrogenase, é transformado em benzaldeído. Este é oxidado pela aldeído desidrogenase formando o ácido benzóico (75 a 80% da quantidade absorvida), que conjugado com a glicina e o ácido glicurônico forma, respectivamente, o ácido hipúrico (80%) e o benzoil-glicuronídeo (20%), compostos mais hidrossolúveis eliminados através da urina (Figura 1) (ALVAREZ-LEITE & AMORIM, 2000; ANGERER & KRÄMER, 1997; BAELUM et al., 1998; DE ROSA et al., 1987; HASEGAWA et al., 1983; NISE,

1992; PIERCE et al., 1998). Após 30 minutos do início da exposição ao tolueno as quantidades de ácido hipúrico se elevam e a maior parte é eliminadas em 16 horas (ANGERER & KRÄMER, 1997; IARC, 1988; PIERCE et al., 1998).

Apesar de ser um constituinte normal de urina, o ácido hipúrico é muito utilizado como bioindicador da exposição ao tolueno. Sua concentração em indivíduos não expostos varia de não detectado a 1,6g/g de creatinina, valor de referência adotado pela ACGIH (2001) e até 1,5 g/g de creatinina segundo a NR-7 (BRASIL, 1994). Em estudo realizado no País, SIQUEIRA & PAIVA (2002) detectaram valores entre 0,05 e 0,50 g/g de creatinina (média de 0,18 g/g de creatinina) na população do sul de Minas Gerais. ALVAREZ-LEITE & AMORIM, (2000) determinaram valores médios de 0,42 g/g de creatinina na população da região metropolitana de Belo Horizonte.



**FIGURA 1** – Representação esquemática da biotransformação do tolueno com formação de ácido hipúrico

O ácido hipúrico pode originar-se de dietas ricas em alimentos que contenham o ácido benzóico e/ou seus precursores. Dentre eles se destacam as frutas como ameixa e pêssego, e de bebidas e alimentos conservados com benzoato (ANGERER & KRÄMER, 1997; PIERCE et al., 1998).

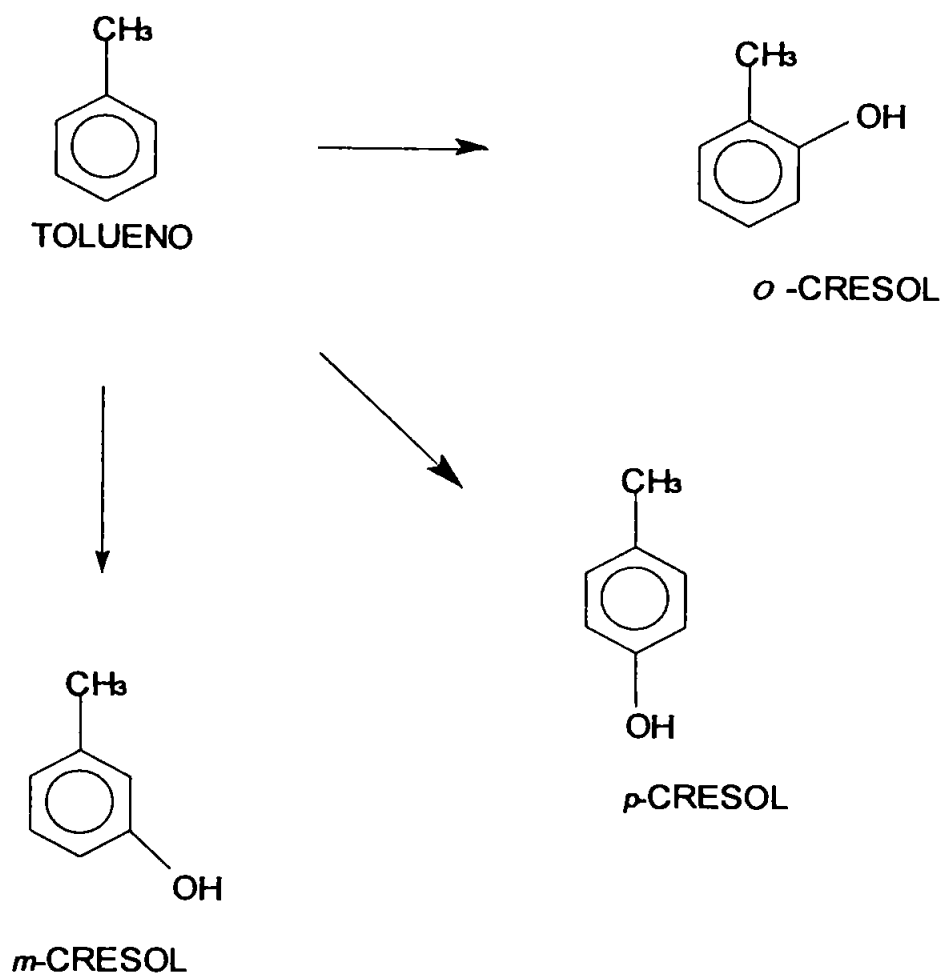
Quando a exposição ao tolueno acontece em concentrações baixas, o ácido hipúrico de procedência não ocupacional pode modificar significativa e imprevisivelmente a relação entre a exposição ao solvente e os valores urinários deste metabólito (TRUCHON et al., 1999).

Principalmente pela presença de ácido hipúrico na urina de indivíduos não expostos ocupacionalmente ao tolueno, tem sido sugerida a medida do orto-cresol urinário, metabólito mais seletivo (ANDERSSON et al., 1983; DE ROSA et al., 1987; HASEGAWA et al., 1983; NISE, 1992).

O organismo humano não só oxida a cadeia alifática do tolueno como também seu núcleo aromático, originando o orto-cresol (Figura 2). Apenas 1% do tolueno absorvido sofre esta oxidação, formando *orto*, *meta* e *para* cresóis, excretados na urina conjugados com o sulfato ou o ácido glicurônico (ANGERER, 1985; ANGERER & KRAMER, 1997; DOSSING et al., 1983; HASEGAWA et al., 1983; NISE, 1992; PIERCE et al., 1998).

Dos cresóis, o isômero *para* é fisiologicamente excretado na urina em concentrações acima de 29 mg/L em indivíduos não expostos ao tolueno, originário da degradação da tirosina. Deste modo, somente o isômero *orto* seria satisfatório para a biomonitorização da exposição ao tolueno, sendo também encontrado em maior quantidade que o isômero *meta* (ANGERER & KRÄMER, 1997).

ANGERER (1985) em estudo da exposição ocupacional a 200 ppm de tolueno por 8 horas observou a exceção da 1,5 a 2,8 mg/L de orto-cresol na urina, enquanto DOSSING et al. (1983) encontraram concentrações de orto-cresol acima de 4,5mg/L, em condições similares de exposição ao solvente.



**FIGURA 2** – Representação esquemática da biotransformação do tolueno a cresóis

Apesar do orto-cresol ser considerado mais específico de que o AH, existem evidências de que os fumantes têm valores mais elevados quando comparados com os não fumantes (DOSSING et al., 1983; IARC, 1986; NISE, 1992).

## 2.2 Biomarcadores de hepatotoxicidade

As alterações hepáticas vêm sendo associadas com a exposição ocupacional a várias substâncias químicas, porém, poucas indústrias que

utilizam substâncias químicas com potencial hepatotóxico monitorizam o dano hepático. Alguns solventes clorados como o  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$  são considerados xenobióticos potencialmente hepatotóxicos, sendo que a exposição concomitante destes com o etanol agrava este efeito (BAI et al., 1992; FRANCO et al., 1986).

A preocupação com trabalhadores expostos vem conduzindo pesquisas com a finalidade de desenvolver testes de laboratório para o diagnóstico precoce e a prevenção de disfunções hepáticas decorrentes da exposição no ambiente de trabalho.

Vários parâmetros bioquímicos são utilizados para detecção de dano hepático, entre eles, a albumina, a bilirrubina, a fosfatase alcalina e a  $\gamma$ -glutamil-transferase, todos no soro e, mais raramente, os ácidos biliares em várias matrizes (BAI et al., 1992; FRANCO et al., 1986; LIU et al., 1996; NEGHBAB & STACEY, 1997).

A **bilirrubina** é produzida no fígado, baço e na medula óssea, constituindo um produto de degradação da hemoglobina. Os valores de bilirrubina podem ser avaliados como bilirrubina direta (BD), conjugada e hidrossolúvel, que é excretada no trato intestinal, e em bilirrubina indireta (BI), livre e insolúvel em água, que circula na corrente sanguínea. A bilirrubina solúvel sofre excreção com a bile e quando penetra no intestino é degradada por bactérias em urobilinogênio, que pode ser convertido em estercobilina e excretado com as fezes. Tanto a quantidade total quanto a proporção relativa das frações conjugada e livre são de grande utilidade para o diagnóstico de icterícia e das hepatopatias (SACHER & McPHERSON, 2002).

Quando o fígado apresenta dificuldades em conjugar ou absorver a bilirrubina da circulação, ocorre um aumento da BI no soro e uma diminuição da quantidade de hemoglobina. Nos casos da conjugação ocorrer normalmente, mas havendo obstrução da excreção biliar, a bilirrubina conjugada retorna à circulação e os valores de bilirrubina e urobilinogênio também diminuem. Assim, um aumento na concentração de BI indica ou degradação excessiva de hemoglobina ou comprometimento da função

hepatocelular como na anemia (falciforme e perniciososa), hepatites e cirrose e na síndrome de Gilbert. Valores elevados de BD sugerem obstrução da excreção biliar como no caso de hepatite e cirrose. (CHERNECKY et al., 1995; SACHER & McPHERSON, 2002).

Valores aumentados da bilirubina total podem ser indicativos de alcoolismo, anemia perniciososa, cálculos biliares, comprometimento da função hepática, pancreatite, obstrução biliar e hepatites de origem diversa (tóxica, aguda, alcóolica, infecciosa, viral). Medicamentos usados rotineiramente como, o ácido acetilsalicílico, podem aumentar os valores de bilirubina total.

Valores diminuídos das bilirubinas não apresentam nenhum significado clínico (CHERNECKY et al., 1995).

A **fosfatase alcalina (ALP)** está amplamente distribuída ao longo das membranas das células metabolicamente ativas. Os tecidos ósseo, hepático, entérico, e células como os leucócitos e plaquetas, apresentam atividade elevada de ALP. O aumento da sua concentração sérica, no período de crescimento, pode ser considerado normal.

A ALP pode ser originária dos diversos tecidos onde estão presentes e o método mais comum para a distinção de suas isoenzimas é a eletroforese ou o fracionamento pelo calor. A isoenzima hepática da ALP é originária das células do trato biliar e a excreção da bile no intestino constitui a via normal de sua eliminação. A obstrução das vias biliares leva a uma retenção de ALP, com extravasamento para o fluido intersticial e a passagem para a circulação, sendo a enzima mais freqüentemente pesquisada quando há suspeita de obstrução do ducto biliar (SACHER & McPHERSON, 2002).

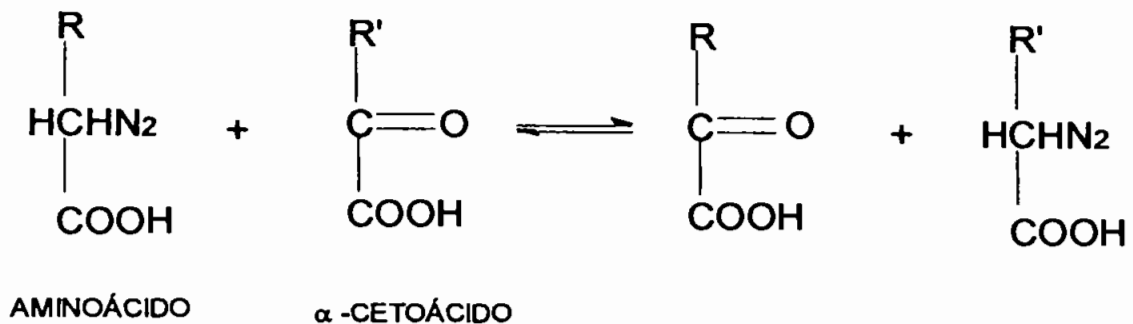
As principais condições que afetam a fosfatase alcalina são:

- a) Aumento pronunciado (5 ou mais do valor normal): na obstrução dos ductos biliares intra ou extra-hepáticos, cirrose biliar, sarcoma osteogênico.
- b) Aumento moderado (5 a 3 vezes do valor normal): nas hepatopatias granulomatosas ou infiltrativas, metástase óssea, mononucleose infecciosa.

c) Aumento discreto (até 3 vezes do valor normal): nas hepatites virais, cirrose, gravidez, padrão normal de crescimento em crianças.

d) Valores reduzidos: na nefrite, intoxicação por vitamina D, estados de desnutrição.

As **aminotransferases** constituem um grupo de enzimas que catalisam a interconversão de aminoácidos e um  $\alpha$ -cetoácido por transferência de grupamentos amina, utilizando a vitamina B6 (piridoxal fosfato) como cofator (Figura 3). O termo transaminase é mais usado de que aminotransferase (MOSS & HENDERSON, 1999).



**FIGURA 3** - Interconversão dos aminoácidos pelas transaminases

A **aspartato aminotransferase (AST)**, responsável pela reação entre os ácidos aspártico e  $\alpha$ -cetoglutâmico, apresenta isoenzimas diferentes que estão presentes no citoplasma e mitocôndria das células, principalmente nas do fígado, devido ao papel fundamental deste órgão na síntese protéica e no redirecionamento dos aminoácidos para outras vias bioquímicas. Em situação de dano nos tecidos, a forma predominante é a originada do citoplasma celular, embora algumas enzimas mitocondriais possam também estar presentes; danos mais severos nos tecidos resultam em maior alteração das enzimas mitocondriais. O fígado, o miocárdio e o músculo esquelético possuem grandes quantidades de AST, enquanto os eritrócitos apresentam quantidades moderadas (SACHER & McPHERSON, 2002).

A **alanina aminotransferase (ALT)** transfere o grupo amina entre a alanina e o ácido  $\alpha$ -cetoglutâmico, e está presente no citoplasma, principalmente nos hepatócitos, em alto conteúdo, embora rins, coração e



músculo esquelético apresentem quantidades moderadas. Baço, pâncreas, pulmões e eritrócitos apresentam quantidades menores. A ALT apresenta especificidade relativamente elevada no dano hepático; porém, os hepatócitos possuem de 3 a 4 vezes mais AST que ALT. O valor numérico da divisão da atividade da AST pela ALT na mesma amostra é denominada razão de Ritis e este cálculo é utilizado para distinguir várias condições clínicas onde as duas enzimas podem estar aumentadas em graus diferentes: a ALT é liberada mais rapidamente em processos agudos enquanto a AST é liberada em maior grau em processos crônicos (MOSS & HENDERSON, 1999; SACHER & McPHERSON, 2002).

A  $\gamma$ -Glutamil-transferase ( $\gamma$ -GT) catalisa a transferência de grupos glutamil entre peptídeos ou aminoácidos através de ligação em um grupo  $\gamma$ -carboxila. Esta função é importante na transferência ou movimento dos aminoácidos através das membranas. Grandes quantidades desta enzima estão presentes no epitélio tubular e no fígado, onde se encontram também elevadas quantidades de ALP (SACHER & McPHERSON, 2002).

O dano hepatocelular pode liberar  $\gamma$ -GT em quantidades moderadas. A intoxicação por acetaminofeno aumenta esta enzima e os indutores de enzimas hepáticas como o etanol, barbitúricos e fenitoína possuem um efeito secundário de aumentar a  $\gamma$ -GT sérica. A  $\gamma$ -GT é particularmente sensível à ingestão de álcool, exibindo aumento consistente com a ingestão elevada, e moderado com ingestão baixa. Assim, é enzima utilizada na avaliação de pacientes em tratamento de alcoolismo (CHERNECKY et al., 1995; SACHER & McPHERSON, 2002).

A maioria das doenças hepatocelulares e hepatobiliares induz o aumento dos valores séricos de  $\gamma$ -GT. A alteração desta enzima apresenta maior correlação com a obstrução e a colestase do que somente com o dano hepatocelular. No diagnóstico geral das hepatopatias, a  $\gamma$ -GT não é especialmente útil, pois fornece poucas informações além daquelas obtidas pela quantificação das aminotransferases, ALP e frações de bilirubina (SACHER & McPHERSON, 2002).

Os parâmetros bioquímicos para a avaliação da função hepática como bilirrubina, fosfatase alcalina e transaminases, refletem a colestase, mas são pobres indicadores da disfunção hepática. Já a  $\gamma$ -glutamyl-transferase avalia tanto a colestase como o dano hepático induzido pelos xenobióticos (FRANCO et al., 1986). Estes testes são utilizados como triagem na detecção da disfunção do fígado em trabalhadores e animais de experimentação expostos a solventes orgânicos. Porém, a alteração destas enzimas pode ocorrer em doenças não hepáticas (BAI et al., 1992).

Em termos químicos, os **ácidos biliares** são um grupo de ácidos esteroidais produzidos durante o metabolismo do colesterol no fígado, com um grupamento carboxila localizado na cadeia lateral (BATTA & SALEN, 1999; CHAUDHURY & CHAPLIN, 1999; FINI et al., 2002; RODA et al., 1998; TOLMAN & REJ, 1999). Estão presentes em vários fluidos biológicos, em diferentes tipos e quantidades, na sua forma ionizada. A composição qualitativa dos ácidos biliares na bile, soro e urina varia de acordo com suas propriedades físico-químicas e com as diferentes taxas de absorção intestinal e depuração (FINI et al., 2002; RODA et al., 1998).

Os ácidos biliares são uma classe de aníons endógenos orgânicos, cuja regulação é uma das principais funções do fígado; as alterações no seu metabolismo e excreção refletem uma disfunção hepática. O metabolismo hepático e intestinal dos ácidos biliares pode ser influenciado por doenças hepáticas e gastrintestinais (RODA et al., 1998). Alterações na síntese hepática, metabolismo intracelular, excreção, absorção intestinal ou extração dos ácidos biliares do plasma refletem-se em distúrbios no metabolismo dos ácidos biliares.

Através da síntese, conjugação e secreção dos ácidos biliares, o fígado mantém o equilíbrio do colesterol e fornece moléculas detergentes para facilitar a excreção hepática de colesterol e a absorção intestinal de lipídeos. Esta transformação e a capacidade dos ácidos biliares solubilizarem mais colesterol na bile são os principais mecanismos de eliminação do colesterol do organismo (TOLMAN & REJ, 1999).

O colesterol é sintetizado de modo contínuo por todos os tecidos, mas principalmente pelo fígado e intestino delgado e deve ser eliminado do organismo para impedir o acúmulo e o risco de arterosclerose. Uma porção do colesterol é transformada no fígado em ácidos biliares, altamente polares, que são secretados na bile.

Estudos com solventes não halogenados têm mostrado pequena evidência de hepatotoxicidade, apesar dos resultados negativos talvez serem devidos à incapacidade dos testes convencionais em detectar o dano hepático em um estágio inicial (FRANCO et al., 1989).

Os ácidos biliares apresentam também aplicações terapêuticas. O ácido quenodesoxicólico e mais recentemente, o ácido ursodesoxicólico tem sido usado como tratamento alternativo em pacientes com cálculos biliares (BATTA & SALEN, 1999).

BAI et al. (1992) sugerem que o aumento dos ácidos biliares, após exposição ao tetracloreto de carbono, constitui indicador sensível da disfunção hepática.

Estudos *in vitro* feitos por KUKONGVIRIYAPAN et al. (1990) sugerem que a inibição do transporte dos ácidos biliares é o possível mecanismo para o aumento dos valores séricos *in vivo*.

Os ácidos biliares são os maiores produtos do catabolismo do colesterol, formados no fígado, conjugados com os aminoácidos glicina e taurina e secretados para a bile. A maioria dos ácidos biliares apresenta uma estrutura básica em anéis esteroidais, geralmente saturados, contendo 24 carbonos. A cadeia lateral terminal é representada por um grupamento carboxila (BATTA & SALEN, 1999; CHAUDHURY & CHAPLIN, 1999).

A formação se dá através da hidroxilação do colesterol no carbono 7, conformação  $\alpha$ , que é a etapa limitante para a formação dos ácidos biliares. Os passos posteriores são: a formação de um composto 3-oxo pela oxidação da hidroxila do carbono 3, a isomerização da estrutura 5-eno, a hidroxilação no carbono 12 (esta hidroxilação só acontece na formação do ácido cólico), a saturação entre o carbono 4 e 5, a redução do grupamento 3-ona e a hidroxilação da cadeia lateral no carbono 26. O produto destas

---

transformações é chamado de ácido colestanoico. A hidroxilação do carbono 24 e a  $\beta$ -oxidação (para reduzir o tamanho da cadeia lateral) formam os ácidos biliares primários: cólico (Figura 4) e quenodesoxicólico (BATTA & SALEN, 1999; TOLMAN & REJ, 1999).

Antes da secreção para os canalículos biliares, os ácidos biliares primários são conjugados em suas carboxilas com a taurina e a glicina, o que aumenta a sua polaridade e solubilidade em água. Esta conjugação formam quatro ácidos biliares primários: colitaurina, colilglicina, quenodesoxitaurina e quenodesoxiglicina (BATTA & SALEN, 1999; FINI et al., 2002; TOLMAN & REJ, 1999).

A conjugação com a glicina e a taurina diminui o pKa dos ácidos biliares de 6 para 4 e 2 respectivamente. Os ácidos biliares conjugados estão presentes na luz intestinal, na forma ionizada, pois seus valores de pKa estão abaixo do pH intestinal. A proporção dos ácidos biliares conjugados com a glicina, em condições normais, predomina sobre os conjugados com a taurina em aproximadamente 3:1 a 4:1 (TOLMAN & REJ, 1999).

Os ácidos biliares primários, ácido cólico e quenodesoxicólico, são efetivamente reabsorvidos do íleo durante a circulação enteroepática. Aproximadamente 5% da quantidade dos ácidos biliares primários, durante a passagem pelo intestino delgado e cólon, sofrem alterações produzidas por enzimas da flora bacteriana endógena, dando origem aos ácidos biliares secundários, desoxicólico e litocólico. Os ácidos biliares secundários também percorrem a circulação enteroepática, sendo o ácido desoxicólico encontrado em maior proporção no plasma e na bile humana (BATTA & SALEN, 1999; FINI et al., 2002; TOLMAN & REJ, 1999).

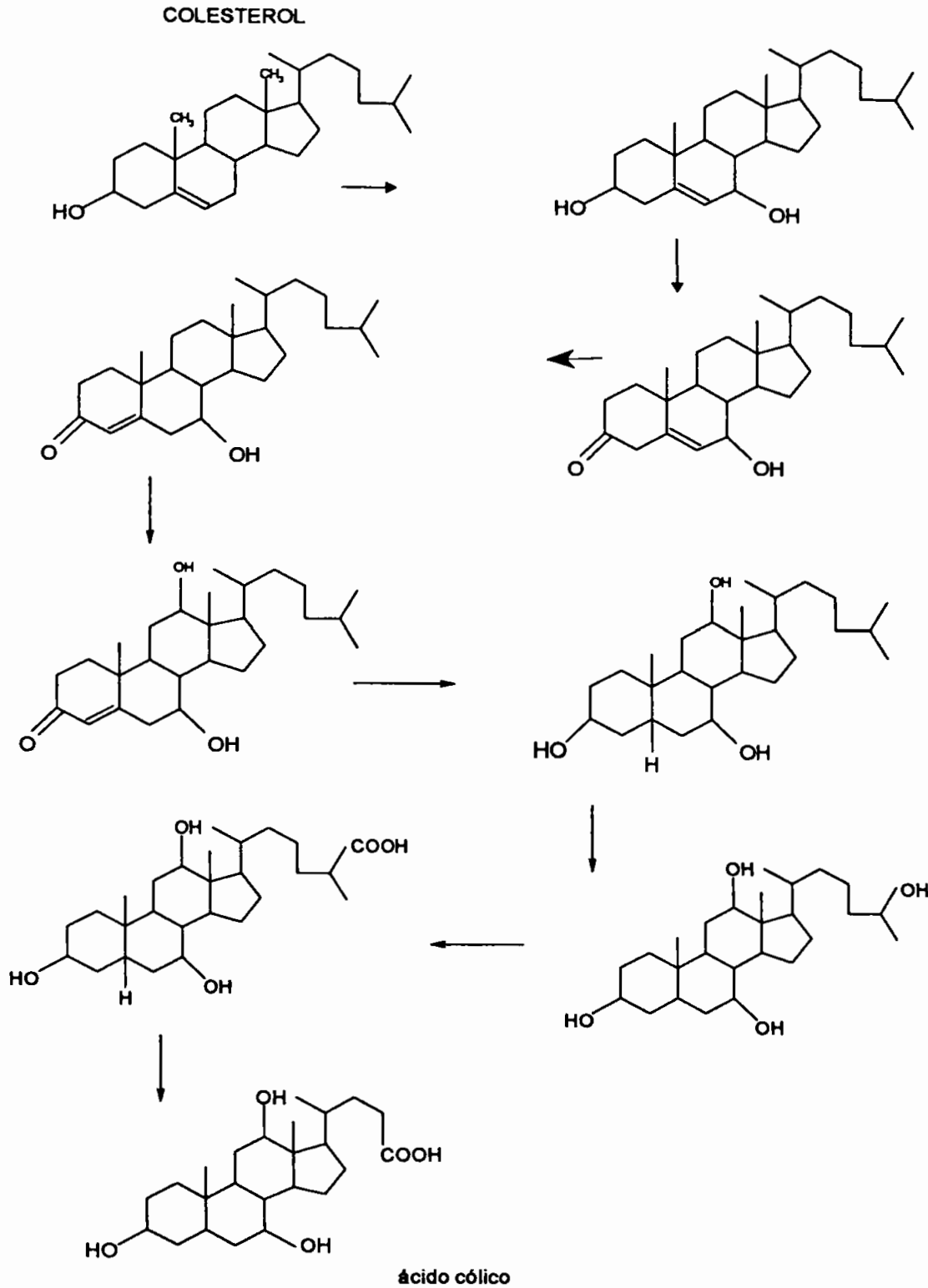


FIGURA 4 – Representação esquemática da formação do ácido cólico

A bile é uma secreção vital, essencial para a digestão intestinal e absorção dos lipídeos. Além do mais, é uma importante via de eliminação de poluentes ambientais, substâncias carcinogênicas, medicamentos e seus metabólitos. Os ácidos biliares não são somente a principal via metabólica do colesterol, como facilitam a excreção dos lipídeos, inclusive o colesterol, e a absorção dos lipídeos provenientes da alimentação, incluindo vitaminas lipossolúveis, através da sua ação detergente. Os principais solutos orgânicos da bile são os sais biliares, fosfolipídeos e o colesterol que formam micelas. Devido à bipolaridade dos ácidos biliares, eles são capazes de solubilizar os lipídeos na bile (BATTA & SALEN, 1999; GROSELL et al., 2000; TOLMAN & REJ, 1999; TRAUNER & BOYER, 2003).

As propriedades detergentes dos ácidos biliares são devidas à sua estrutura química, com regiões apolares localizadas na porção esteroidal, e polares nas carboxilas e grupos hidroxilas  $\alpha$ -orientados. As moléculas se alinham na interface água-lipídeo e reduzem a tensão superficial, agindo, portanto, como agentes tensoativos. Os grupos polares são hidratados com moléculas de água enquanto a parte apolar esteroidal emulsifica os lipídeos. A capacidade tensoativa dos ácidos biliares é aumentada após a posterior conjugação com a taurina ou glicina, antes de ser excretada com a bile (BATTA & SALEN, 1999; TOLMAN & REJ, 1999).

Em solução aquosa, os ácidos biliares se juntam formando pequenos agregados polimoleculares de 5 nm de diâmetro, as micelas, que são capazes de incorporar o colesterol e os folipídeos. A nova micela formada com os constituintes insolúveis em água mantém o colesterol em solução, aumentando sua hidrossolubilidade e permitindo a excreção através da bile (TOLMAN & REJ, 1999).

Os ácidos biliares são mantidos no organismo através de um sistema conhecido como circulação enteroepática. Esta é formada pelo fígado, vias biliares, intestino e sistema venoso portal (TOLMAN & REJ, 1999).

Durante o jejum, os ácidos biliares penetram na vesícula biliar: 95% do *pool* de ácidos biliares está seqüestrado neste local após jejum noturno.

Após uma refeição, a liberação de colecistocinina pela mucosa intestinal causa relaxamento no esfíncter de Oddi e contração da vesícula biliar, permitindo a liberação de micelas mistas para o intestino. Na luz intestinal, os fosfolípidos e o colesterol endógeno deixam as micelas e são trocados pelo colesterol alimentar e produtos da digestão dos triglicerídeos.

O mecanismo pelo qual os ácidos biliares facilitam a absorção de lipídeos se baseia na aceleração da ação hidrolítica da lipase pancreática sobre os triglicerídeos e solubilização dos produtos da hidrólise. Em seguida, são reabsorvidos no intestino por mecanismos de transporte ativo e passivo. No sangue são transportados ligados às proteínas. Devido à alta concentração dos ácidos biliares no sistema porta após uma refeição, os valores plasmáticos sistêmicos aumentam devido ao extravasamento dos ácidos biliares contidos na vesícula biliar. O aumento da concentração dos ácidos biliares no soro é resultante da captação hepática diminuída ou do metabolismo alterado. Portanto, a determinação dos ácidos biliares no soro é um indicador sensível de disfunção hepática (TOLMAN & REJ, 1999).

### **2.3 Microextração em fase sólida**

A microextração em fase sólida (SPME) foi uma técnica de extração introduzida por C. ARTHUR e J. PAWLISZYN em 1990. Na construção do dispositivo a fibra de sílica fundida foi introduzida dentro de uma seringa HAMILTON 7000. Um êmbolo de metal, removível, arremessa a fibra para dentro do injetor do cromatógrafo.

A SPME é um método rápido, simples e sensível de extração para a análise em amostras aquosas (ARTHUR et al., 1992).

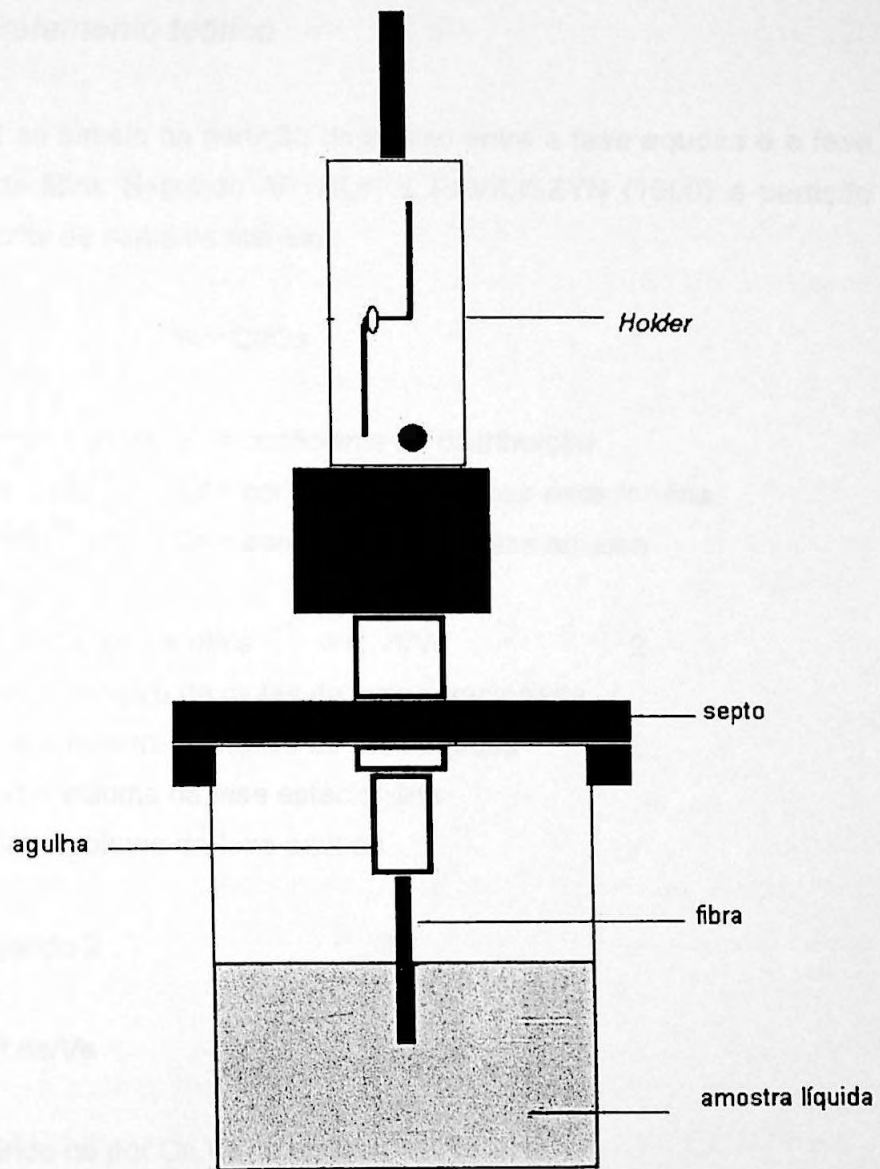
A extração é baseada na partição do analito entre o material da fibra e o meio aquoso, que pode ser a água, ar, plasma, urina ou sangue. A distribuição do analito entre as duas fases depende da interação físico-química entre o soluto e a fase polimérica (ABDEL-REHIM et al., 2000; ARTHUR & PAWLISZYN, 1990; JUNTING et al., 1998; PAWLISZYN, 2000; THEODORIDIS et al., 2000).

A fibra de sílica fundida, coberta pela fase estacionária, é imersa em uma solução aquosa. Ocorre a partição do analito orgânico da solução aquosa para a fase estacionária até o equilíbrio ser alcançado. O analito é absorvido ou adsorvido pela fase da fibra, sendo posteriormente dessorvido termicamente no injetor do cromatógrafo à gás. Uma grande variedade de fases sólidas podem ser utilizadas maximizando o potencial de aplicação do dispositivo (ARTHUR & PAWLISZYN, 1990; ARTHUR et al., 1992).

A SPME permite fácil acesso do analito para a superfície, o que facilita a eficiência da extração e dessorção do analito no cromatógrafo e a pequena dimensão da fibra permite a sua introdução dentro do injetor do CG. Na extração por SPME não é necessária a retirada completa do analito da matriz, podendo ser aplicado para uma vasta gama de compostos (ARTHUR & PAWLISZYN, 1990).

Comercialmente a Supelco® disponibiliza o sistema SPME. Neste, a fibra recoberta pela fase estacionária é acoplada a uma fibra metálica ligada a uma mola. O conjunto fica protegido no interior de uma agulha metálica (que irá permitir a perfuração do septo no injetor). Um suporte auxiliar (*holder*) permite a exposição da fibra na amostra, sua retração e dessorção no injetor do CG (Figura 5).





**FIGURA 5** - Dispositivo para microextração em fase sólida

### 2.3.1 Tratamento teórico

A SPME se baseia na partição do analito entre a fase aquosa e a fase estacionária da fibra. Segundo ARTHUR & PAWLISZYN (1990) a partição pode ser descrita da seguinte maneira:

$$K = C_f/C_s \quad 1$$

onde K = coeficiente de distribuição

C<sub>f</sub> = concentração da fase estacionária

C<sub>s</sub> = concentração da fase aquosa

$$K' = C_f.V_f/C_s.V_s = n_f/n_s = K.V_f/V_s \quad 2$$

Onde n<sub>f</sub> = número de moles da fase estacionária

n<sub>s</sub> = número de moles da fase aquosa

V<sub>f</sub> = volume da fase estacionária

V<sub>s</sub> = volume da fase aquosa

Rearranjando 2 :

$$n_f = K.V_f.n_s/V_s \quad 3$$

substituindo n<sub>s</sub> por C<sub>s</sub>.V<sub>s</sub> e onde A = K.V<sub>f</sub>

$$n_f = A. C_s \quad 4$$

Esta relação é linear entre a quantidade sorvida na fase estacionária e a concentração na amostra. A resposta da fibra não é linear com concentrações altas de analito, quando há saturação. Após alcançado o equilíbrio, a exposição da fibra por um tempo adicional não aumenta a

quantidade de composto acumulado na fibra (ARTHUR & PAWLISZYN, 1990; PAWLISZYN, 2000).

Freqüentemente, a fase de equilíbrio é muito complexa, com a amostra consistindo numa fase aquosa com partículas sólidas tendo várias interações de adsorção do analito. Fatores específicos são considerados, como perda do analito por biodegradação ou adsorção na parede do frasco ou mecanismo de agitação. (PAWLISZYN, 2000).

As condições de equilíbrio podem ser descritas a seguir:

$$n = (K_f V_f V_s C_0) / (K_f V_f + V_s)$$

onde n = massa do analito extraída

$K_f$  = coeficiente de distribuição fase de extração-analito

$V_f$  = volume da fibra

$V_s$  = volume da amostra

$C_0$  = concentração inicial

O conhecimento do coeficiente de distribuição entre as fases pode definir parâmetros de análise como por exemplo, o volume da amostra e da fibra, e estimativas dos limites de detecção e de quantificação (SARAULLO et al., 1997).

A sensibilidade da fibra pode ser ajustada mudando o volume e a espessura ou área da fase estacionária (ARTHUR & PAWLISZYN, 1990).

O transporte do analito é iniciado após a fibra ser colocada em contato com a amostra. Uma comparação entre o equilíbrio de absorção e adsorção é usado para explicar a diferença entre os dois tipos de meios. Em ambos os casos, o início do processo de extração se faz pela absorção do analito na interface matriz-fase de extração, e quando a difusão dos analitos aumenta a quantidade dentro da fase de extração também se eleva. Se o coeficiente de difusão do analito na fase de extração é alto a adsorção acontece até a partição do analito entre as duas fases se completarem. Porém, se o coeficiente de partição é baixo, o analito permanece na interface resultando

na sua adsorção. A vantagem da extração por absorção é uma isotérmica linear, enquanto na extração por adsorção, a isotérmica não é linear para concentrações mais elevadas. A alta seletividade e capacidade dos sorventes sólidos por analitos polares e voláteis constituem uma das vantagens da técnica (PAWLISZYN, 2000).

### *2.3.2 Tipo de sorvente*

As propriedades físicas e químicas da camada do sorvente são de fundamental importância para o processo da partição (THEODORIDIS et al., 2000). A afinidade da fibra pelo analito é o mais importante fator na SPME. Partindo do princípio que “semelhante dissolve semelhante” as fibras de diferentes propriedades ou espessuras do filme são selecionadas de acordo com os compostos que serão analisados (JUNTING et al., 1998; MILLS & WALKER, 2000; THEODORIDIS et al., 2000).

Existem dois grupos distintos de fibras disponíveis no mercado. As de polidimetilsiloxana (PDMS) e as de poliacrilato (PA) que se dispõem como camadas homogêneas do polímero, na forma líquida, extraíndo os analitos por absorção. Outro grupo de fibras inclui as PDMS/divinilbenzeno (DVB), carbowax (CW)/DVB, carboxeno/PDMS e DVB/carboxeno/PDMS, compostos heterogêneos com camadas sólidas e líquidas, extraíndo por absorção e absorção (LEE et al., 1999; MILLS & WALKER, 2000).

As fibras também se diferem quanto à sua polaridade. Analitos apolares apresentam relativamente alta afinidade por fibras apolares como as PDMS, enquanto os compostos mais polares apresentam afinidade pelas fibras polares de PA e CW/DVB. As fibras heterogêneas, como as carboxeno/PDMS, são utilizadas principalmente para a análise de compostos voláteis e seu rendimento de extração é alto comparado às de PDMS (HOOK et al., 2002; JUNTING et al., 1998; THEODORIDIS et al., 2000).

As fibras encontradas comercialmente apresentam diferentes espessura do filme. As PDMS são encontradas com filmes de 7, 30 e 100

µm de espessura, as de PA com 65 µm, e as heterogêneas com variadas espessuras de cada filme (THEODORIDIS et al., 2000).

A Tabela 1 mostra as diferentes fibras disponíveis no mercado, suas polaridades e espessura do filme.

### 2.3.3 *Modo de extração*

Dois são os modos de extração pela SPME: imersão direta da fibra na amostra ou no *headspace* (HS) (HOOK et al., 2002)

O principal critério de escolha no modo de seleção é a natureza da matriz, a volatilidade do analito e a afinidade deste pela matriz (THEODORIDIS et al., 2000).

Na imersão direta, a fibra é introduzida na fase aquosa, havendo absorção ou adsorção dos analitos diretamente para a fibra, utilizado para compostos semi-voláteis. A amostra é agitada magneticamente ou por ultrassom para que o tempo de equilíbrio entre as fases seja diminuído, sendo o tempo de equilíbrio também determinado em função do analito e das condições de análise. Em análises onde a matriz é considerada muito suja, a fibra pode ser protegida por uma membrana, que alguns autores consideram a adição da membrana um outro modo de extração (HOOK et al., 2002; MILLS & WALKER, 2000; THEODORIDIS et al., 2000).

O HS-SPME é utilizado preferencialmente quando os compostos são voláteis: os compostos são volatilizados dentro do frasco e a fibra é inserida no *headspace*, acima da matriz. No HS-SPME os extratos são limpos o que confere alta seletividade e longo tempo de uso da fibra (HOOK et al., 2002; LEE et al., 1999; MILLS & WALKER, 2000).

**TABELA 1 - Tipos de fibras utilizadas em SPME (Supelco®)**

fase estacionária/espessura do filme	descrição	polaridade	uso recomendado
<b>Polidimetilsiloxano (PDMS)</b>			
100 µm	não-ligada	apolar	voláteis
30 µm	não-ligada	apolar	semivoláteis apolares
7 µm	ligada	apolar	semivoláteis apolares e levemente polares
<b>Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB)</b>			
65 µm	parcialmente <i>crosslinked</i>	bi-polar	voláteis polares
60 µm	parcialmente <i>crosslinked</i>	bi-polar	vários tipos de substâncias
StableFlex 65 µm	altamente <i>crosslinked</i>	bi-polar	voláteis polares
<b>Poliacrilato</b>			
85 µm	parcialmente <i>crosslinked</i>	polar	semivoláteis polares (fenóis)
<b>Carboxen™/Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS)</b>			
75 µm	parcialmente <i>crosslinked</i>	bi-polar	gases e voláteis
StableFlex 85 µm	altamente <i>crosslinked</i>	bi-polar	gases e voláteis
<b>Carbowax®/Divinilbenzeno (CW/DVB)</b>			
65 µm	parcialmente <i>crosslinked</i>	polar	analitos polares (álcoois)
StableFlex 70 µm	altamente <i>crosslinked</i>	polar	analitos polares (álcoois)
<b>Carbowax/Templated Resin (CW/TPR)</b>			
50 µm	parcialmente <i>crosslinked</i>	polar	surfactantes
<b>StableFlex Divinilbenzeno/Carboxen/PDMS (DVB/CAR/PDMS)</b>			
50/30 µm	altamente <i>crosslinked</i>	bi-polar	odorizantes e saborizantes
50/30 µm	altamente <i>crosslinked</i>	bi-polar	odorizantes e saborizantes

### 2.3.4 Condições de extração

O tempo de extração é função do coeficiente de partição do analito entre a matriz e a fase estacionária da fibra (ARTHUR & PAWLISZYN, 1990; ARTHUR et al., 1992; JUNTING et al., 1998; MILLS & WALKER, 2001).

Nas análises por SPME a eficiência de extração pode ser melhorada modificando a matriz, o analito e ou o próprio dispositivo de SPME. Embora a SPME tenha máxima sensibilidade no ponto de equilíbrio, alguns fatores como: o tempo de extração, pH da solução, agitação, adição de sal, temperatura, força eluotrópica (metanol) devem ser considerados para melhor rendimento da análise (HUANG et al., 1997; MILLS & WALKER, 2000; THEODORIDIS et al., 2000).

O transporte do analito na fase aquosa é um passo limitante no processo de extração (LOUCH et al., 1992). Neste caso, o tempo de difusão deve ser proporcional ao quadrado da distância de migração e inversamente proporcional ao coeficiente de difusão, ou seja:

$$t = x^2/2D^2$$

onde  $x$  = distância de migração

$D$  = coeficiente de difusão

Assim, para uma extração mais rápida e eficiente, a agitação da solução é necessária. Se uma agitação perfeita é alcançada, a massa transportada é limitada somente pela difusão do analito no sorvente (LOUCH et al., 1992).

O ajuste do pH pode aumentar o rendimento da extração para compostos que podem ser protonados, tomando o composto não ionizado e aumentando o rendimento da extração por SPME. Este ajuste tem demonstrado aumentar o coeficiente de partição fibra/água, elevando a sensibilidade do método. Porém, valores extremos de pH, abaixo de 2 e acima de 10, danificam a fibra (ABDEL-REHIM et al., 2000; GONZÁLES-TOLEDO et al., 2001; JUNTING et al., 1998; KROGH et al., 1995; THEODORIDIS et al., 2000; VAN DOORN et al., 1998).

HUANG et al. (1997) avaliaram a influência do pH na eficiência da extração de benzeno. Num intervalo de pH de 5 a 9 nenhuma diferença na eficiência foi notada na extração de todas as substâncias analisadas nas duas fibras testadas (PDMS e PA); porém, um pH abaixo de 3 diminuiu a

eficiência na extração das substâncias básicas (anilina e *m*-nitroanilina), que foram ionizadas.

Com a finalidade de aumentar a concentração do analito na fase gasosa do HS-SPME, a amostra é usualmente aquecida, e geralmente, os intervalos de temperatura variam entre 45 e 100°C. Para melhoria da sensibilidade pode-se aquecer a amostra e esfriar a camada da fibra simultaneamente, artefato complexo para ser usado rotineiramente (ZHANG et al., 1994).

O aumento na temperatura aumenta o rendimento de extração devido à rápida transferência de massa para a camada da fibra (THEODORIDIS et al., 2000). Entretanto, por ser a absorção um processo exotérmico, a constante de distribuição geralmente diminui com o aumento da temperatura (ARTHUR et al., 1992).

No HS-SPME, altas temperatura podem resultar num aumento da pressão de vapor de compostos voláteis no HS devido ao efeito da temperatura na constante de Henry. Porém, altas temperaturas também podem exercer um efeito menos favorável no coeficiente de partição (CHO et al., 2003, SARAULLO et al., 1997).

Em condições sob a qual o equilíbrio é lento, o aumento na temperatura pode transferir mais rapidamente o analito da fase líquida para o vapor (HS), diminuindo o tempo de extração (CHO et al., 2003).

A adição de sal na amostra pode resultar na mudança da pressão parcial e de vapor, solubilidade, condutividade térmica, densidade, tensão superficial, entre outras, do analito. Estas mudanças podem resultar da variação do equilíbrio líquido/vapor do sistema (CHO et al., 2003).

A adição de sais solúveis na amostra pode aumentar ou diminuir as quantidades extraídas, dependendo da polaridade do composto e da concentração de sal (ABDEL-REHIM et al., 2000).

Os sais mais usados são:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , NaCl,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$  e o  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (JUNTING et al., 1998; MILLS & WALKER, 2000).

Segundo ARTHUR et al. (1992) a justificativa para a adição de sal é que o aumento na constante de distribuição proporciona maior migração do



analito para a fibra e pode auxiliar na diminuição do limite de detecção do método.

O metanol quando presente na solução aquosa diminui a polaridade da amostra diminuindo assim a constante de distribuição (HUANG et al., 1997).

Este efeito foi demonstrado por ARTHUR et al. 1992, em uma série de amostras preparadas com concentrações de 0 a 100% de metanol. O efeito pode ser descrito matematicamente, usando os valores da constante de distribuição ajustados para a polaridade do solvente:

$$(K_2/K_1) = 10^{(P_2/P_1)/2}$$

onde K<sub>2</sub> = constante da solução modificada

K<sub>1</sub> = constante de distribuição da água

P<sub>1</sub> = polaridade da água

P<sub>2</sub> = polaridade da solução modificada

Assim, a água com 3% de metanol diminui a constante de distribuição em 20%, resultando 20% de diminuição no rendimento para a extração do benzeno e 15% para o do tolueno (ARTHUR et al., 1992).

### 2.3.5 Dessorção

Quando a SPME é acoplada ao CG a dessorção do analito da fibra é feita diretamente. A agulha do dispositivo da SPME é introduzida dentro do injetor, a fibra é exposta e os analitos são termicamente dessorvidos (THEODORIDIS et al., 2000). Como não se utilizam solventes, o injetor deve ser colocado no modo sem divisão da amostra (*splitless*), visando assegurar a completa transferência do analito e aumentando a sensibilidade (MILLS & WALKER, 2000). O tempo de dessorção e a temperatura do injetor podem afetar a eficiência do processo.

Na utilização da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a fibra é colocada em uma pequena câmara de dessorção, com três portas em

configuração T, montada dentro do injetor da CLAE na posição LOOP, típica válvula de injeção de seis portas. Pela troca de válvula, a câmara (e então a fibra) é lavada pela fase móvel que desorve os analitos e a desorção depende do tempo e composição do líquido usado. Portanto, a dinâmica da desorção é governada pelo eluente (fase móvel) e seu fluxo (CHEN & PAWLISZYN, 1995).

### *2.3.6 Vantagens*

As vantagens oferecidas pela SPME comparada com outros métodos de preparação da amostra são inúmeras. Uma das principais vantagens é a não utilização de solventes no processo de extração, o dispositivo apresenta fácil manuseio e poucos equipamentos são necessários para a extração. A SPME tem sido recomendada pela sua rapidez, linearidade, sensibilidade, reprodutibilidade e custo efetivo. Após o uso, a fibra pode ser reutilizada por inúmeras vezes (ABDEL-REHIM et al., 2000; MARTOS & PAWLISZYN, 1997; ULRICH & MARTENS, 1997).

A SPME pode ser uma alternativa viável para a amostragem de compostos presentes no ar, com significativa vantagem sobre os métodos tradicionais (MARTOS & PAWLISZYN, 1997; ULRICH & MARTENS, 1997).

# OBJETIVOS

### 3. OBJETIVOS

O **objetivo geral** desta pesquisa é o de estudar a aplicabilidade de um novo biomarcador de hepatotoxicidade, os ácidos biliares no sangue, na exposição de trabalhadores a solventes orgânicos em oficinas de repintura de veículos.

Os **objetivos específicos** são:

- estudar, otimizar e validar o método de microextração em fase sólida para a determinação de orto-cresol em urina de trabalhadores expostos a solventes;
  - avaliar a exposição de trabalhadores aos solventes, representado pelo tolueno, pela análise de seus metabólitos excretados na urina, o orto-cresol e o ácido hipúrico;
  - determinar os ácidos biliares totais em sangue dos trabalhadores expostos a solventes e no de um grupo controle, de indivíduos não expostos;
  - determinar alguns parâmetros bioquímicos relacionados à função hepática: fosfatase alcalina, bilirrubina,  $\gamma$ -glutamyl-transferase, alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase;
  - verificar a ocorrência ou não de correlação entre os valores dos parâmetros bioquímicos clássicos de hepatotoxicidade com os dos ácidos biliares e avaliar suas sensibilidades quanto à detecção de alterações hepáticas;
  - estudar a correlação entre os valores de orto-cresol e de ácido hipúrico em urina com os de ácidos biliares;
-

- avaliar a interferência de fatores individuais como o uso de bebidas alcoólicas e de tabaco nos valores dos bioindicadores estudados.
-

# MATERIAL E MÉTODO

---

## 4. MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 População estudada e ambiente de trabalho

57 trabalhadores de oficinas de repintura automotiva (n=21) constituíram o **grupo exposto** e 51 voluntários, não expostos ocupacionalmente a qualquer solvente, formaram o **grupo controle**. Em todos os grupos os voluntários tinham idades entre 20 e 59 anos e eram do sexo masculino.

Todos os voluntários da pesquisa foram submetidos a um questionário (Anexos 1 e 2) sobre itens como: identificação, condições de trabalho, hábitos pessoais, presença de patologias, uso de medicamentos, etc. Assinaram um termo de consentimento pós informação de participação do trabalho (Anexo 3). Foram excluídos os voluntários portadores de hepatopatias. O protocolo foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas/Centro Universitário Federal (Anexos 4 e 5).

**Características grupo exposto** - Os trabalhadores da funilaria e pintura com idade média ( $\pm$  DP) de  $33,8 \pm 9,9$  anos e tempo de trabalho médio ( $\pm$  DP) de  $187,7 \pm 125$  meses, se expõem em diferentes tarefas aos solventes. Peças a serem reparadas necessitam da total remoção da pintura anterior, a qual é feita com tiner, sendo posteriormente, lixadas. O tiner também é utilizado para a retirada de tinta eventualmente aderida às mãos e aos braços. As tintas utilizadas na proteção e auxílio para o acabamento apresentam solventes na sua composição. Após a pintura completa, o carro é lavado e polido, operação que pode também ocasionar a exposição a solventes contidos na cera.

A aplicação da tinta definitiva é a atividade onde se tem maior exposição do trabalhador aos solventes. A preparação da tinta é feita pelo pintor na própria oficina, e em 11 delas era aplicada na cabina de pintura, com áreas entre  $105\text{m}^3$  e  $320\text{m}^3$ . Nas demais oficinas, a pintura era realizada numa

área comum destinada a todas as atividades (funilaria e pintura). Os revólveres utilizados para aplicação da tinta eram lavados com tiner após o uso.

A jornada de trabalho oscilou de 40 a 48 horas semanais, e na maioria dos casos os proprietários das oficinas também nelas trabalhavam, sem horário fixo. O tempo de aplicação da tinta foi variável, dependendo do tamanho da peça a ser pintada e do volume de veículos a serem reparados. O número de trabalhadores envolvidos na pintura era diferente nos diferentes locais.

A coleta das amostras biológicas foi realizada após o final do último dia da semana de trabalho. A urina, proveniente de única micção, foi coletada em frasco de polietileno e transportada em caixa de isopor com gelo até o laboratório. A gravidade específica e a creatinina foram medidas antes das amostras serem separadas em duas porções e congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

***Característica do grupo controle*** - Os indivíduos do grupo controle, voluntários não expostos a solventes, com idade média ( $\pm$  DP) de  $34,4 \pm 12,6$  anos foram escolhidos aleatoriamente, excluindo os portadores de hepatopatias. As amostras também foram provenientes de única micção, sem definição especificada do dia da semana para a coleta.

As amostras de sangue destinadas às análises dos ácidos biliares e dos demais parâmetros bioquímicos (10 mL) foram colhidas, de ambos os grupos, no Laboratório de Análises Clínicas da Efoa/Ceufe/Alfenas e no Laboratório de Análises Clínicas Santa Cecília/Cambuí no mesmo dia da coleta de urina, pela manhã, estando o voluntário em jejum.

As Tabelas 2 e 3 mostram algumas das características consideradas relevantes, dos dois grupos: exposto e controle, segundo dados obtidos no questionário.



**TABELA 2 - Características da população exposta a solventes nas oficinas de funilaria e pintura**

(continua)

trabalhador	idade (anos)	uso de EPI	ingestão de bebida alcoólica	hábito de fumar	tempo de trabalho (meses)
1	45	sim	sim	não	396
2	35	sim	sim	sim	216
3	21	sim	não	não	24
4	21	sim	sim	sim	120
5	36	não	não	sim	264
6	27	sim	sim	não	120
7	50	sim	sim	sim	456
8	21	não	sim	não	120
9	41	não	não	não	300
10	36	sim	não	não	300
11	37	não	sim	sim	300
12	47	sim	não	não	300
13	30	sim	sim	sim	180
14	55	não	não	não	384
15	28	sim	sim	sim	120
16	33	não	não	não	216
17	28	não	sim	não	156
18	56	sim	sim	sim	348
19	51	não	não	não	408
20	29	não	sim	sim	204
21	33	não	sim	sim	180
22	35	sim	sim	sim	120
23	32	não	sim	sim	204
24	42	não	não	não	300
25	41	sim	sim	não	300
26	21	sim	não	sim	18
27	45	sim	sim	não	120
28	25	não	não	sim	108
29	39	não	não	sim	192

**TABELA 2 - Características da população exposta a solventes nas oficinas de funilaria e pintura.**

(concluído)

trabalhador	idade (anos)	uso de EPI	ingestão de bebida alcóolica	hábito de fumar	tempo de trabalho (meses)
30	21	sim	não	não	12
31	30	não	não	sim	240
32	33	sim	não	não	180
33	37	sim	sim	sim	60
34	42	não	não	não	32
35	53	sim	não	não	492
36	39	sim	sim	não	240
37	37	não	sim	sim	300
38	23	sim	não	não	96
39	49	sim	não	não	216
40	24	sim	não	não	72
41	41	sim	sim	sim	300
42	22	sim	não	não	42
43	28	sim	não	não	120
44	22	não	não	não	120
45	21	sim	não	não	2
46	35	sim	não	não	180
47	32	não	sim	sim	180
48	21	sim	sim	sim	6
49	30	sim	sim	não	48
50	43	sim	sim	não	180
51	27	sim	não	não	16
52	40	sim	não	não	300
53	39	não	sim	não	300
54	23	sim	sim	não	30
55	46	sim	sim	não	336
56	29	sim	sim	não	120
57	22	não	não	não	6

**TABELA 3 - Características da população controle**

(continua)

<b>indivíduo</b>	<b>idade (anos)</b>	<b>ingestão de bebida alcoólica</b>	<b>hábito de fumar</b>
1	22	não	não
2	21	sim	não
3	24	sim	não
4	23	sim	não
5	23	sim	não
6	20	não	não
7	21	sim	não
8	21	sim	não
9	23	sim	não
10	23	não	não
11	21	sim	não
12	21	não	não
13	27	sim	sim
14	21	não	não
15	22	sim	não
16	22	sim	não
17	23	não	não
18	22	sim	não
19	23	não	não
20	23	sim	não
21	21	sim	não
22	39	sim	não
23	52	não	não
24	40	não	não
25	43	sim	não
26	50	não	não
27	54	não	não
28	41	não	não
29	39	sim	sim
30	50	não	não
31	36	não	não

**TABELA 3 - Características da população controle** (concluído)

<b>indivíduo</b>	<b>idade (anos)</b>	<b>ingestão de bebida alcóolica</b>	<b>hábito de fumar</b>
32	25	sim	não
33	50	não	não
34	47	sim	não
35	38	sim	não
36	49	sim	sim
37	37	sim	não
38	43	não	não
39	30	sim	sim
40	39	sim	sim
41	43	sim	não
42	28	sim	não
43	45	não	não
44	59	não	sim
45	56	sim	sim
46	48	não	não
47	41	sim	não
48	59	não	não
49	55	não	não
50	22	sim	não
51	48	não	não

## 4.2 Orto - cresol em urina

### 4.2.1 Material

#### 4.2.1.1 Soluções - padrão

- orto - cresol 99,5% - Fluka® - lote n° 11990/1, soluções a 10 g/L (estoque) e entre 0,1 e 1,5 mg/L (trabalho), preparadas em metanol;
- meta-cresol 99% - Fluka® - lote n° 2035779, soluções a 10 g/L (estoque) e entre 0,1 e 1,5 mg/L (trabalho), preparadas em metanol;
- para-cresol > 99% - Fluka® - lote n° 53609/1, soluções a 10 g/L (estoque) e entre 0,1 e 1,5 mg/L (trabalho), preparadas em metanol;

- p-nitroanilina (PA) >98% - J.T. Baker<sup>®</sup> - lote N°504201. Solução de p-nitroanilina 20 g/L (estoque) e a 1,0 g/L (trabalho), em metanol.

#### 4.2.1.2 Reagentes e solventes

- metanol p.a. 99,8% - Isofar – lote n.°990614;
- hidróxido de sódio a 50% - Vetec<sup>®</sup>;
- ácido clorídrico a 1N -Isofar<sup>®</sup>;
- sulfato de sódio anidro - Vetec<sup>®</sup>;
- ácido clorídrico concentrado 36,5 a 38% - Isofar<sup>®</sup> - lote n° 990735.

#### 4.2.1.3 Aparelhos, vidraria e acessórios.

- cromatógrafo a gás CGS<sup>®</sup> - modelo 1000 DPC equipado com detector de ionização de chama, com IQ (*Integration Quality*) para integração;
- coluna cromatográfica ZB-35<sup>®</sup> 35% fenilmetilpolisiloxano, de 30m de comprimento, 0,53 mm de diâmetro e 0,53 µm de espessura do filme;
- *holder* manual para SPME Supelco<sup>®</sup>;
- fibra para SPME carbowax/divinilbenzeno CW/DVB70µm, Supelco<sup>®</sup>;
- frasco SPME - Supelco<sup>®</sup> lote n.°8/7/01;
- agitador Tecnal, TE-089;
- balança analítica KERN<sup>®</sup> modelo 410;
- pipetas automáticas de diferentes capacidades de volume, Finnpiptete<sup>®</sup> e Oxford<sup>®</sup>;
- pipetador automático Brand<sup>®</sup>;

## 4.2.2 Método

### 4.2.2.1 Otimização da microextração em fase sólida (SPME)

Foram realizados vários estudos para otimizar a extração por SPME, considerando alguns fatores que podem afetar a qualidade das análises a serem feitas.

Para verificar as condições ideais para a extração, foram comparadas as áreas dos picos correspondentes para cada parâmetro avaliado.

- **Tempo de exposição e dessorção da fibra**

Foram realizadas análises por exposição de 1 cm da fibra CW/DVB 70 µm por 10, 20, 30 e 40 minutos em 10 mL de urina adicionada de padrão de orto-cresol (2 mg/L) e submetidas à hidrólise com HCl concentrado 100°C/1h. Após o estabelecimento do melhor tempo de exposição da fibra foram testados os tempos de 1, 2, 3 e 4 minutos para a dessorção dos analitos da mesma no injetor do cromatógrafo.

- **Agitação da amostra**

Foi testada a exposição da fibra, sem agitação e posteriormente com agitação, nas mesmas condições de volume, tratamento e fortificação das amostras descritas no procedimento anterior. A fibra ficou exposta por 30 minutos e dessorvida por 3 minutos no cromatógrafo.

- **Adição de sal (salting out)**

Amostras de 10 mL de urina fortificadas com padrão de OC (2 mg/L) e hidrolisadas com HCl a 100°C/1h, pH 7, foram usadas para a adição de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Foram testadas adições de 0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 g do sal.

- **Faixa de pH**

Foram realizados testes para verificar o pH de melhor rendimento da extração. Foram feitos testes em pH 2,0; 4,0; 6,0; 7,0 e 8,0 para 10 mL de amostra (2 mg de OC/L) com adição de 3 g de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Também foram testados para os mesmos valores de pH o rendimento para a extração da p-nitroanilina (PI) na concentração de 1,0 mg/mL.

#### 4.2.2.2 Otimização das condições cromatográficas

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

#### 4.2.2.3 Validação do método

Amostras provenientes de *pools* de urina, obtidas de voluntários não expostos a solventes e adicionadas com soluções-padrão de orto-cresol, em diferentes concentrações, foram usadas para a determinação da linearidade, limites de detecção e de quantificação, precisão e recuperação do método.

- **Linearidade**

Para verificar o intervalo de linearidade do método, foram adicionadas às amostras de *pool* de urina soluções-padrão de orto-cresol de modo a obter-se as seguintes concentrações: 0,1; 0,2; 0,5; 0,8; 1,0 e 1,5 mg/L. Em todas elas adicionou-se 10µg do padrão interno (p-nitroanilina). Estas amostras e um branco do *pool* de urina foram analisados, em sextuplicatas.

- **Limite de detecção**

Foi considerado limite de detecção a menor concentração determinada com confiabilidade, ou seja, a mínima concentração adicionada à amostra que apresentou relação sinal/ruído igual a 3. Foi obtido por diluições sucessivas da amostra adicionada de 0,5 mg/L.

- **Limite de quantificação**

Foi considerado limite de quantificação a menor concentração medida com precisão adequada, ou seja, com coeficiente de variação menor que 10%. Foi encontrado por adição de padrão de orto-cresol, em *pool* de urina em concentrações inferiores a 1,0 mg/L.

- **Repetibilidade e Reprodutibilidade**

Para avaliar a precisão intra-ensaio amostras de urina fortificadas com 0,1; 0,5; 1,5 mg/L de orto-cresol foram analisadas, em sextuplicatas por concentração, para o estabelecimento da precisão intra-ensaio. A precisão interensaio foi avaliada nas concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 mg/L, por dez dias consecutivos.

- **Recuperação**

Para avaliar a recuperação do método, utilizou-se 3 concentrações de orto-cresol em urina de 0,2; 0,8 e 1,5 mg/L. Foram feitos 3 adicionados para cada concentração. A recuperação foi avaliada por comparação com as áreas relativas obtidas por injeção direta de soluções-padrão de orto-cresol e do padrão interno no CG nas mesmas concentrações.



A Figura 6 mostra o fluxograma do método de extração do orto-cresol urinário.

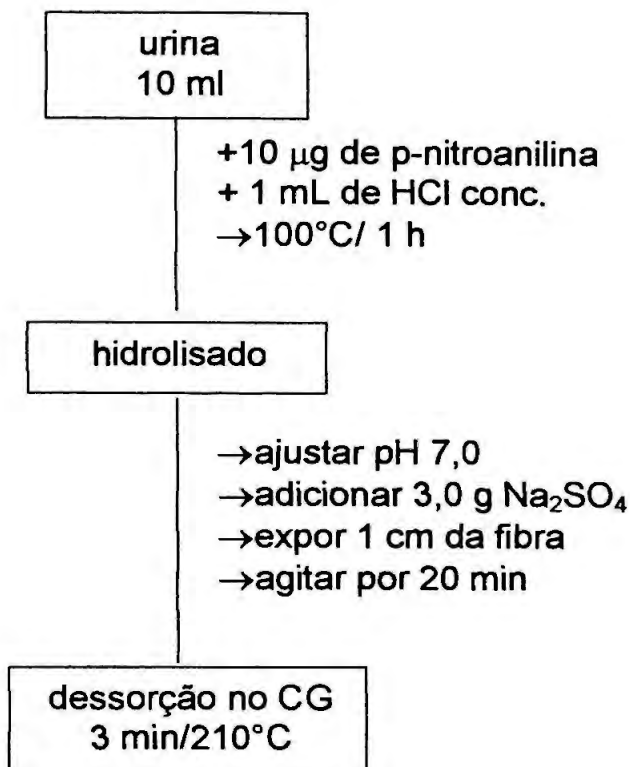


FIGURA 6 - Fluxograma do método de extração do orto-cresol urinário

### 4.3 Ácidos biliares no soro

#### 4.3.1 Material

##### 4.3.1.1 Padrões e reagentes

- calibradores dos ácidos biliares nas concentrações 5, 25, 50, 100, 200 µmol/L - Sigma Diagnostics® - lote n.º 061k6043, 061k6044, 061k6045, 061k6046 e 061k6047 respectivamente;

- reagente A - Sigma Diagnostic® - lote n.º 119H6059;
 

NAD	2,5 mmol/L
NBT (sal <i>nitro blue tetrazolium</i> )	0,61 mmol/L
Diaforase	625 U/L
Tampão	pH 7,0 ± 0,1
- reagente B Sigma Diagnostics® - lote n.º 039H6131;
 

3 $\alpha$ - HSD (3 $\alpha$ ácido hidroxibiliar)	1250 U/L
---	----------
- reagente de finalização da reação (*stop*).

#### 4.3.1.2 Aparelhagem e vidraria

- pipetas automáticas de diferentes capacidades Finnpipette® e Oxford®  
10 a 50  $\mu$ L , 40 a 200  $\mu$ L e 200 a 1000 $\mu$ L;
- pipetador automático Brand®;
- tubos de ensaio;
- banho de água Nova Técnica® NT 265;
- espectrofotômetro Celm® E-225D;
- cubeta Celm®.

#### 4.3.2 Método

Amostras destinadas à validação do método analítico foram preparadas a partir de *pool* de soro, obtidos de voluntários. O soro homogeneizado foi adicionado de padrão de ácidos biliares para o estudo da linearidade, precisão, limite de detecção e limite de quantificação.

- **Linearidade**

Para definir o intervalo de concentração foram adicionados a *pool* de soro "branco" padrões de ácidos biliares de modo a se obter concentrações de 5, 25, 50, 75, 100 e 200,  $\mu$ mol/L. Estas amostras foram analisadas em sextuplicata, assim como amostras de *pool* de soro sem adição de padrão.

Posteriormente também foi avaliada a linearidade entre 1 e 5  $\mu\text{mol/L}$ .

- **Limite de detecção**

O limite de detecção foi estabelecido como 3 desvios padrão do branco de reagentes, dividido pelo coeficiente angular da curva de linearidade.

- **Limite de quantificação**

Foi considerado limite de quantificação a menor concentração que pode ser medida com a precisão adequada, ou seja, com uma imprecisão avaliada pelo coeficiente de variação menor que 10%, encontrado por adição de padrão em soro em concentrações inferiores a 5  $\mu\text{mol/L}$ .

- **Repetibilidade e reprodutibilidade**

Para avaliar a precisão intra-ensaio, amostras diferentes de soro positivo para ácidos biliares, foram analisadas em 10 replicatas por amostra. Concentrações de 25, 75 e 200  $\mu\text{mol/L}$  de padrão de ácidos biliares adicionadas em soro foram avaliadas para o estudo da precisão interensaio, dia após dia, por 7 dias consecutivos.

O método utilizado tem por base o procedimento descrito por MASHIGE et al., 1981, descrito a seguir.

- diluir os reagentes A e B com 10 mL de água destilada;
- adicionar 4 mL de reagente A a 1 mL do reagente B, para constituição do reagente teste;
- adicionar 4 mL do reagente A a 1 mL de água destilada para a constituição do reagente banco;
- pipetar 200  $\mu\text{L}$  de soro para 2 tubos de ensaio;
- adicionar 500  $\mu\text{L}$  de reagente branco e teste nos respectivos tubos;

- manter os tubos em banho de água a 37°C por 5 minutos;
- adicionar 100 µL do reagente para parar a reação (*stop*) ;
- ler as absorvâncias do branco e teste, acertando o zero de absorvância com água destilada.

As concentrações são proporcionais à diferença da absorvância das leituras do teste e do branco.

## 4.4 Ácido hipúrico na urina

### 4.4.1 Material

#### 4.4.1.1 Soluções-padrão

- padrão de ácido hipúrico 99% - Sigma<sup>®</sup> – lote n.º27H3504. Solução padrão a 100 g/L (estoque) e a 5,0; 10,0; 20 g/L (trabalho), em metanol;
- padrão de ácido heptadecanóico 99% - Sigma<sup>®</sup> – lote n.º57H2627. Soluções a 20 g/L (estoque) e 2,0 g/L (trabalho), em metanol.

As soluções foram conservadas a 4,0°C.

#### 4.4.1.2 Reagentes e solventes

- acetato de etila 99,8%- Isofar<sup>®</sup>;
  - ácido clorídrico Vetec lote n° 02279;
- para o agente metilante: óxido de prata 99,5% - Vetec<sup>®</sup> – lote n.º972855; cloreto de metiltrifenilamonio - Sigma<sup>®</sup> – lote n.º57H2627; metanol p.a. 99,8% - Isofar<sup>®</sup> – lote n.º990614.

*Preparação do agente metilante:*

- cristais de cloreto de trimetil-n-fenilamônio 236 mg
- óxido de prata 175 mg
- metanol super seco 10 mL

Agitar por 2h, em agitador mecânico, sendo o tubo coberto com papel alumínio para proteção da luz. Deixar em repouso até decantar.

Retirar o sobrenadante, colocar em frascos pequenos e acondicioná-los a -20°C, ao abrigo da luz.

*4.4.1.3 Aparelhagem e vidraria*

- cromatógrafo à gás CGS® - modelo 1000 DPC equipado com detector de ionização de chama, com IQ (*Integration Quality*) para integração;
- coluna cromatográfica HP-1 100% metilsiloxano Hewlett-Packard®, com 30 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro interno e 0,25µm de espessura do filme; microsseringa HP® com capacidade para 10 µL;
- programação da temperatura da coluna:
  - inicial 170°C por 2 min
  - aquecer 30°C/min até 200°C
  - permanecer a 200°C por 6 min
  - aquecer 40°C/min até 240°C
- temperaturas: do injetor: 240°C  
do detector: 250°C
- fluxo dos gases: nitrogênio: 3 mL/min (gás de arraste)  
oxigênio: 292 mL/min  
hidrogênio: 73 mL/min  
auxiliar: 32,8 mL/min
- razão de divisão no injetor: 1/10
- agitador de tubos Fanem®;

- banho de água;
- tubo de vidro com rolha esmerilhada e capacidade de 15 mL;
- béquer afunilado 5mL, com rolha esmerilhada.

#### 4.4.2 Método

As amostras destinadas à padronização do método analítico foram preparadas a partir de *pools* de urina de voluntários não expostos a solventes e enriquecidos com soluções-padrão de ácido hipúrico em diferentes concentrações. Foram determinados alguns parâmetros de validação necessários à aplicação do método como: linearidade, precisão intra-ensaio e limite de quantificação.

- **Linearidade**

Para definir a linearidade do método, foram adicionadas soluções-padrão de AH a *pool* de urina para se obter as seguintes concentrações: 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 1,5; 3,0 e 5,0; g/L. Estas amostras foram analisadas em sextuplicata por concentração.

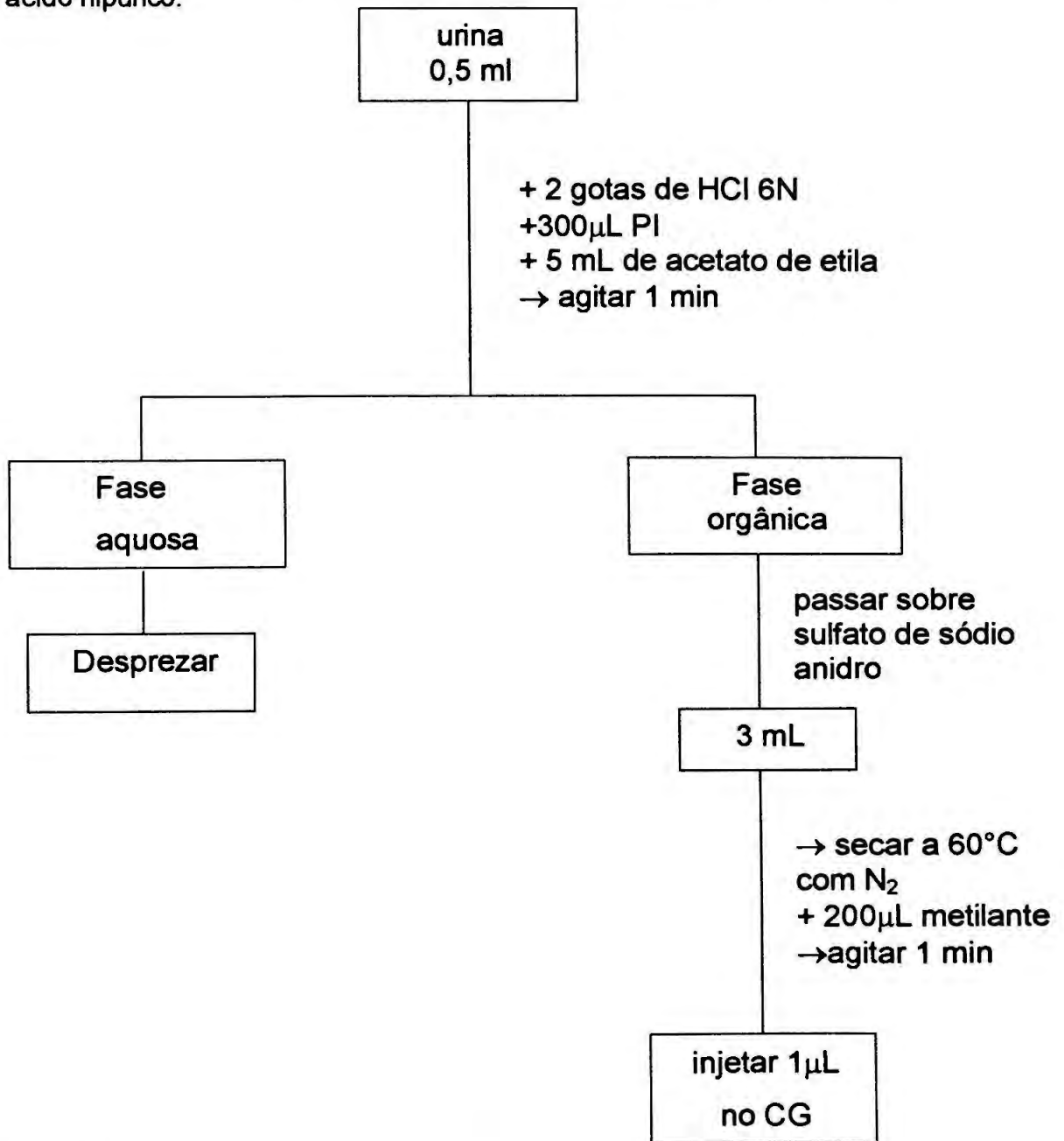
- **Limite de quantificação**

O limite de quantificação foi considerado a menor concentração que pode ser medida com uma precisão adequada, ou seja, imprecisão avaliada por um coeficiente de variação menor que 10%. Foi encontrado por adição de AH a *pool* de urina, analisando-se em sextuplicata por amostra.

- **Repetibilidade**

Para avaliar a precisão intra-ensaio as amostras foram fortificadas com 0,2; 1,5 e 3,0 g/L de padrão de ácido hipúrico.

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



**FIGURA 7** - Fluxograma da extração líquido-líquido do ácido hipúrico.

## 4.5 Parâmetros bioquímicos

### 4.5.1 Material

- kit Creatinina Bioclin®;
- kit Fosfatase alcalina Bioclin®;
- kit Bilirubina Bioclin®;
- kit  $\delta$ -GT colorimétrico Bioclin®;
- kit AST colorimétrico Bioclin®;
- kit ALT colorimétrico Bioclin®;
- espectrofotometro Celm modelo E-225D®;
- cubetas Celm®;
- pipetas de volumes variados;
- tubo de ensaio de volume variados;
- aparelho automático para determinação Bioclin®;
- urodensímetro Uicon®;
- fita de pH 1-14.

Os métodos utilizados para a determinação dos parâmetros bioquímicos foram os usados rotineiramente no Laboratório de Análises Clínicas, sugeridos pelo fabricante dos kits (Anexo 6).

## 4.6 Análise estatística

A distribuição estatística foi estudada através do método de Shapiro-Wilk. Utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney para a verificação da influência dos hábitos pessoais e de trabalho nos resultados dos bioindicadores estudados. O teste de Mann-Whitney também foi utilizado para avaliar as diferenças entre os dois grupos. O Qui quadrado ( $\chi_2$ ) foi o teste escolhido para avaliar a significância de cada parâmetro medido com relação ao número de indivíduos com valores superiores aos do máximo dos intervalos de referência de cada parâmetro.



O estudo estatístico foi realizado utilizando o programa SAS® Software, versão 6.11.

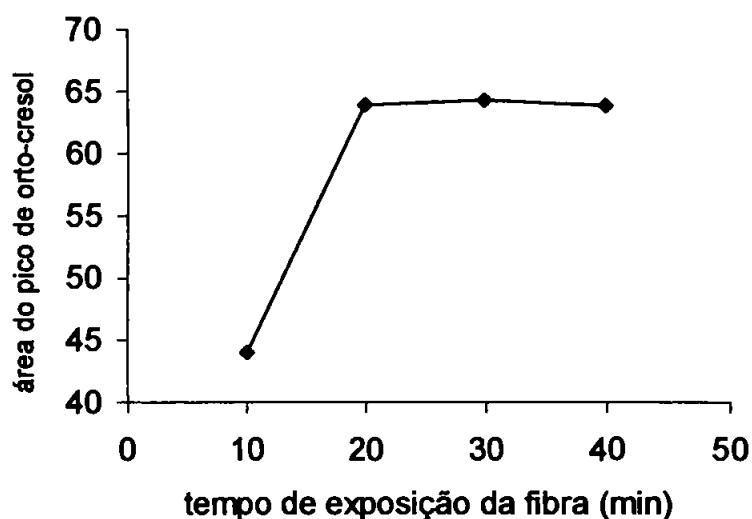
# RESULTADOS

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Orto-cresol em urina

#### 5.1.1 Otimização da microextração em fase sólida

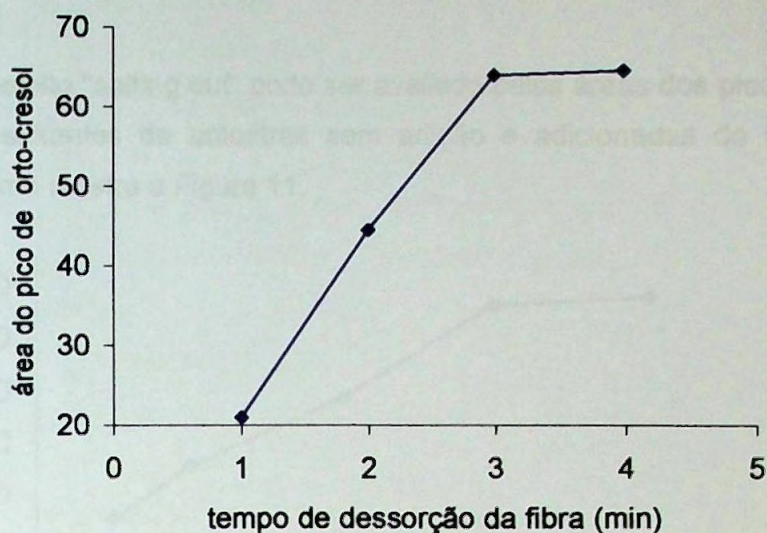
A Figura 8 mostra as áreas dos picos integrados de orto-cresol obtidos em diferentes tempos de exposição da fibra (CW/DVB 70 $\mu$ m) na amostra.



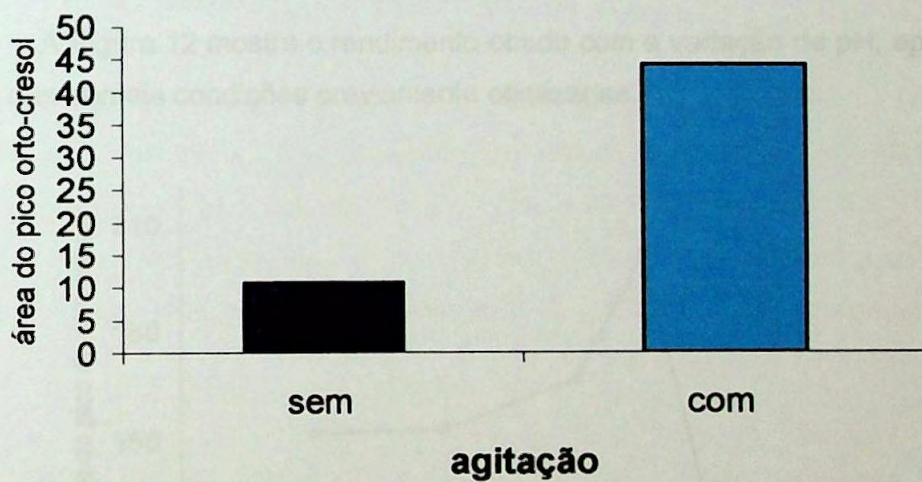
**FIGURA 8** – Áreas dos picos de orto-cresol obtidas em diferentes tempos de exposição da fibra CW/DVB em urina fortificada com orto-cresol (2 mg/L).

As áreas dos picos de orto-cresol obtidas nos diferentes tempos de dessorção da fibra no injetor do CG estão expressas na Figura 9.

A Figura 10 mostra a eficiência da extração do orto-cresol de urina por SPME com a agitação da amostra.

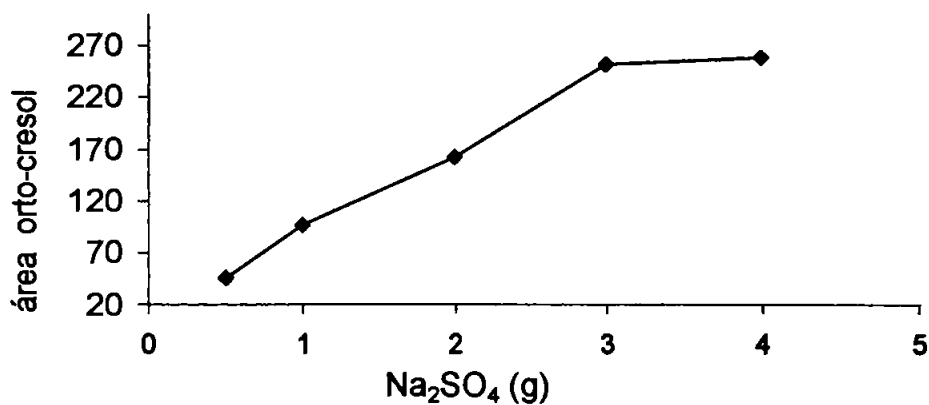


**FIGURA 9** – Áreas dos picos de orto-cresol (2 mg/L) obtidas em diferentes tempos de dessorção da fibra CW/DVB no injetor do CG a 210°C.



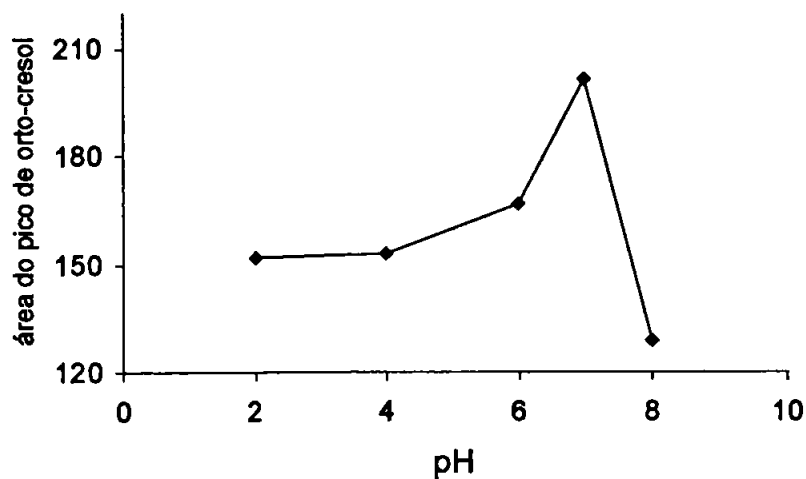
**FIGURA 10** - Áreas dos picos de orto-cresol (2 mg/L) obtidas de amostras submetidas ou não à agitação com exposição da fibra CW/DVB.

O efeito "salting out" pode ser avaliado pelas áreas dos picos de orto-cresol resultantes de amostras sem adição e adicionadas de sulfato de sódio, como mostra a Figura 11.



**FIGURA 11** - Áreas dos picos de orto-cresol obtidos com a adição de quantidades variadas de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> às amostras com a exposição da fibra CW/DVB.

A Figura 12 mostra o rendimento obtido com a variação de pH, após o uso das demais condições previamente otimizadas.



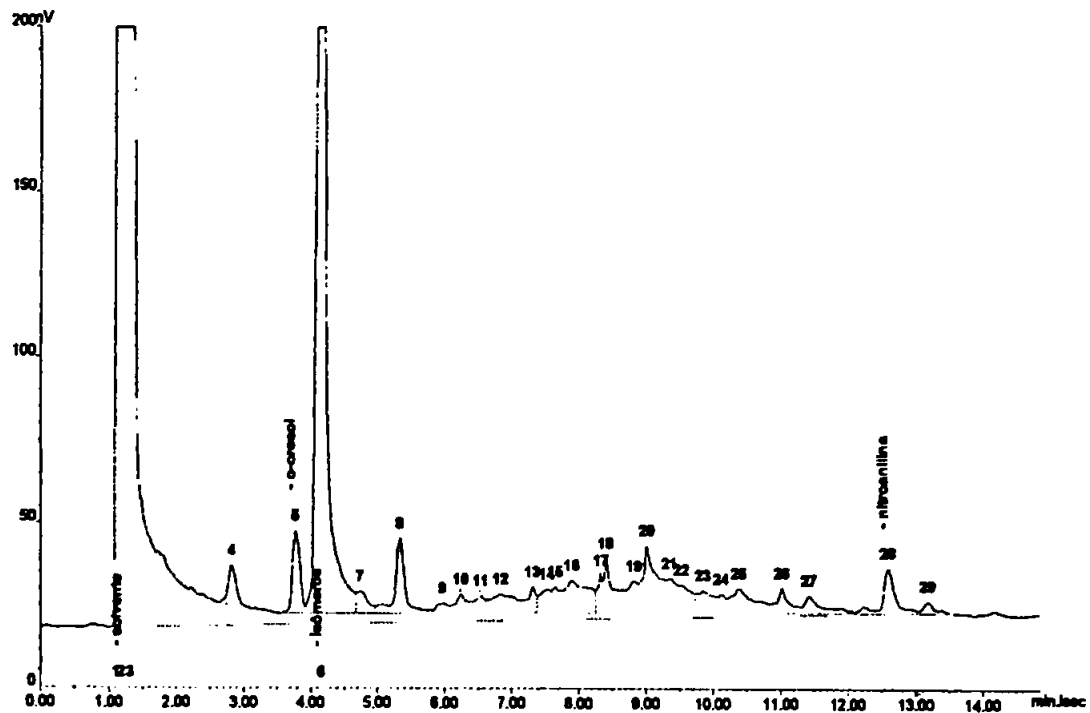
**FIGURA 12** - Áreas dos picos de orto-cresol (2 mg/L) obtidas com a variação do pH das amostras com a exposição da fibra CW/DVB.

### 5.1.2 Otimização das condições cromatográficas

As condições cromatográficas estabelecidas para a análise de orto-cresol em urina por SPME estão apresentadas a seguir:

- Coluna:
  - Temperatura: 190°C
  - Fluxo do gás de arraste (nitrogênio): 8,0 mL/min.
- Injetor:
  - Temperatura: 210°C
  - Relação da divisão: sem divisão da amostra (*splitless*)
- Detector:
  - Temperatura: 220°C
  - Fluxos: hidrogênio: 73 mL/min
  - oxigênio: 292mL/min
  - auxiliar(nitrogênio): 32,8 mL/min
- Padrão interno: *p*-nitroanilina

A Figura 13 mostra o perfil cromatográfico gerado a partir de amostra fortificada com orto-cresol e padrão interno (NA). O tempo de retenção médio  $\pm$  desvio padrão ( $n=10$ ) do OC foi de  $3.75 \pm 0,014$  e da NA de  $12,6 \pm 0.02$ . O tempo de retenção relativo (OC/NA) foi de 0,297. Nestas condições, cada amostra é analisada em 15 minutos.



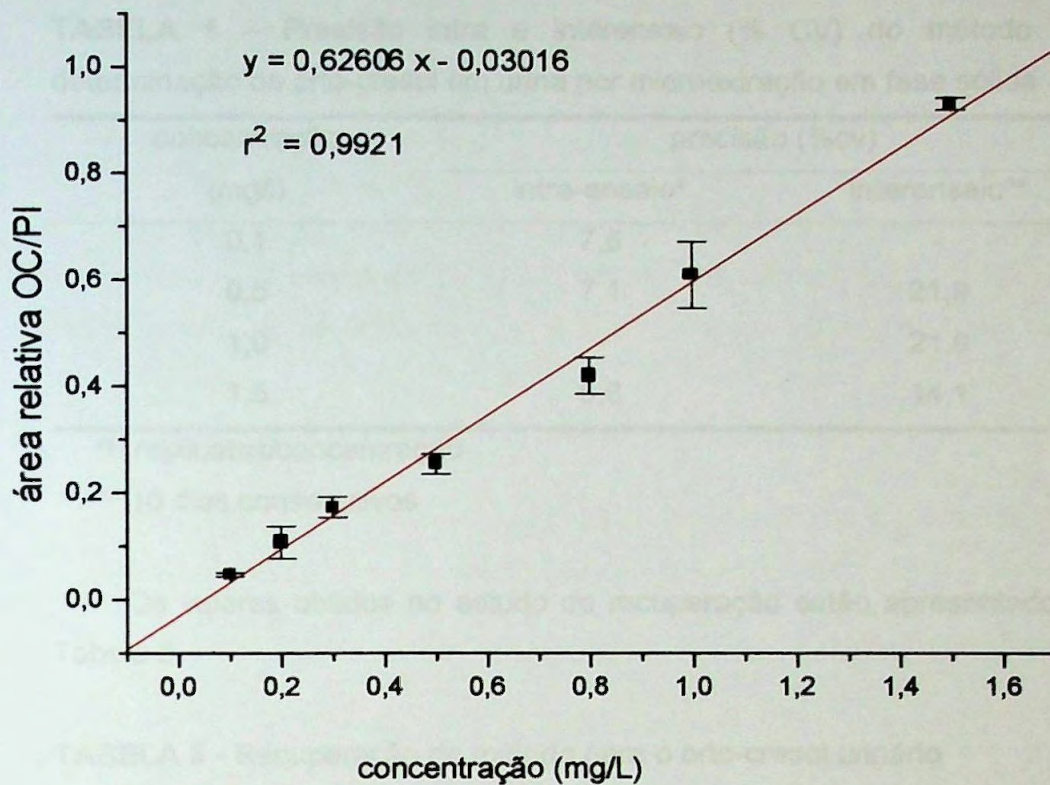
**FIGURA 13** - Cromatograma de amostra de urina fortificada com orto-cresol (0,5 mg/L) e padrão interno (NA, 1,0 mg/L), após extração por SPME.

### 5.1.3 Parâmetros de validação

- **Linearidade**

Na Figura 14 está representada a curva do orto-cresol em urina com concentrações entre 0,1 a 1,5 mg/L de orto-cresol e 10 µg de padrão interno.





**FIGURA 14** - Curva de linearidade do orto-cresol (OC) urinário. Áreas relativas à *p*-nitroanilina (PI).

- **Limites de detecção e de quantificação**

O limite de detecção do método foi igual ao limite de quantificação. O valor encontrado foi de 0,1 mg/L cujo coeficiente de variação foi de 6,8% para 10 replicatas.

- **Repetibilidade e reprodutibilidade**

A Tabela 4 mostra os coeficientes de variação obtidos nos estudos da precisão intra-ensaio e interensaio de amostras adicionadas com orto-cresol e padrão interno.



**TABELA 4** – Precisão intra e interensaio (% CV) do método para determinação de orto-cresol em urina por microextração em fase sólida

concentração (mg/l)	precisão (%cv)	
	intra-ensaio*	interensaio**
0,1	7,8	-
0,5	7,1	21,9
1,0	-	21,0
1,5	6,8	14,1

\*6 replicatas/concentração

\*\* 10 dias consecutivos

Os valores obtidos no estudo de recuperação estão apresentados na Tabela 5.

**TABELA 5** - Recuperação do método para o orto-cresol urinário

concentração (mg/L)	% recuperação *
0,5	80
1,0	91
1,5	98
média ± DP	90,3 ± 8,7

\*tríplicas

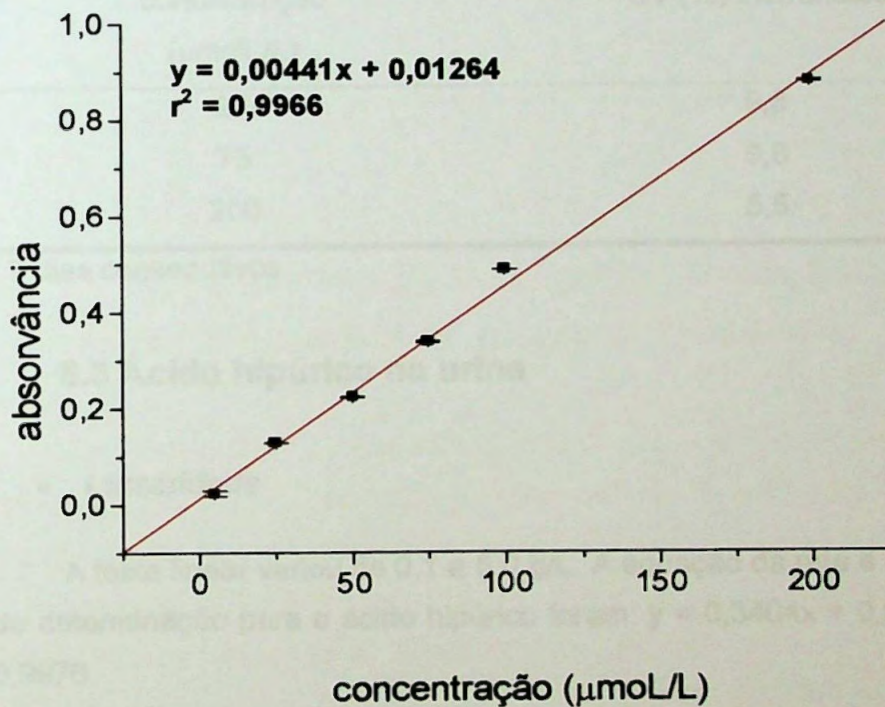
## 5.2 Ácidos biliares em soro

- **Linearidade**

Na Figura 15 está representada a linearidade dos ácidos biliares adicionados em amostras de *pool* de soro em concentrações entre 5,0 a 200,0  $\mu\text{mol/L}$ . Cada ponto corresponde à média dos valores obtidos.

- **Limites de detecção e de quantificação**

Foi considerado limite de detecção a concentração de 0,5  $\mu\text{mol/L}$ , e limite de quantificação 1,0  $\mu\text{mol/L}$  (%CV = 9,94; n = 10).



**FIGURA 15** - Curva de linearidade dos ácidos biliares em soro

- **Precisão**

Os coeficientes de variação intra e interensaio obtidos nas análises dos ácidos biliares, estão representadas nas Tabelas 6 e 7 respectivamente.

**TABELA 6** - Precisão intra-ensaio do método para análise de ácidos biliares

	amostras*		
	soro 1	Soro 2	soro 3
<b>coeficiente de variação (%)</b>	<b>7,7</b>	<b>3,7</b>	<b>1,2</b>

*10 replicatas cada soro*

**TABELA 7** - Precisão interensaio do método para análise de ácidos biliares

concentração ( $\mu\text{mol/L}$ )	CV (%) interensaio*
25	9,3
75	9,8
200	5,5

\* 7 dias consecutivos

### 5.3 Ácido hipúrico na urina

- **Linearidade**

A faixa linear variou de 0,1 a 5,0 g/L. A equação da reta e o coeficiente de determinação para o ácido hipúrico foram:  $y = 0,3404x + 0,03837$  e  $r^2 = 0,9976$ .

- **Limite de quantificação**

O limite de quantificação obtido para o ácido hipúrico foi de 0,05 g/L com CV de 4,7%.

- **Repetibilidade**

Os coeficientes de variação intra-ensaio obtidos para o AH, estão apresentados na Tabela 8.

**TABELA 8** - Precisão do método para determinação de ácido hipúrico em urina

concentração (g/L)	CV (%) intra-ensaio*
0,2	3,6
1,5	2,8
3,0	1,1

\* 6 replicatas para cada concentração

#### **5.4 Bioindicadores de dose interna, ácidos biliares e parâmetros bioquímicos na população avaliada**

As Tabelas 9 e 10 apresentam, respectivamente, os resultados do ortocresol e ácido hipúrico em urina e ácidos biliares no soro para os indivíduos expostos (n=57) e não expostos (n=51) ocupacionalmente a solventes. Os resultados estão expressos com e sem correção pela creatinina urinária. Os ácidos biliares séricos foram expressos em  $\mu\text{mol/L}$ .

**TABELA 9** - Valores de orto-cresol (OC) e ácido hipúrico (AH) em urina e ácidos biliares (AB) no soro do grupo de exposto (continua)

trabalhador	OC		AH		AB
	mg/L	mg/g creatinina	g/L	g/g creatinina	µmol/L
1	0,45	0,42	2,17	2,02	7,50
2	0,21	0,12	1,05	0,59	7,33
3	nd	nd	0,05	0,05	6,03
4	0,60	0,31	1,97	1,02	4,89
5	0,22	0,14	0,84	0,54	1,80
6	nd	nd	0,93	0,39	6,51
7	0,95	0,46	2,30	1,11	20,53
8	0,59	0,72	1,17	1,42	4,07
9	0,32	0,14	3,05	1,32	6,03
10	nd	nd	1,56	1,57	30,94
11	nd	nd	2,34	1,31	7,16
12	nd	nd	0,13	0,11	25,41
13	nd	nd	0,43	0,25	6,64
14	0,89	0,58	0,19	0,12	7,03
15	nd	nd	0,48	0,43	7,42
16	nd	nd	0,29	0,20	16,40
17	0,10	0,08	0,31	0,40	11,33
18	0,17	0,14	0,45	0,38	8,59
19	nd	nd	0,10	0,08	13,57
20	nd	nd	0,21	0,15	10,16
21	nd	nd	0,51	0,31	5,47
22	0,53	0,25	1,09	0,52	5,47
23	0,25	0,09	3,33	1,18	5,86
24	nd	nd	0,36	0,23	13,67
25	0,28	0,19	0,84	0,58	14,53
26	nd	nd	0,39	0,32	13,95
27	0,21	0,16	1,07	0,82	14,92
28	0,22	0,11	0,66	0,33	6,78
29	0,31	0,23	0,98	0,73	11,43
30	nd	nd	0,69	0,97	10,65
31	0,34	0,15	0,83	0,37	5,81
32	0,74	0,51	0,46	0,32	7,93
33	nd	nd	0,46	0,24	11,82



**TABELA 9** - Valores de orto-cresol (OC) e ácido hipúrico (AH) em urina e ácidos biliares (AB) no soro **grupo de exposto**. (concluído)

trabalhador	OC		AH		AB
	mg/L	mg/g creatinina	g/L	g/g creatinina	μmol/L
34	nd	nd	1,37	0,70	4,07
35	0,16	0,11	0,07	0,05	9,69
36	0,20	0,14	0,32	0,22	7,94
37	0,18	0,19	0,46	0,49	29,22
38	0,26	0,29	0,16	0,17	4,26
39	nd	nd	0,51	0,57	15,52
40	nd	nd	1,16	0,70	24,39
41	0,33	0,30	0,59	0,53	8,53
42	0,22	0,17	0,83	0,65	10,36
43	0,22	0,23	0,61	0,64	7,93
44	nd	nd	0,62	0,38	6,09
45	0,35	0,18	1,76	0,91	24,39
46	nd	nd	0,70	0,33	4,27
47	nd	nd	0,18	0,19	15,85
48	0,37	0,35	1,10	1,05	19,51
49	nd	nd	4,25	2,00	16,08
50	0,18	0,19	0,54	0,60	2,65
51	nd	nd	0,20	0,33	5,88
52	nd	nd	0,30	0,29	5,59
53	nd	nd	2,47	2,01	5,73
54	0,53	0,61	2,39	2,80	10,88
55	0,60	0,36	1,14	0,69	5,80
56	nd	nd	0,59	0,36	2,94
57	0,10	0,04	0,33	0,28	4,41

nd = não detectado

**TABELA 10** - Valores de ácido hipúrico (AH) em urina e ácidos biliares (AB) no soro no **grupo controle** (continua)

Indivíduo	AH		ácidos biliares μmol/L
	g/L	g/g creatinina	
1	0,09	0,11	2,23
2	0,81	0,36	6,98
3	0,70	0,37	1,95
4	0,29	0,13	3,91
5	0,22	0,08	2,79
6	0,12	0,08	12,50
7	0,48	0,19	4,47
8	0,09	0,05	2,79
9	0,58	0,22	7,90
10	0,37	0,18	1,12
11	0,36	0,12	1,52
12	0,22	0,15	5,63
13	1,11	0,54	7,01
14	3,51	1,25	3,96
15	0,28	0,23	4,88
16	0,54	0,27	4,57
17	0,39	0,25	2,44
18	0,04	0,05	3,96
19	0,45	0,35	3,96
20	0,21	0,19	4,27
21	0,41	1,05	6,40
22	0,03	0,05	5,43
23	0,21	0,17	5,00
24	0,22	0,11	2,68
25	0,05	0,05	2,39
26	0,61	0,24	2,83
27	0,82	0,41	5,86
28	0,24	0,09	10,64
29	0,21	0,09	2,38
30	0,27	0,08	2,41
31	0,91	0,68	4,48
32	0,05	0,05	7,24
33	0,22	0,16	6,89
34	0,05	0,05	13,79
35	0,17	0,28	4,82

**TABELA 10** - Valores de ácido hipúrico (AH) em urina e ácidos biliares (AB) no soro **grupo controle** (concluído)

indivíduo	AH		ácidos biliares μmol/L
	g/L	g/g creatinina	
36	0,57	0,42	5,86
37	0,42	0,41	11,38
38	0,05	0,05	7,81
39	0,09	0,11	13,02
40	0,35	0,25	7,03
41	0,38	0,21	3,91
42	0,37	0,36	2,43
43	0,44	0,54	3,65
44	0,54	0,43	1,04
45	0,75	1,08	7,03
46	0,11	0,23	5,21
47	0,24	0,15	17,44
48	0,47	0,57	4,17
49	0,33	0,32	2,08
50	0,09	0,07	7,55
51	3,64	1,60	14,84

A Tabela 11 mostra as medidas descritivas para o orto-cresol urinário em mg/L e mg/g de creatinina. As Tabelas 12 e 13 mostram, respectivamente, os valores descritivos para o ácido hipúrico e os ácidos biliares para a população exposta e não exposta a solventes.



**TABELA 11 - Medidas descritivas para orto-cresol ( mg/L e mg/g de creatinina) em trabalhadores do grupo exposto**

medidas	mg/L	mg /g de creatinina
média±DP	0,35 ± 0,23	0,26 ± 0,17
mediana	0,28	0,19
MG*	0,29	0,21
máximo	0,95	0,72
mínimo	0,10	0,08
IC 95%**	0,29 - 0,41	0,21 - 0,30
percentil 10	0,17	0,11
percentil 90	0,60	0,51

\* média geométrica \*\* intervalo de confiança 95%

**TABELA 12 - Medidas descritivas para o ácido hipúrico (g/L e g/g de creatinina) em voluntários do grupo exposto e do grupo controle**

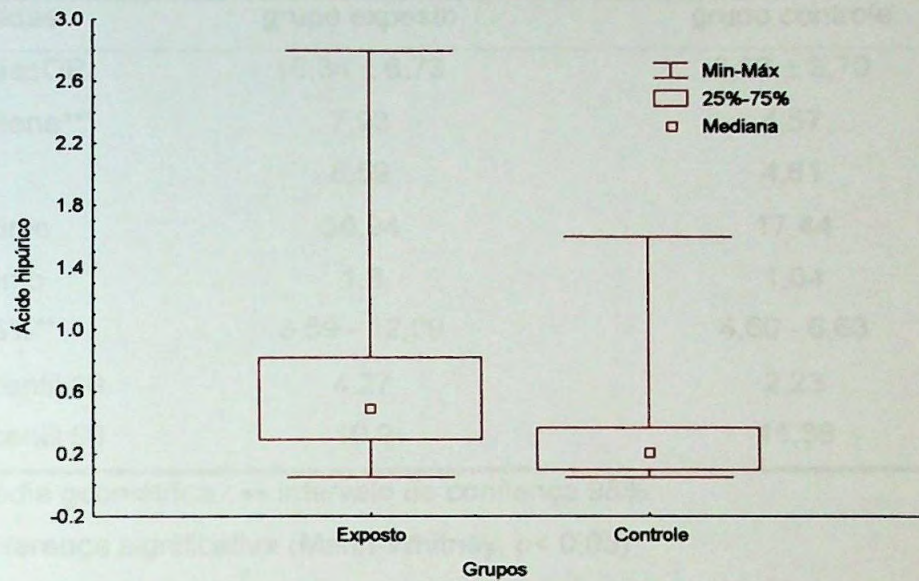
medidas	grupo exposto		grupo controle	
	g/L	g/g creatinina	g/L	g/g creatinina
média ±DP	0,95 ± 0,89	0,65 ± 0,56	0,47±0,67	0,30±0,32
mediana***	0,62	0,49	0,33	0,21
MG*	0,63	0,46	0,28	0,20
máximo	4,25	2,8	3,64	1,60
mínimo	0,04	0,05	0,03	0,05
IC 95%**	0,72 - 1,18	0,51 - 0,80	0,29 - 0,66	0,22 - 0,39
percentil 10	0,18	0,16	0,05	0,05
percentil 90	2,32	1,36	0,81	0,57

\* média geométrica \*\* intervalo de confiança 95%

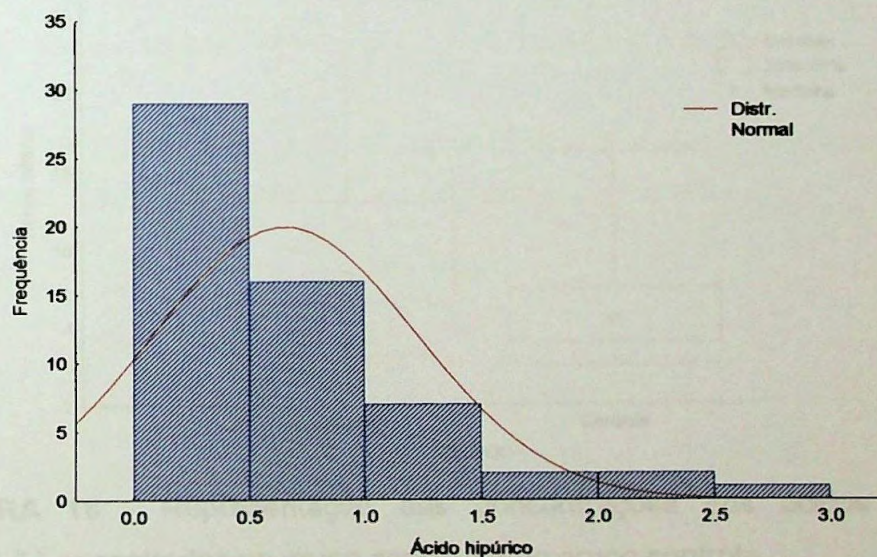
\*\*\*diferença significativa (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ )

A Figura 16 mostra as diferenças entre as concentrações de AH urinário nos dois grupos.

A Figura 17 mostra a distribuição para ácido hipúrico nos indivíduos do grupo exposto.



**FIGURA 16** - Representação das concentrações do ácido hipúrico (g/g de creatinina) encontrados no grupo de trabalhadores expostos e no grupo controle.



**FIGURA 17** - Distribuição dos valores do ácido hipúrico na população exposta ocupacionalmente aos solventes (Shapiro-Wilk,  $w=0,82349$   $p < 0,0001$ ).



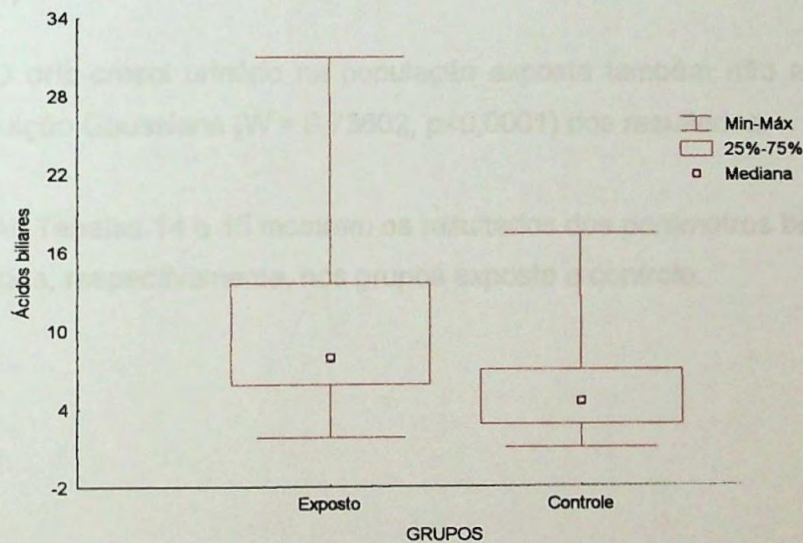
**TABELA 13** - Medidas descritivas para as concentrações dos ácidos biliares ( $\mu\text{mol/L}$ ) nos **grupos exposto e controle**

medidas	grupo exposto	grupo controle
média $\pm$ DP	10,34 $\pm$ 6,73	5,62 $\pm$ 3,70
mediana***	7,93	4,57
MG*	8,59	4,61
máximo	30,94	17,44
mínimo	1,8	1,04
IC95%**	8,59 - 12,09	4,60 - 6,63
percentil 10	4,27	2,23
percentil 90	19,9	11,38

• média geométrica •• intervalo de confiança 95%

\*\*\*diferença significativa (Mann-Whitney,  $p < 0,05$ )

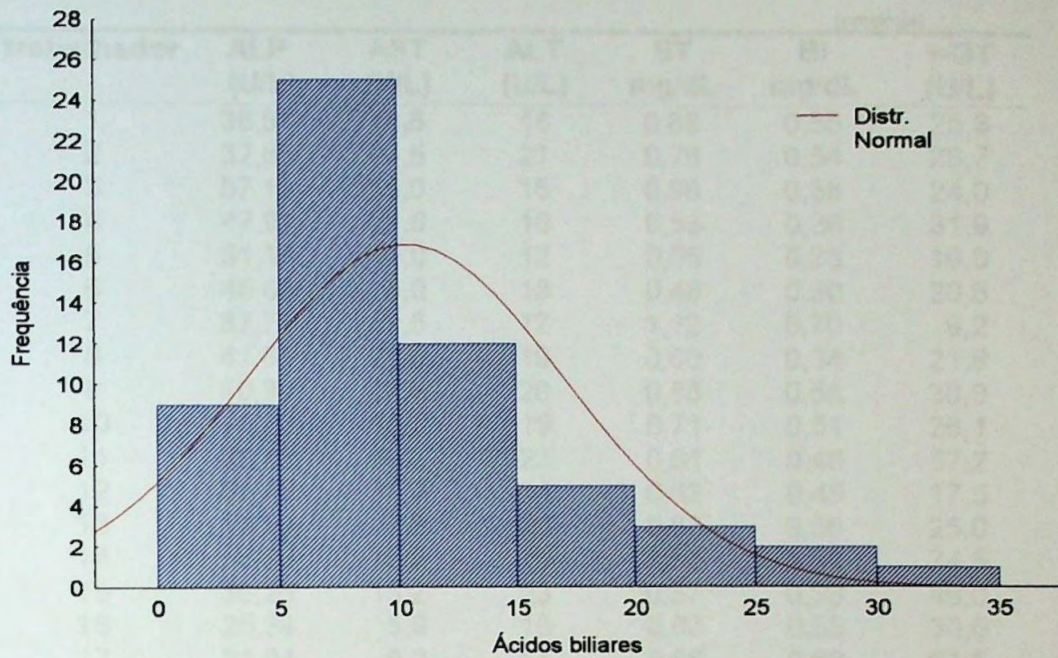
A Figura 18 denota as diferenças nas concentrações de ácidos biliares nos dois grupos



**FIGURA 18** - Representação das concentrações dos ácidos biliares ( $\mu\text{mol/L}$ ) encontrados no grupo exposto e no grupo controle.

A Figura 19 mostra a distribuição para os ácidos biliares nos indivíduos do grupo exposto.





**FIGURA 19.** Distribuição dos valores dos ácidos biliares na população exposta ocupacionalmente aos solventes (Shapiro-Wilk,  $w=0,85195$   $p < 0,0001$ )

O orto-cresol urinário na população exposta também não apresentou distribuição Gaussiana ( $W = 0,73602$ ,  $p < 0,0001$ ) dos resultados.

As Tabelas 14 e 15 mostram os resultados dos parâmetros bioquímicos avaliados, respectivamente, nos grupos exposto e controle.

**TABELA 14 - Parâmetros bioquímicos nos indivíduos do grupo exposto**

(continua)

trabalhador	ALP (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	BT mg/dL	BI mg/dL	γ-GT (U/L)
1	36,51	14,6	18	0,68	0,55	25,3
2	32,85	24,5	21	0,78	0,54	28,7
3	57,19	15,0	16	0,98	0,58	24,0
4	47,91	21,6	10	0,53	0,36	31,9
5	31,18	11,0	12	0,55	0,33	16,0
6	46,08	8,0	18	0,48	0,30	20,8
7	37,72	9,5	12	1,12	0,70	9,2
8	41,82	22,0	19	0,60	0,34	21,8
9	40,30	16,4	28	0,88	0,55	38,9
10	46,23	15,7	19	0,71	0,51	26,1
11	39,88	16,2	23	0,61	0,46	57,2
12	36,48	10,7	14	0,62	0,45	17,5
13	19,94	7,9	10	0,82	0,56	25,0
14	56,66	15,2	19	0,82	0,59	74,5
15	30,26	15,2	23	0,57	0,36	49,0
16	25,34	5,9	10	0,83	0,55	30,6
17	21,94	9,2	14	0,86	0,63	61,5
18	46,21	11,9	10	0,71	0,51	20,3
19	29,21	9,4	12	0,55	0,35	17,2
20	28,50	10,7	12	0,46	0,34	43,0
21	27,45	9,9	10	0,57	0,33	23,3
22	43,00	19,7	16	0,71	0,53	96,6
23	31,78	15,9	13	0,75	0,59	41,2
24	30,61	16,2	46	1,20	0,92	61,8
25	51,64	13,9	19	0,57	0,36	41,2
26	31,29	21,1	27	0,63	0,33	72,0
27	42,67	23,4	18	0,92	0,59	80,3
28	44,21	11,4	17	0,79	0,40	42,0
29	37,05	10,7	13	0,64	0,37	20,9
30	63,85	9,9	10	1,00	0,63	16,1
31	43,00	15,2	19	0,88	0,58	53,0
32	32,46	10,7	12	1,10	0,89	42,7
33	48,42	10,7	16	0,46	0,25	18,0
34	42,94	9,9	11	1,00	0,60	21,0
35	50,80	10,7	12	0,71	0,43	24,0

**TABELA 14 - Parâmetros bioquímicos nos indivíduos do grupo exposto**

trabalhador	(concluído)					
	ALP (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	BT mg/dL	BI mg/dL	$\gamma$ -GT (U/L)
36	30,17	26,3	27	1,20	0,78	73,0
37	30,55	8,7	10	0,65	0,54	37,2
38	39,54	15,2	16	0,48	0,32	24,5
39	36,85	10,4	20	0,72	0,52	38,5
40	42,46	12,7	14	0,72	0,56	39,0
41	59,38	12,7	18	0,94	0,66	53,6
42	37,53	19,4	25	0,32	0,08	27,5
43	37,38	14,9	11	0,62	0,40	40,9
44	40,61	14,7	10	0,51	0,31	30,6
45	51,23	20,9	38	1,22	0,97	79,6
46	37,53	18,2	23	0,72	0,54	34,8
47	36,76	20,4	18	0,96	0,75	87,2
48	79,23	17,4	22	0,82	0,54	26,6
49	29,06	12,9	13	1,10	0,60	31,0
50	32,15	26,0	19	0,51	0,23	37,0
51	30,45	20,0	11	0,31	0,20	12,0
52	62,09	17,0	14	0,54	0,31	19,0
53	27,25	10,7	14	0,94	0,54	44,0
54	66,79	21,0	10	0,81	0,43	17,0
55	59,86	26,0	16	0,63	0,26	46,0
56	49,93	39,0	25	0,61	0,33	27,0
57	65,62	19,0	13	0,54	0,27	14,0

ALP = fosfatase alcalina

AST = aspartato aminotransferase

ALT = alanina aminotransferase

BT = bilirubina total

BI = bilirubina indireta

$\gamma$ -GT =  $\gamma$ -glutamyl-transferase

**TABELA 15 - Parâmetros bioquímicos nos indivíduos do grupo controle**

(continua)

trabalhador	ALP (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	BT mg/dL	BI mg/dL	$\gamma$ -GT (U/L)
1	28,20	8,7	12,7	0,48	0,31	31,2
2	30,56	12,2	22,4	0,40	0,27	37,1
3	38,95	12,7	16,2	0,46	0,31	42,3
4	40,66	7,7	18,0	0,57	0,35	34,0
5	32,13	6,7	7,4	0,51	0,28	24,4
6	32,92	11,7	18,9	1,00	0,65	28,1
7	36,98	12,9	23,0	0,55	0,33	27,2
8	53,77	8,7	11,7	1,00	0,63	30,1
9	40,52	22,6	26,0	0,41	0,30	32,0
10	23,61	10,2	10,7	0,82	0,58	21,2
11	40,52	8,9	7,4	0,62	0,38	16,0
12	34,62	13,2	20,0	0,51	0,31	26,1
13	44,85	10,4	16,2	0,64	0,40	38,8
14	33,84	8,7	10,9	0,66	0,35	17,5
15	19,93	12,4	25,1	0,75	0,51	20,7
16	27,93	15,4	19,4	0,73	0,45	42,1
17	37,11	19,7	35,2	0,51	0,36	46,0
18	26,75	12,9	15,2	0,69	0,43	27,1
19	34,36	7,4	6,7	0,80	0,45	25,0
20	28,33	11,9	12,2	0,66	0,42	28,1
21	21,25	10,7	12,7	0,60	0,32	18,2
22	24,18	20,0	30,0	0,78	0,55	42,0
23	33,43	15,2	38,0	0,53	0,35	76,0
24	36,56	11,7	20,4	0,63	0,36	22,0
25	30,00	12,9	13,1	0,52	0,31	23,0
26	30,14	10,8	9,4	1,00	0,67	16,0
27	38,80	11,4	10,9	0,48	0,30	17,0
28	30,74	10,1	10,6	0,64	0,44	14,0
29	42,80	16,4	13,2	0,46	0,35	48,0
30	34,75	7,9	16,4	0,48	0,29	26,9
31	34,62	10,2	12,2	0,52	0,21	22,7
32	27,41	11,9	11,4	0,42	0,14	26,9
33	28,72	8,7	11,4	0,64	0,44	30,9
34	20,98	8,7	16,2	0,49	0,32	35,7
35	21,90	12,7	9,4	0,55	0,24	24,2
36	25,96	9,4	10,5	0,72	0,57	47,5
37	28,72	9,2	22,9	0,95	0,69	23,0
38	45,03	12,9	17,4	0,36	0,22	26,4
39	55,87	17,2	20,7	0,42	0,24	53,9
40	47,61	19,4	27,1	0,38	0,23	35,1

**TABELA 15 - Parâmetros bioquímicos nos indivíduos do grupo controle.**

trabalhador	(concluído)					
	ALP (U/L)	AST (U/L)	ALT (U/L)	BT mg/dL	BI mg/dL	$\gamma$ -GT (U/L)
41	34,97	14,7	14,4	0,51	0,29	48,0
42	31,35	16,2	12,7	0,28	0,18	20,9
43	24,13	15,7	21,4	0,34	0,23	28,5
44	33,03	13,9	10,9	0,48	0,22	21,6
45	29,81	13,9	9,4	0,38	0,20	23,6
46	28,90	12,2	18,2	0,58	0,36	26,5
47	44,39	21,4	31,6	0,52	0,32	49,2
48	34,83	19,4	36,4	0,41	0,25	31,7
49	38,06	10,9	15,4	0,56	0,35	36,8
50	25,03	9,4	16,9	0,51	0,34	31,4
51	54,58	17,4	40,1	0,62	0,43	52,3

ALP = fosfatase alcalina

AST = aspartato aminotransferase

ALT = alanina aminotransferase

BT = bilirubina total

BI = bilirubina indireta

$\gamma$ -GT =  $\gamma$ -glutamil-transferase

Os resultados da significância estatística dos hábitos individuais e de trabalho nos valores dos parâmetros avaliados são mostrados na Tabela 16.



**TABELA 16 - Influência dos hábitos individuais e de trabalho sobre os parâmetros avaliados nos trabalhadores expostos (valores de p)**

parâmetros	uso de EPI	ingestão de bebida alcóolica	uso de tabaco
orto-cresol	0,2169	0,0854	0,3653
ácido hipúrico	0,4871	0,0229*	0,8541
ácidos biliares	0,2239	0,8294	0,6577
ALT	0,2640	0,8667	0,7762
AST	0,0547	0,3257	0,7002
BT	0,7848	0,8920	0,8083
$\gamma$ -GT	0,3942	0,1905	0,3171
ALP	0,0229*	0,4294	0,5811
creatinina	0,3169	0,6264	0,0750

\* diferença significativa para o teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

ALT = alanina aminotransferase

AST = aspartato aminotransferase

BT = bilirubina total

$\gamma$ -GT =  $\gamma$ -glutamyl-transferase

ALP = fosfatase alcalina

**TABELA 17 - Diferenças entre os grupos controle e exposto, quanto ao número de indivíduos com valores acima do limite superior do intervalo de referência para cada parâmetro analisado (teste do qui quadrado)**

parâmetros	n		p
	controle	exposto	
<b>ácidos biliares (µmol/L)</b>			
<8,0	44	31	0,0024
>8,0	07	26	
<b>AST (U/L)</b>			
<34	51	56	1,000
>34	0	01	
<b>ALT (U/L)</b>			
<36	49	55	0,6914
>36	02	02	
<b>γ-GT (U/L)</b>			
<43	43	42	0,6300
>43	08	15	
<b>ALP(U/L)</b>			
<43	45	38	0,0153
>43	06	19	
<b>BT (mg/mL)</b>			
<1,2	51	56	1,000
>1,2	0	01	

AST = aspartato aminotransferase

ALT = alanina aminotransferase

γ-GT = γ-glutamil-transferase

ALP = fosfatase alcalina

BT = bilirubina total

**TABELA 18 - Correlações entre os parâmetros analisados nos grupos exposto e controle (valores de p)** (continua)

parâmetros relacionados	grupo exposto	grupo controle
fosfatase alcalina		
x	0,020*	-
orto-cresol		
ácidos biliares		
x	0,069	0,841
bilirrubina total		
aspartato amino transferase		
x	0,034*	<0,001*
γ-glutamyl-transferase		
ácidos biliares		
x	0,01*	0,587
bilirrubina indireta		
bilirrubina total		
x	0,003*	0,255
γ-glutamyl-transferase		
alanina amino transferase		
x	<0,001*	<0,001*
γ-glutamyl-transfesase		

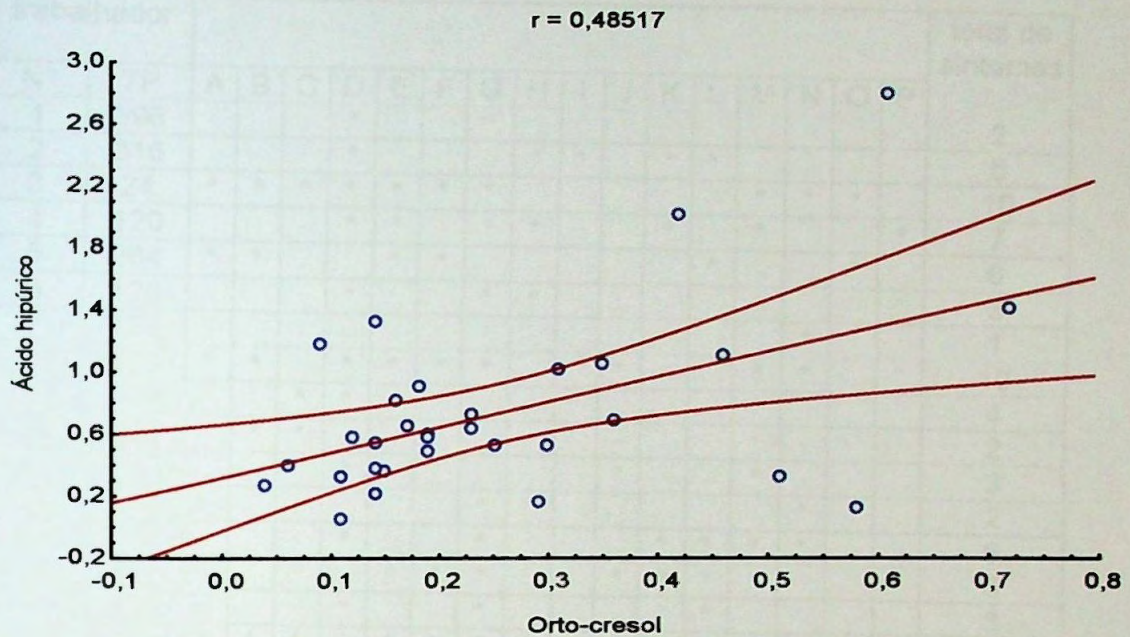
\* Correlação significativa (p<0,05)

**TABELA 18 - Correlações entre os parâmetros analisados nos grupos exposto e controle (valores de p)**

parâmetros relacionados	(concluído)	
	grupo exposto	grupo controle
ácido hipúrico		
x	0,004*	-
orto-cresol		
ácidos biliares		
x	0,400	0,302
ácido hipúrico		
ácidos biliares		
x	0,552	-
orto-cresol		
fosfatase alcalina		
x	0,351	0,013*
$\gamma$ -glutamil-transferase		
ácidos biliares		
x	0,522	0,055*
$\gamma$ -glutamil-transferase		
ácidos biliares		
x	0,420	0,007*
alanina aminotransferase		

\* Correlação significativa ( $p < 0,05$ )

A Figura 20 denota a correlação entre os valores de orto-cresol e de ácido hipúrico nas amostras dos trabalhadores expostos.



**FIGURA 20** - Correlação dos valores de orto-cresol (mg/L) e ácido hipúrico urinários (g/L), expressos pela creatinina, em trabalhadores do grupo exposto.

O quadro 1 mostra o número de queixas apresentadas pelos trabalhadores na análise do questionário.





**QUADRO 1 – Tempo de profissão em meses (TP), sintomas relatados (\*) e total de sintomas por pintor.**

(concluído)

trabalhador																Total de sintomas		
Nº	TP	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	
42	42	*	*		*				*					*				5
43	120	*	*	*	*			*			*		*	*	*			9
44	120				*			*	*			*	*				*	6
45	2				*													1
46	180				*			*				*		*			*	5
47	180	*			*	*				*	*	*			*		*	8
48	6		*		*	*		*	*	*		*	*					8
49	48	*		*				*				*			*			5
50	180	*		*	*			*	*			*				*		5
51	16	*	*		*		*				*	*			*		*	8
52	300			*	*			*			*	*	*	*	*		*	9
53	300	*	*			*		*			*	*	*		*	*	*	10
54	30							*			*	*						3
55	336	*	*	*	*	*	*			*	*		*					9
56	120				*	*												2
57	66	*	*		*		*											4

A-) Você tem dificuldades de se lembrar das coisas?

B-) Você tem memória curta?

C-) Você costuma escrever as coisas que tem que fazer?

D-) Você costuma voltar para conferir o que fez?

E-) Você tem dificuldades para entender o que está lendo?

F-) Você tem dificuldades para se concentrar em algo que está fazendo?

G-) Você fica nervoso ou irritado com muita facilidade?

H-) Você fica triste ou deprimido com certa frequência?

I-) Você se cansa muito fácil com pouco esforço físico?

J-) Você tem batadeira do coração sem fazer esforço?

K-) Você, as vezes sente o peito sufocado?

L-) Você transpira mesmo quando não está calor?

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

N-) Você costuma ter formigamento em alguma parte do corpo?

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

P-) Você tem insônia?

# DISCUSSÃO

---



## 6. DISCUSSÃO

Vários estudos mostram que no ambiente de trabalho a exposição dos trabalhadores ocorre a uma mistura complexa de vários solventes orgânicos, preferentemente a apenas um deles, o que pode acarretar efeitos tóxicos aditivos e/ou sinérgicos sobre determinado órgão (MAYAN et al., 1999). Na detecção precoce da hepatotoxicidade devida à exposição às substâncias químicas, vem sendo recomendada a determinação dos ácidos biliares (totais, livres ou conjugados) em diferentes fluidos biológicos (BATTA & SALEN, 1999; CHAUDHURY & CHAPLIN, 1999; KURAMOTO et al., 1990; MICHAEL & BOYER, 2003; RODA et al., 1998; RODRIGUES & SETCHELL, 1996; SACQUET et al., 1983; SAKAKURA et al., 1998; WAHLÉN et al., 1994).

Em oficinas de repintura de veículos, os pintores são expostos a múltiplos solventes que podem afetar a saúde destes trabalhadores. LEPERA (1996), em trabalho de avaliação da contaminação de ambientes de trabalho de repintura de veículos, relata que os solventes presentes nos diferentes tipos de tintas usadas são: tolueno e xilenos; etanol, iso e n-butanol; acetato de butila, etila e amila; metiletilcetona; éteres e acetatos butílico e metílico do etilenoglicol. Nas avaliações ambientais foi detectada a presença de tolueno, xilenos e etanol. O tolueno foi encontrado em 100% das amostras coletadas. Este autor também concluiu que os teores urinários de ácido hipúrico e metil hipúrico, corrigidos pela creatinina, em amostras coletadas no final da jornada de trabalho, mostraram correlações significativas com a exposição aos respectivos precursores e com a exposição ao conjunto de solventes, podendo ser considerados "traçadores" da exposição a solventes nas operações de repintura.

Assim, nesta pesquisa, os metabólitos do tolueno - orto-cresol e ácido hipúrico - foram escolhidos para a avaliação da exposição dos trabalhadores aos solventes usados. De fato, o ácido metil hipúrico (AMH) metabólito do xileno, também foi pesquisado em todas as amostras pelo mesmo método usado para o AH, que permite a detecção simultânea de AH e AMH; porém,

sua presença foi detectada em apenas 2 dos 57 voluntários do grupo exposto (LQ = 0,2 g/L), não sendo então considerado na avaliação dos trabalhadores.

O orto-cresol foi o primeiro indicador a ter seu método pesquisado e validado e foi selecionado por ser considerado mais específico que o ácido hipúrico na avaliação da exposição ao tolueno.

Os métodos utilizados para a extração do orto-cresol são baseados na destilação (ANGERER & KRÄMER, 1997), extração líquida-líquida (APOSTOLI et al., 1982) e extração em fase sólida (BIENIEK, 1996; AMORIM & ALVAREZ-LEITE, 1997).

Entretanto, várias tentativas foram feitas para a aplicação das técnicas de extração do analito descritas na literatura, não tendo sido conseguidos resultados adequados - mesmo após testes com diversos solventes, variações de pH e condições cromatográficas. Devido à pequena porcentagem de orto-cresol formado na biotransformação do tolueno, há necessidade de se usar métodos com baixos limites de detecção.

Vários trabalhos mostram que a SPME é uma técnica sensível e rápida sendo utilizada para a determinação de diversos analitos em diferentes matrizes (LEE et al., 1999; VAN DOORN et al., 1998).

Não foram encontrados na literatura trabalhos de métodos analíticos utilizando a SPME para a determinação de orto-cresol em urina. HUANG et al. (1997), relataram o uso de duas fibras de SPME para extração de derivados de benzeno (7 compostos), entre eles, do orto-cresol, em amostras de água.

Assim, na otimização da técnica foram feitos estudos de diversos parâmetros que podem afetar a extração: tipo e tempo de exposição da fibra, volume e agitação da amostra, adição de sal, variação de pH e tempo de dessorção no CG. A área do pico de orto-cresol foi o parâmetro usado na avaliação do desempenho destes testes.

Dentre as fibras avaliadas (carbowax divinilbenzeno-CW/DVB-polidimetilsiloxano e polidimetilsiloxano/divinilbenzeno), a CW/DVB foi a que apresentou melhores resultados para a extração de orto-cresol de urina.

VAN DOORN et al. (1998) testando três tipos de fibra para compostos ácidos em água, verificaram que a fibra de CW/DVB foi a que apresentou menor limite de detecção. HUANG et al. (1997), encontraram menor LD para o orto-cresol em água com a fibra de poliacrilato - PA - a qual não estava disponível para teste nesta pesquisa. Por outro lado, a CW/DVB não foi testada por aqueles autores.

Na determinação do melhor tempo de exposição da fibra, o de 20 minutos, com agitação, mostrou-se o mais satisfatório (Figura 8). O tempo de dessorção no CG foi estabelecido em 3 min (Figura 9). HUANG et al. (1997), propõem um tempo entre 3 e 5 minutos para a fibra de PA na dessorção de vários compostos, entre eles, o orto-cresol.

Um dos fatores que contribui para o aumento do rendimento da extração é a agitação da amostra. O rendimento aumentou em quatro vezes quando a exposição de fibra foi feita com agitação (Figura 10).

ARTHUR et al. (1992), evidenciaram o efeito da agitação na diminuição do tempo de equilíbrio e do limite de detecção, porém, após certo tempo, não há maior retenção dos analitos. Isto é devido à geometria do sistema. CHO et al. (2003) verificaram também a eficiência da agitação no rendimento da extração de triometanos em amostras de água, tendo obtido picos com áreas duas vezes maior na amostra agitada em relação à amostra mantida estática.

Outro parâmetro que afeta o rendimento da extração é o efeito "*salting out*", ou seja, da adição de sal. A extração do orto-cresol da urina com a adição 3,0 g de sulfato de sódio, foi 10 vezes maior que a extração sem esta adição. Porém, quantidades acima de 3,0 g não resultaram em aumento das áreas dos picos de orto-cresol (Figura 11).

A saturação da amostra com o sal foi um artefato usado por ARTHUR et al. (1992) para diminuir o limite de detecção na análise do benzeno, tolueno, n-hexano e xilenos de água. HUANG et al. (1997) verificaram um aumento de 4 vezes na concentração de orto-cresol em água ao usarem o  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . LEE et al. (1999) testaram 6 tipos de sais: o NaCl aumentou significativamente a eficiência na extração do acetato de etila, benzeno e 1-

butanol, enquanto o  $MgSO_4$  e o  $CaCl_2$ , apresentaram alta eficiência para o tolueno, acetato de butila e acetato de isoamila. Porém, algumas impurezas estavam presentes nestes sais o que resultou em picos interferentes no cromatograma. Na análise de triolometanos em água por *headspace*, a área do pico dobrou com a adição de NaCl (CHO et al., 2003).

Na Figura 12 pode ser constatado que o pH ideal para uso da fibra CW/DVB na extração do orto-cresol de urina foi o de 7,0. HUANG et al. (1997) verificaram que pH entre 2 e 7, para a fibra de PA, não alterou o rendimento da extração do orto-cresol de água; porém, um aumento do pH entre 9 e 12 diminuiu significativamente esta extração.

O orto-cresol encontra-se conjugado na urina com o sulfato e o ácido glicurônico (DOSSING et al., 1983; PIERCE et al., 1998). Estes conjugados devem ser quebrados antes da extração. Nesta pesquisa foram testados alguns ácidos e bases, sendo a hidrólise ácida a escolhida. Esta hidrólise é a mais preconizada na literatura. O ácido sulfúrico a  $100^\circ C/1h$  foi a condição usada por alguns autores (APOSTOLI et al., 1982; DE ROSA et al., 1987; NISE, 1992).

Porém, frente aos diversos picos interferentes observados no cromatograma ao testar este tipo de hidrólise, optou-se por realizar testes com outros ácidos. O ácido clorídrico foi o de escolha por sua eficiência em hidrolizar os conjugados e por resultar num cromatograma mais livre de picos interferentes. Este ácido foi também usado na hidrólise de cresóis diversos em urina, seguida de extração líquida-líquida (BALÍKOVÁ & KOHLICEK, 1989; BIENIEK, 1996; HASEGAWA et al., 1983).

Vários são os métodos utilizados para a identificação e quantificação do orto-cresol. Muitos deles utilizam técnicas cromatográficas em fase gasosa, com detector de ionização de chama (CG-DIC) (ALVAREZ-LEITE & AMORIM, 2000; ANDERSSON et al., 1983; BIENIEK, 1996; HASEGAWA et al., 1983; NISE, 1992; TRUCHON et al., 1999). Outros detectores são usados, como o espectrômetro de massa utilizado por APOSTOLI et al. (1982) e ANGERER (1985) para derivados de cresóis em urina.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de fluorescência, também foi usada na análise de orto-cresol urinário (DE ROSA et al., 1987; DOSSING et al., 1983). KAWAI et al. (1996) comparando métodos de identificação de orto-cresol - CG-DIC, CLAE-FL e CLAE-UV - verificaram que a CLAE-FL apresentava melhor separação dos compostos. Em análises por CLAE-UV e CG-DIC os picos foram muito próximos dificultando a quantificação do analito.

Os limites de detecção e de quantificação estabelecidos nesta pesquisa para o orto-cresol extraído por SPME de urina, de 0,1 mg/L, foram similar a outros descritos na literatura por diferentes métodos. Os LD reportados, independentemente da técnica de extração e de identificação utilizados, variam entre 0,05 e 0,26 mg/L (ANGERER & KRÄMER, 1997; BIENIEK, 1996; DOSSING et al., 1983) e entre 0,1 e 0,36 µmol/L (NISE, 1992; TRUCHON et al., 1999). Não foi possível detectar o orto-cresol em várias amostras do grupo exposto, como também em nenhuma do grupo não exposto (Tabelas 9 e 10).

Faixas mais estreitas de linearidade constituem uma das características da SPME, independente do analito ou tipo de matriz. Entretanto, considerando as baixas concentrações de orto-cresol presentes em urina, especialmente nas condições de trabalho atuais, este fato não chega a constituir uma desvantagem da técnica. Amostras com valores mais elevados de orto-cresol poderiam ser diluídas previamente à extração. Neste trabalho, a faixa linear foi verificada para concentrações entre 0,1 e 1,5 mg/L, com um coeficiente de determinação de 0,996. Nesta faixa é possível quantificar orto-cresol em amostras com valores baixos, próximos dos de referência citados na literatura (média de 0,3 mg/L), abaixo do limite biológico de exposição (1,0 mg/L) (ALVAREZ-LEITE, 2003), e um pouco acima dele, sendo portanto satisfatória para a maioria das situações de exposição ocupacional ao tolueno.

LEE et al. (1997) obtiveram uma faixa linear de 0,4 a 1,0 mg/L para a análise dos isômeros de cresóis em sangue por SPME, o que difere bastante das faixas lineares obtidas por outros autores que usaram a extração líquida-

líquida: de 0,2 a 10 mg/L (ANGERER & KRÄMER, 1997); entre 5 a 100 mg/L (BIENIEK, 1996) e entre 50 a 500 mg/L (LEE et al., 1999).

No estudo da precisão intra-ensaio para as concentrações de 0,1; 0,5 e 1,5 mg/L, os coeficientes de variação obtidos foram de 7,8; 7,1 e 6,8% respectivamente (Tabela 4) e, portanto, menores de 10% - valor mediano preconizado para análises de substâncias químicas em amostras biológicas. A precisão interensaio estudadas nas concentrações de 0,5; 1,0 e 1,5 mg/L com valores respectivamente de 21,9; 21,0 e 14,1% (Tabela 4) apresentaram valores aceitáveis para análises em material biológico (CHASIN et al., 1998).

Quanto à otimização das condições cromatográficas o melhor desempenho foi da coluna 35% fenil 65% polidimetilsiloxano, entre outras testadas: 100% polidimetilsiloxano e 10% fenil 90% polidimetilsiloxano. Nos testes para determinação do padrão interno, a *p*-nitroanilina foi a escolhida por resultar tempo de retenção não muito distante do orto-cresol, além de apresentar pico de boa resolução (Figura 13). Por outro lado, mostrou boa estabilidade em solução.

O tempo de coleta de amostras biológicas destinadas à biomonitorização requer cuidados e deve ser considerado o comportamento cinético do agente químico e de seus produtos de biotransformação (LISON, 1999). O final da jornada de trabalho é o período mais indicado para a coleta de amostras para análise de substâncias que são eliminadas rapidamente (ACGIH, 2001; BRASIL, 1994).

A coleta de urina foi realizada no final do último dia da semana de trabalho em frasco de polietileno, transportadas com resfriamento até o laboratório no mesmo dia e armazenadas em *freezer* a -20 °C para posterior análise, realizada até 45 dias após a coleta. Antes do congelamento foi retirada uma alíquota da urina para a verificação do pH, gravidade específica e quantificação da creatinina. O mesmo procedimento de coleta e armazenagem foi relatado por ALVAREZ-LEITE et al. (1994) ANGERER (1995), ANGERER & KRÄMER (1997), NISE (1992) e TRUCHON et al.

(1999) com ligeiras diferenças nas temperaturas de conservação das amostras.

No estudo publicado por BAELUM et al. (1987) sobre a meia-vida do orto-cresol na exposição ao tolueno, ficou demonstrado que o melhor período de coleta das amostras de urina é o final da jornada de trabalho.

O método cromatográfico otimizado para a análise do ácido hipúrico na urina apresentou limite de quantificação, repetibilidade e linearidade adequados e semelhantes ao método originalmente proposto e validado por SANTOS (2001). A análise de AH foi realizada até 15 dias após a coleta das amostras e sua conservação a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Na análise dos ácidos biliares, os métodos mais utilizados na sua separação e quantificação são os cromatográficos: em camada delgada (TONELLI et al., 1997), em fase gasosa (BATTA & SALEN, 1999; MARCHALL et al., 1994; RODA et al., 1998; SETCHELL & MATSUI, 1983) e líquida de alta eficiência (CHAUDHURY & CHAPLIN, 1999; RODA et al., 1998; SAKAKURA et al., 1998).

Porém, a análise dos ácidos biliares totais pode ser realizada por métodos enzimáticos espectrofotométricos, com resultados satisfatórios.

A técnica enzimática converte os ácidos biliares totais, através da enzima  $3\alpha$ -hidroxiesteroide desidrogenase, em ácido 3-oxo, e concomitantemente reduz  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$ . A determinação é feita em espectrofotômetro (UV) ou fluorímetro. Apesar de ser um método confiável, esta técnica não é ideal para a rotina laboratorial devido ao grande volume de soro necessário para a análise, equipamentos sofisticados e maior tempo na extração (colunas ou solventes).

MASHIGE et al. (1981) propuseram um método espectrofotométrico enzimático que não necessita de extração prévia dos ácidos biliares ou equipamentos especiais apresentando sensibilidade satisfatória para análise dos ácidos biliares totais no soro.

O método é baseado na capacidade da lactato desidrogenase (LDH), ou outras desidrogenases, de reduzir  $\text{NAD}^+$  em  $\text{NADH}$ , na presença de um substrato específico. A atividade da LDH é inibida pela ação do piruvato de

sódio. Os ácidos biliares são convertidos a ácido 3-oxo pela 3 $\alpha$ -hidroxiesteroide desidrogenase (3 $\alpha$ -HSD) com redução de NAD<sup>+</sup> a NADH. O hidrogênio é transferido, com a catálise da diaforase, para o sal de nitrotetrazolium formando diaformazam que é medido espectrofotometricamente em 540 nm (MASHIGE et al., 1981).

Os dados obtidos do estudo da linearidade mostram que há correlação linear entre as concentrações de 1,0 a 5,0  $\mu\text{mol/L}$  e entre 5,0 e 200  $\mu\text{mol/L}$ , com coeficientes de determinação de 0,99, estando satisfatória para aplicação em amostras de soro de não expostos e expostos a solventes, assim como para outras aplicações de interesse clínico. Os valores obtidos nas populações estudadas nesta pesquisa variaram entre 1,0 e 30,9  $\mu\text{mol/L}$  (Tabelas 9 e 10).

No estudo da precisão intra-ensaio, em amostras reais, nas concentrações de 7,8; 36,2; e 140,6  $\mu\text{mol/L}$ , os coeficientes de variação obtidos foram de 7,7; 3,7 e 1,2%, portanto satisfatórios. A reprodutibilidade, avaliada por análises dia-após-dia durante 7 dias, de amostras adicionadas de ácidos biliares, mostram variações nos resultados maiores que as da repetibilidade do método, fato comum na maioria dos estudos descritos para analitos diversos em material biológico.

Os limites de detecção e quantificação, de 0,5 e 1,0  $\mu\text{mol/L}$ , respectivamente, denotam a sensibilidade e a adequação do método para o objetivo proposto.

Foram analisadas amostras de 57 trabalhadores de 21 oficinas de repintura, 14 da cidade de Alfenas e 7 de Cambuí, ambas do estado de Minas Gerais. A comparação dos valores de orto-cresol e de ácido hipúrico com a concentração de tolueno no ambiente permitiria uma discussão mais completa sobre a intensidade da exposição ocupacional, o que não foi possível realizar.

O valor médio de orto-cresol no grupo exposto foi de 0,34 mg/L (0,26 mg/g creatinina), com desvio padrão de  $\pm 0,17$ , sendo que nenhum deles mostrou resultado acima do limite biológico de 1,0 mg/L - o mais elevado foi de 0,95 mg/L; em 45% deles não foi possível quantificar o orto-cresol



(Tabela 9). Nenhum dos voluntários do grupo controle mostrou valores superiores ao LQ do método, de 0,1 mg/L. Também para o ácido hipúrico urinário, os resultados foram bastante baixos e nenhum indivíduo exposto teve valores acima do IBMP no País, de 2,5 g/g creatinina (BRASIL, 1994).

Estes dados indicam que a exposição dos trabalhadores ao tolueno era baixa, o mesmo provavelmente acontecendo quanto aos demais solventes presentes nos materiais usados na atividade de repintura. O valor médio de AH do grupo controle (0,31g/g creatinina) foi superior ao estabelecido em outro estudo realizado em 1999, na mesma região, de 0,18 g/g creatinina (SIQUEIRA & PAIVA, 2002).

A baixa absorção do tolueno talvez possa ser imputada ao processo da pintura acontecer em ambientes abertos, o que leva a maior dispersão dos vapores na atmosfera. Por outro lado, a maioria dos trabalhadores (63%) usavam máscaras protetoras durante a operação de repintura, que, mesmo não sendo a mais adequada, diminui a inalação dos vapores de solventes. Também pode ter havido interação ao nível de biotransformação hepática dos vários solventes que utilizam as mesmas enzimas microssômicas, afetando a excreção de seus metabólitos, fato bem documentado na literatura. A CYP2E1 que biotransforma o tolueno, também é responsável pela biotransformação do benzeno, etanol, xileno, hexano, clorofórmio e tricloroetileno (LISON, 1999). INOUE et al. (1988) verificaram a inibição mútua entre tolueno e benzeno, reduzindo as concentrações de orto-cresol e AH, fenol e quinol na urina.

O uso de equipamento de proteção individual por parte dos trabalhadores não afetou significativamente os resultados quando comparados com os trabalhadores que não o utilizavam (teste de Mann-Whitney), o que poderia ser atribuído ao uso de máscaras não apropriadas para a retenção de solventes.

O hábito de fumar também não afetou significativamente os valores de orto-cresol e ácido hipúrico, tanto nos indivíduos do grupo controle quanto nos trabalhadores expostos ao tolueno, o que difere dos resultados encontrados por NISE (1992) que relatou diferença significativa de orto-

cresol entre fumantes e não fumantes, expostos a solventes. A influência do tabaco na excreção de orto-cresol em trabalhadores expostos ao tolueno também foi relatada por DOSSING et al. (1983). Talvez isto se deva às diferenças na quantidade de cigarros consumida, modo de uso do tabaco, assim como diferentes valores de tolueno e de orto-cresol na fumaça. É pertinente lembrar que os trabalhadores geralmente consomem poucos cigarros durante a jornada de trabalho.

O uso de bebidas alcoólicas também não apresentou alterações significativas nos valores de orto-cresol. Porém, mostrou afetar os valores de ácido hipúrico (Tabela 16). NISE (1992), verificou diferença nos valores de AH em indivíduos que consumiam bebidas alcoólicas com relação aos que não o faziam.

Foi verificada correlação significativa entre os valores urinários de orto-cresol e ácido hipúrico ( $r= 0,49$ ;  $p<0,01$ ). HASEGAWA et al. (1983) também verificaram correlação entre a excreção de OC e AH em trabalhadores expostos ao tolueno.

Apesar da baixa absorção de tolueno, o grupo exposto apresentou diferenças significativas nos teores de ácido hipúrico na urina e de ácidos biliares no soro em relação ao grupo controle (teste t de Student), mostrando a sensibilidade destes indicadores.

A aplicação do questionário sobre os hábitos pessoais e sobre a saúde dos trabalhadores, é um procedimento freqüentemente relatado quando se avaliam os efeitos da exposição ocupacional a solventes. O quadro 1 relata as respostas obtidas do questionário (Anexo 1).

Apesar dos baixos valores encontrados para os bioindicadores da exposição ao tolueno, 72% dos trabalhadores apresentaram 3 ou mais diferentes tipos de queixa quanto ao seu estado de saúde.

O valor médio  $\pm$  desvio padrão de ácidos biliares no grupo exposto foi de  $10,34 \pm 6,73 \mu\text{mol/L}$ , sendo que 45,6% dos trabalhadores apresentaram valores acima do valor superior do intervalo de referência deste parâmetro, de  $8,0 \mu\text{mol/L}$ . No estudo realizado por FRANCO et al. (1986) o parâmetro

bioquímico mais alterado na população exposta foi também os ácidos biliares (em 73% da população).

A fosfatase alcalina foi o segundo parâmetro bioquímico alterado em maior número de trabalhadores (33,3%). O menos alterado foi a bilirrubina total (1,75%), resultado similar ao reportado por FRANCO et al. (1986).

Dos parâmetros analisados apenas a bilirrubina total apresentou distribuição gaussiana ( $W = 0,975$  e  $p = 0,092$ ), que foi o parâmetro menos alterado na população exposta. Apesar de ter sido um dos parâmetros bioquímicos mais alterados a fosfatase alcalina não apresentou distribuição gaussiana ( $W = 0,9454$  e  $p = 0,0219$ ).

Dos parâmetros bioquímicos rotineiramente usados na avaliação da função hepática, a fosfatase alcalina e a bilirrubina total apresentaram diferenças significativas entre os dois grupos, diferindo do resultado obtido por LIU et al. (1996) que não observaram diferença para a fosfatase alcalina mas sim para a  $\gamma$ -GT. KURPPA & HUSMAN (1982) encontraram valores semelhantes para os testes clássicos de função hepática nos grupos exposto a solventes e no controle, e concluíram que estes testes não devem ser utilizados para avaliação precoce da hepatotoxicidade por solventes.

FRANCO et al. (1986 e 1989) demonstraram um possível efeito hepatotóxico causado por solventes orgânicos e detectado por aumento dos valores séricos dos ácidos biliares, enquanto os valores plasmáticos das enzimas hepáticas permaneceram inalterados.

O consumo de álcool, de tabaco e o uso de máscara protetora pelos trabalhadores do grupo exposto não mostraram influenciar os valores dos ácidos biliares totais no soro. Porém, CHEN et al. (1991) demonstraram que o consumo de etanol altera as concentrações dos ácidos biliares. Provavelmente estas diferenças se devem aos diferentes volumes e tipos de bebidas ingeridas pelos voluntários, assim como diferentes frequência e tempos de uso da bebida.

Neste estudo foi detectada correlação significativa entre os valores de ácidos biliares e as atividades da  $\gamma$ -GT e da ALT, como também entre a  $\gamma$ -GT

e a AST e a ALT, nos 2 grupos avaliados. No grupo exposto, também foi notada correlação significativa entre  $\gamma$ -GT e bilirubina total (Tabela 18).

Enfim, dos parâmetros bioquímicos avaliados, o que parece ter maior sensibilidade na detecção do dano hepático é os ácidos biliares totais no soro (maior significância estatística da diferença entre o grupo exposto e controle pelo teste do qui quadrado ( $p = 3,1 \times 10^{-6}$ ), seguido pela bilirubina total ( $p < 8,2 \times 10^{-5}$ ) e a fosfatase alcalina ( $p < 7,8 \times 10^{-4}$ ). Estes resultados são indicativos de que os ácidos biliares totais podem se constituir num valioso marcador da hepatotoxicidade a ser melhor explorado para aplicação em atividades de Vigilância da Saúde de trabalhadores expostos a agentes químicos hepatotóxicos.

# CONCLUSÕES

## 7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados experimentais deste trabalho é possível concluir que:

- O método proposto para a análise de orto-cresol urinário utilizando a microextração em fase sólida mostrou linearidade, limites de detecção e de quantificação, recuperação e repetibilidade e reprodutibilidade adequados para o seu emprego na avaliação da exposição de trabalhadores ao tolueno.
- O método cromatográfico em fase gasosa e extração com acetato de etila utilizado para a determinação do ácido hipúrico em urina mostrou-se adequado para a biomonitorização de trabalhadores expostos ao tolueno, assim como para detectar este metabólito na população não exposta ocupacionalmente a este solvente.
- O método espectrofotométrico enzimático otimizado para a análise de ácidos biliares em soro mostrou condições satisfatórias para emprego na avaliação deste biomarcador, tanto em expostos quanto nos não expostos ocupacionalmente aos solventes.
- Os ácidos biliares se mostraram aumentados em maior número de trabalhadores expostos a solventes em oficinas de repintura de veículos, com relação aos parâmetros bioquímicos clássicos de hepatopatia.
- Foi verificada correlação significativa entre os ácidos biliares no soro e a atividade da  $\gamma$ -glutamyl-transferase e da aspartato aminotransferase nos trabalhadores expostos a solventes. Estas correlações não foram encontradas entre os ácidos biliares e os indicadores de dose interna da exposição ao tolueno, orto-cresol e ácido hipúrico urinários.

- O uso de bebidas alcoólicas afetou os valores de ácido hipúrico urinário, porém, não alterou significativamente outros bioindicadores como o ortocresol urinário e os ácidos biliares no soro. O uso de tabaco não afetou significativamente qualquer um dos parâmetros estudados.
- A maior significância de diferenças de parâmetros bioquímicos de função hepática entre os grupos controle e exposto foi verificada nos valores de ácidos biliares em soro, o que é indicativo de seu valor na detecção precoce de danos hepáticos provocados por solventes orgânicos.

# **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-REHIM, M.; BIELENSTEIN, M.; ARVIDSSON, T. Evaluation of solid-phase microextraction in combination with gas chromatography (SPME-GC) as a tool for quantitative bioanalysis. *J. Microcolumn Separations*, New York, v. 12, n. 5, p. 308-315, 2000.
- AITIO, A.; KALLIO, A. Exposure and effect monitoring: a critical appraisal of their practical application. *Toxicol. Lett*, Amsterdam, v. 108, p. 137-147, 1999.
- ALVAREZ-LEITE, E.M. Solventes orgânicos. In: OGA. S. *Fundamentos de Toxicologia*. 2.ed. São Paulo: Ateneu Editora, 2003. p.175-216.
- ALVAREZ-LEITE, E.M.; AMORIM, L.C.A. Comparação dos valores de orto-cresol e ácido hipúrico na urina de trabalhadores, expostos ao tolueno. *Rev. Bras. Saúde Ocup.*, São Paulo, v. 25, p. 45-57, 2000.
- ALVAREZ-LEITE, E.M.; FRANÇA, L.S.; MONTEIRO, R.B.; CIOLETTI, A.G.; BARROCA, M.M. Determination of urinary hippuric acid by gas-chromatography after derivatization with trimethylphenylammonium hydroxide. *Toxirama*, Paris, v. 6, n. 3, p. 3-6, 1994.
- AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNAMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS. *Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices*. Biological exposures indices. Cincinnati, ACGIH, 1996.
- AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNAMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS. *Threshold Limit Values and Biological Exposure Indices*. Biological exposures indices. Cincinnati, ACGIH, 2001.
- AMORIM, L. C. A.; ALVAREZ-LEITE, E. M. Determination of o- cresol by gas chromatography and comparison with hippuric acid levels in urine samples of individuals exposed to toluene. *J. Toxicol. Environm. Health*, v. 50, p. 401-408, 1997.
- ANDERSSON, R.; CARLSSON, A.; NORDQVIST, M.B.; SOLLENBERG, J. Urinary excretion of hippuric acid and o-cresol after laboratory exposure of humans to toluene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v. 53, p. 101-108, 1983.

- ANGERER, J. Occupational chronic exposure to organic solvents. VII. Metabolism of toluene in man. *Int. Arch. Occup. Environm. Health*, Berlin, v. 43, p. 63-67, 1979.
- ANGERER, J. Occupational chronic exposure to organic solvents. XII. O-cresol excretion after toluene exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v. 56, p. 323-328, 1985.
- ANGERER, J.; KRÄMER, A. Occupational chronic exposure to organic solvents XVI. Ambient and biological monitoring of workers exposed to toluene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v. 69, p. 91-96, 1997.
- ANUÁRIO DA INDÚSTRIA QUÍMICA BRASILEIRA. São Paulo: ABIQUIM – Associação Brasileira da Indústria Química, v. 29, 2002. 308p.
- APOSTOLI, P.; BRUGNONE, F.; PERBELLINI, L.; COCCEO, V.; BELLOMO, M.L.; SILVESTRI, R. Biomonitoring of occupational toluene exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v. 50, p.153-168, 1982.
- ARTHUR, C.L.; KILLAM, L.M.; BUCHHOLZ, K.D.; PAWLISZYN, J. Automation and optimization of solid-phase microextraction. *Anal. Chem.*, Washington, v. 64, p.1960-1966, 1992.
- ARTHUR, C.L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.*, Washington, v. 62, p. 2145-2148, 1990.
- BAELUM, J.; DOSSING, M.; HANSEN, S.H.; LUNDQVIST,G.R.; ANDERSEN, N.T. Toluene metabolism during exposure to varying concentrations combined with exercises. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v. 59, p. 281-294, 1987.
- BAELUM, J.; MOLHAVE, L.; HANSEN, S.H.; VAETH, M. Metabolic interaction between toluene, trichloroethylene and n-hexane in humans. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, v. 24, p. 30-37, 1998.
- BAI, C.; CANFIELD, P.J.; SATACEY, N.H. Individual serum bile acids as early indicators of carbon tetrachlorid- and chloroform-induced liver injury. *Toxicology*, Amsterdam, v. 75, p. 221-234, 1992.

- BAKER, L.E. Review of recent research on health effects of human occupational exposure to organic solvents. *J. Occup. Med.*, Chicago, v. 10, p. 1079-1092, 1994.
- BALÍKOVÁ, M.; KOHLICEK, J. Gas chromatography of simple phenols in biological fluids. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 497, p. 159-167, 1989.
- BATTA, A.K.; SALEN, G. Gas-cromatography of bile acids. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 723, p. 1-16, 1999.
- BERGERET, K; NESTLER, K. Solvent uptake in relation to physical activity. *Sci. Total Environ.*, Amsterdam, v. 101, p. 11-115, 1991.
- BIENIEK, G. Simultaneous determination of phenol, cresol, xylenol isomers and naphthols in urine by capillary gas chromatography. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 682, p. 167-172, 1996.
- BOSCH, X.; CAMPISTOL, J.; MONTOLIU, J.; CERVANTES, F.; REVERT, L. Toluene associated with mielofibrosis. *Blut*, Berlin, v. 58, p. 219-220, 1989.
- BRASIL. Ministério do trabalho. Secretaria de relações do trabalho *Segurança e Medicina do Trabalho: Portaria n. 24, de 29 de dez. 1994. Diário Oficial*, Brasília, 30 de dez. 1994. Seção 1, p. 21278-21279.
- BRASIL. Ministério do trabalho. Secretaria de Segurança e Higiene e Medicina do Trabalho *Segurança e Medicina do Trabalho: Lei n. 6514, de 22 de dezembro de 1977, Normas Regulamentadoras (NR) aprovadas pela portaria 3214. de 8 de junho de 1978. 18 ed. São Paulo: Atlas, 1990. NR-15: Atividades insalubres. p.94-189.*
- CAPEROS, J.R.; FERNANDEZ, J.G. Simultaneous determination of toluene and xylene metabolites in urine by gas-chromatography. *Br. J. Industr. Med.*, London, v. 34, p. 229-233, 1977.
- CHASIN, A.A.M.; NASCIMENTO, E.S.; RIBEIRO-NETO, L.M.; SIQUEIRA, M.E.P.B.; ANDRAUS, M.H.; SALVATORI, M.C.; FERNICOLA, N.A.G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos em análise: uma

- abordagem geral. *Rev. Bras. Toxicol.*, São Paulo, v. 11, n. 1, p. 1-6, 1998.
- CHAUDHURY, S.; CHAPLIN, M.F. Determination of bile acids in human faecal samples using supercritical fluid extraction and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 726, p. 71-78, 1999.
- CHEN, J.; PAWLISZYN, J.B. Solid phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. *Anal. Chem.*, Washington, v. 67, p. 2530-2533, 1995.
- CHEN, J.D.; WANG, J.D.; JANG, J.P.; CHEN, Y.Y. Exposure to mixture of solvents among paint workers and biochemical alterations of liver function. *Br. J. Ind. Med.*, London, v. 48, p. 696-701, 1991.
- CHERNECKY, C.C.; KRECH, R.L.; BERGER, B.J. *Métodos de laboratórios-Procedimentos diagnóstico*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. 613p.
- CHO, D.; KONG, S.; OH, S. Analysis of trihalomethanes in drinking water using headspace-SPME technique with gas chromatography. *Water Research*, New York, v. 37, p. 402-408, 2003.
- COHR, K.H.; STOKHOLM, J. Toluene: a toxicologic review. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, v. 5, p. 71-90, 1979.
- DE ROSA, E.; BARTOLUCCI, G.B.; SIGON, M.; CALLEGARO, R.; PERBELLINI, L.; BRUGNONE, F. Hippuric acid and o-cresol as biological indicators of occupational exposure to toluene. *Am. J. Ind. Med.*, New York, v. 11, p. 529-537, 1987.
- DOSSING, M.; BAELUM, J.; HANSEN, S.H.; LUNDQVIST, G.R.; ANDERSEN, N.T. Urinary hippuric acid and orthocresol excretion in man during experimental exposure to toluene. *Br. J. Ind. Med.*, London, v. 40, p. 470-473, 1983.
- DRISCOLL, T. R.; HAMDAN, H. H.; WANG, G.; WRIGHT, P. F.; STACEY, N. H. Concentration of individual serum or plasma bile acids in workers exposed to chlorinated aliphatic hydrocarbons. *Br. J. Industr. Med.*, London, v. 25, p. 15-27, 1995.

- ESCALONA, E.; YANES, L.; FEO, O. Neurobehavioral evaluation of venezuelan workers exposed to organic solvent mixtures. *Am. J. Ind. Med.*, New York, v. 25, p.15-27, 1995.
- FINI, A.; FEROCI, G.; RODA, A. Acidity in bile acid systems. *Polyedron*, Oxford, v. 21, p. 1421-1427, 2002.
- FRANCO, G.; FONTE, R.; TEMPINI, G.; CANDURA, F. Serum bile acid concentrations as a liver function test in workers occupationally exposed to organic solvents. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v. 58, p. 157-164, 1986.
- FRANCO, G.; SANTAGOSTINO, G.; LORENA, M.; IMBRIANI, M. Conjugated serum bile acid concentrations in workers exposed to low doses of toluene and xylene. *Br. J. Ind. Med.*, London, v. 46, p. 141-142, 1989.
- GOBBA, F.; GHITTORI, S.; IMBRIANI, M.; MAESTRI, L.; CAPODAGLIO, E.; CAVALLERI, A. The urinary excretion of solvents and gases for the exposure biological monitoring of occupational exposure: a review. *Sci. Total Environ.*, Amsterdam, v. 199, p. 3-12, 1997.
- GONZÁLEZ-TOLEDO, E.; PRAT, M. D.; ALPENDURADA, M. F. Solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography for the analysis of phenolics compounds in water. *J. Chromatogr. A*, New York, v. 923, p. 45-52, 2001.
- GREENBERG, M.M. The central nervous system and exposure to toluene: A risk characterization. *Environ. Res.*, New York, v. 72, p. 1-7, 1997.
- GROSELL, M.; O'DONNELL, M.J.; WOOD, M. Hepatic versus gallbladder bile composition: in vivo transport physiology of the gallbladder in rainbow trout. *Am. J. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, v. 278, p. R1674-R1684, 2000.
- HASEGAWA, K.; SHIOJIMA, S.; KOIZUMI, A.; IKEDA, M. Hippuric acid and O-cresol in the urine of workers exposed to toluene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v. 52, p. 197-208, 1983.
- HOOK, G.L.; KIMM, G.L.; HALL, T.; SMITH, P.A. Solid-phase microextraction (SPME) for rapid field sampling and analysis by gas

- chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *Trends in Analytical chemistry*, v. 21, p. 534-543, 2002.
- HUANG, S.; CHENG, C.; SUNG, Y. Determination of benzene derivatives water by solid-phase microextraction. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v. 343, p. 101-108, 1997.
- IARC – International Agency for Research in Cancer. *Biological monitoring of exposure to benzene, toluene and xylene*. Lyon:IARC, v.47, 1988.
- IARC - . International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. *Tobacco smoking*. Lyon: IARC, v. 38, 1986.
- IKEDA, M. Complex exposures: potentials for assessing integrated exposures. *Clin. Chem.*, New York, v. 40, n. 7, p. 1444-1447, 1994.
- IKEDA, M. Exposure to complex mixtures: implications for biological monitoring. *Toxicol. Let.*, Amsterdam, v. 77, n. 85-91, 1995.
- IKEDA, M. Solvents in urine as exposure markers. *Toxicol. Let.*, Amsterdam, v. 108, p. 99-106, 1999
- INOUE, O.; KANNO, E.; KUDO, S.; KAKIZAKI, M.; KATAOKA, M.; KAWAI, T.; UKAI, H.; IKEDA, M. High-pressure liquid chromatographic determination of toluene in urine as a marker of occupational exposure to toluene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v. 71, p. 302-308, 1998.
- JANG, J.; KANG, S.; WATANABE, T. Biological exposure indices of organic solvents for Korean workers. *Int. Arch. Occup. Environm. Health*, Berlin, v. 65, p. S219-S222, 1993.
- JUNTING, L., PENG, C., SUZUKI, O. Solid-phase microextraction (SPME) of drugs and poisons from biological samples. *Forens. Sci. Int.*, Lausanne, v. 97, p. 93-100, 1998.
- KAWAI, T.; MIZUNUMA, K.; OKADA, Y.; HORIGUSHI, S.; IKEDA, M. Toluene itself as the best urinary marker of toluene exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v. 68, p. 289-297, 1996.
- KROGH, M.; JOHANSEN, K.; TONNESEN, F.; RAMUSSEN, K.E. Solid-phase microextraction for the determination of the free concentration

- of valproic acid in human plasma by capillary gas chromatography. *J. Chrom. B. Biomed. Appl.*, Amsterdam, v. 673, p. 299-305, 1995.
- KUKONGVIRIYAPAN, V.; KUKONGVIRIYAPAN, U.; STACEY, N.H. Interference with hepatocellular substrate uptake by 1,1,1-trichloroethane and trichloroethylene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, New York, v. 102, p. 80-90, 1990.
- KURAMOTO, T.; FURUKAWA, Y.; NISHINA, T.; SUGIMOTO, T.; MAHARA, R.; TOHMA, M.; KIHIRA, K.; HOSHITA, Y. Identification of short side chain bile acids in urine of patients with cerebrotendinous xanthomatosis. *J. Lipid Research*, Bethesda, v. 31, p. 1895-1902, 1990.
- KURPPA, K.; HUSMAN, K. Car painters' exposures to a mixture of organic solvents. *Scand. J. Work Environm. Health*, Helsinki, v. 8, p. 137-140, 1982.
- LEE, X.; KUMAZAWA, T.; FURUTA, S.; KUROSAWA, T.; AKIYA, K.; AKIYA, I.; SATO, K. Detection of isomers an phenol in human whole blood by headspace solid-phase micro extraction (SPME) and capillary gas chromatography. *Jpn. J. Forens. Toxicol.*, Tokyo, v. 15, p. 21-28, 1997.
- LEE, X.; KUMAZAWA, T.; KONDO, K.; FURUTA, S.; SATO, K. Improved extraction of thinner components from human body fluids by headspace solid-phase microextraction with a carboxen/polydimethylsiloxane-coated fiber. *Legal Med.*, Salem, v. 1, p. 231-237, 1999.
- LEPERA, J. S. Avaliação da exposição ocupacional a solventes e a material particulado em procedimento de repintura automotiva. São Paulo, 1996. 117p. (Tese de doutorado – Faculdade de Saúde Pública – USP).
- LISON, D. Importance of biotransformation pathways for interpreting biological monitoring of exposure. *Toxicol. Let.*, Amsterdam, v. 108, p. 91-97, 1999.

- LIU, J.J.Y.; BAI, C.; WILLIAMSON, A.M.; QU, S.X.; HAMDAN, H.; STACEY, N.H. Individual serum bile acids in apprentice spray painters in association with solvent exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v. 69, p. 21-26, 1996.
- LOF, A.; JOHANSON, G. Toxicokinetics of organic solvents: A review of modifying. *Critical Reviews Factors in Toxicology*, v. 28, p. 571-650, 1998.
- LOUCH, D.; MOTLAGH, S.; PAWLISZYN, J. Dynamics of organic compound extraction from water using liquid-coated fused silica fiber. *Anal. Chem.*, Washington, v. 64, p. 1187-1199, 1992.
- MARCHALL, H. U.; GRIFFITHS, W. J.; GÖTZE, U.; WIETHOLTZ, H.; BUSCH, N.; SJÖVALL, J.; MATERN, S. The major metabolites of ursodeoxycholic acid in human urine are conjugated with N-acetylglucosamine. *Hepatology*, Bethesda, v. 20, p. 845-853, 1994.
- MARTOS, P. A.; PAWLISZYN, J. Calibration of solid phase microextraction for air analyses based on physical chemical properties of the coating. *Anal. Chem.*, Washington, v. 69, p. 206-215, 1997.
- MASHIGE, F.; TANAKA, N.; MAKI, A.; KAMEI, S.; YAMANAKA, M. Direct spectrophotometry of total bile acids in serum. *Clin. Chem.*, Washington, v. 27, n. 8, p. 1352-1356, 1981.
- MAYAN, O.; PIRES, A.; NEVES, P.; CAPELA, F. Shoes manufacturing and solvent exposure in northern Portugal. *Appl. Occup. Environ. Hyg.*, New York, v. 14, p. 785-790, 1999.
- MICHAEL, T.; BOYER, J. L. Bile salts transporters: molecular characterization, function, and regulation. *Physiol. Rev.*, Bethesda, v. 83, p. 633-671, 2003.
- MILLS, G. A.; WALKER, V. Headspace solid-phase microextraction profiling of volatile compounds in urine: application to metabolic investigations. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 753, p. 259-268, 2001.
-



- MILLS, G. A.; WALKER, V. Headspace solid-phase microextraction procedures for gas chromatographic analysis of biological fluids and materials. *J. Chromatogr. A*, New York, v. 902, p. 267-287, 2000.
- MOSS, D.W.; HENDERSON, A.R. Clinical enzymology. In: BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. *Tietz textbook of clinical chemistry*. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 1999. cap. 22, p.617-721.
- NEGHAB, M.; STACEY, N.H. In vitro interference with hepatocellular uptake of bile acids by xylene. *Toxicology*, Amsterdam, v. 120, p. 1-10, 1997.
- NISE, G. Urinary excretion of O-cresol and hippuric acid after toluene exposure in rotogravure printing. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v. 63, p. 377-381, 1992.
- NISE, G.; ORBAEK, P. Toluene in venous blood during and after work in rotogravure printing. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v. 60, p. 31-35, 1988.
- PAWLISZYN, J. Theory of solid-phase microextraction. *J. Chromatogr. Sci.*, Niles, v. 38, p. 270-278, 2000.
- PIERCE, C.H.; DILLS, R.L.; MORGAN, M.S.; VICINI, P.; KALMAN, D.A. Biological monitoring of controlled toluene exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v. 71, p. 433-444, 1998.
- RODA, A.; PIAZZA, F.; BARALDINI, M. Separation techniques for bile salts analysis. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 717, p. 263-278, 1998.
- RODRIGUES, C.M.P.; SETCHELL, K.D.R. Performance characteristics of reversed-phase bonded silica cartridges for serum bile acid extraction. *Biomed. Chromatogr.*, London, v. 10, p. 1-5, 1996.
- SACHER, R.A.; McPEARSON, R.A. *Interpretação clínica dos exames laboratoriais*. 11.ed. Barueri: Manole, 2002. p. 533-559.
- SAITO, K.; WADA, H. Behavioral approaches to toluene intoxication. *Environ. Res.*, New York, v. 62, p. 53-62, 1993.
- SAKAKURA, H.; KIMURA, N.; TEKEDA, H.; KOMATSU, H.; ISHIZAKI, K.; NAGATA, S. Simultaneous determination of bile acids in rat liver

- tissue by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 718, p. 33-40, 1998.
- SANTOS, A. F. Determinação simultânea dos ácidos hipúrico e metil hipúrico urinários por cromatografia em fase gasosa visando a biomonitorização de trabalhadores expostos ao tolueno e ao xileno. São Paulo, 2001, 111p. (Tese de mestrado- Faculdade de Ciências Farmacêuticas – USP).
- SAQUET, E.; PARQUET, M.; RIOTTOT, M.; RAIZMAN, A.; JARRIGE, P.; HUGUET, C.; INFANTE, R. Intestinal absorption, excretion and biotransformation of hyodeoxycholic acid in man. *J. Lipid Res.*, Bethesda, v. 24, p. 604-613, 1983.
- SARAULLO, A.; MARTOS, P. A.; PAWLISZYN, J. Water analysis by solid phase microextraction based on physical chemical properties of the coating. *Anal. Chem.*, Washington, v. 69, p. 1992-1998, 1997.
- SAS<sup>®</sup>Software, versão 6.11, SAS Institute, Inc., Cary NC, 1996. STATISTICA for Windows, StatSoft, Inc., Tulsa OK, 1999.
- SETCHELL, K.D.R.; LAWSON, A.M.; TANIDA, N.; SJÖVALL, J. Analysis of bile acids in feces. *J. Lipid Res.*, Bethesda, v. 24, p. 1085-1100, 1983.
- SETCHELL, K.D.R.; MATSUI, A. Serum bile acid analysis. *Clin. Chim. Acta*, Amsterdam, v. 127, p. 1-17, 1983.
- SIQUEIRA, M.E.P.B., PAIVA, M.J.N. Hippuric acids in urine: reference values. *Rev. Saúde Pública*, São Paulo, v. 36, n. 6, p. 723-727, 2002.
- THEODORIDIS, G.; KOSTER, E.H.M.; JONG, G.J. Solid-phase microextraction for the analysis of biological samples. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 745, p. 49-82, 2000.
- TOLMAN, K.G.; REJ, R. Liver function. In: BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R. *Textbook of clinical chemistry*. 3.ed. Philadelphia: Saunders, 1999. cap. 33, p. 1125-1177.
- TONELLI, D.; GRAVATTAVECCHIA, E.; MAZZELLA, G.; RODA, A. Bile acid kinetics in man studied by radio thin-layer chromatography and

- densitometry coupling. *J. Chromatogr. B*, Amsterdam, v. 700, p. 59-66, 1997.
- TRAUNER, M.; BOYER, J. L. Bile salt transporters: characterization, function, and regulation. *Physiol. Rev.*, Bethesda, v. 83, p. 633-671, 2003.
- TRUCHON, G.; TARDIF, R.; BRODEUR, J. O-Cresol: A good indicator of exposure to low levels of toluene. *Appl. Occup. Environ. Hyg.*, New York, v. 14, p. 677-681, 1999.
- ULRICH, S.; MARTENS, J. Solid-phase microextraction with capillary gas-liquid chromatography and nitrogen-phosphorus selective detection for the assay of antidepressant drugs in human plasma. *J. Chromatogr B*, Amsterdam, v. 696, p. 217-234, 1997.
- VAN DOORN, H.; GRABANSKI, C.B.; MILLER, D.J.; HAWTHORN, S.B. Solid-phase microextraction with pH adjustment for the determination of aromatic acids and bases in water. *J. Chromatogr. A*, New York, v. 829, p. 223-233, 1998.
- WAHLÉN, E.; TAMASAWA, N.; ICHIMIYA, H.; EGESTAD, B.; SJÖVALL, J. Conditions for solid phase extraction of urinary bile acids with octadecylsilane-bonded silica. *J. Lipid Res.*, Bethesda, v. 35, p. 1902-1906, 1994.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. *Biomarkers in risk assessment: concepts and principles*. Geneve, 1993. 82p. (Environmental Health Criteria - n°155),
- ZHANG, Z.; YANG, M.J.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction. A solvent-free alternative for sample preparation. *Anal. Chem.*, Washington, v. 66, p. 844A-853A, 1994.

# ANEXOS

**9. ANEXOS****ANEXO 1****QUESTIONÁRIO - GRUPO EXPOSTO****1-) DADOS SOBRE A AMOSTRAGEM**

N° da amostra: \_\_\_\_\_

Data da coleta: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Hora da coleta \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Volume de urina coletado: \_\_\_\_\_ Densidade da urina: \_\_\_\_\_

**2-) INFORMAÇÕES PESSOAIS**

Nome: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_

Local de trabalho: \_\_\_\_\_ Área de trabalho: \_\_\_\_\_

**3-) SOBRE O SEU TRABALHO**

Quantas horas trabalha por dia? \_\_\_\_\_

Quantas vezes por semana você trabalha? \_\_\_\_\_

Há quanto tempo é funileiro? \_\_\_\_\_

Quanto de tinta você usa por dia? \_\_\_\_\_

Tem algum outro emprego ou bico? \_\_\_\_\_ ( ) sim ( ) não

Se sim, o que faz? \_\_\_\_\_

Qual sua profissão anterior? \_\_\_\_\_

Usa equipamento de proteção? \_\_\_\_\_ ( ) sim ( ) não

Se sim, quais? \_\_\_\_\_

**4-) HÁBITOS PESSOAIS E DIETA**

Você é fumante? ( ) sim ( ) não

Se sim, quantos cigarros fuma por dia? \_\_\_\_\_

Há quanto tempo fuma? \_\_\_\_\_

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

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

Você bebe?

Refrigerante ( ) sim ( ) não Quanto por dia? \_\_\_\_\_

Café ( ) sim ( ) não Quanto por dia? \_\_\_\_\_

Chá ( ) sim ( ) não Quanto por dia? \_\_\_\_\_

Cerveja       sim       não      Quanto por dia? \_\_\_\_\_  
 Pinga       sim       não      Quanto por dia? \_\_\_\_\_  
 Qual o tempo decorrido entre a última ingestão da bebida e a hora da coleta? \_\_\_\_\_

**Dieta**

Conserva em lata ou vidro       sim       não  
 Suco concentrado       sim       não  
 Molho de tomate ou pimenta       sim       não  
 Queijo       sim       não  
 Frutas       sim       não  
 Mostarda ou ketchup       sim       não  
 Adoçante       sim       não  
 Produtos dietéticos       sim       não

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

**5-) SOBRE SUA SAÚDE**

Você tem dificuldades de se lembrar das coisas?       sim       não  
 Você tem memória curta?       sim       não  
 Você costuma escrever as coisas que tem que fazer?       sim       não  
 Você costuma voltar para conferir o que fez?       sim       não  
 Você tem dificuldades para entender o que está lendo?       sim       não  
 Você tem dificuldades para se concentrar em algo que está fazendo?       sim       não  
 Você fica nervoso ou irritado com muita facilidade?       sim       não  
 Você fica triste ou deprimido com certa frequência?       sim       não  
 Você se cansa muito fácil com pouco esforço físico?       sim       não  
 Você tem batadeira do coração sem fazer esforço?       sim       não  
 Você, as vezes sente o peito sufocado?       sim       não  
 Você transpira mesmo quando não está calor?       sim       não  
 Você tem dor de cabeça ao menos uma vez por semana?       sim       não  
 Você costuma Ter formigamento em alguma parte do corpo?       sim       não  
 Você tem dificuldades para abotoar e desabotoar a roupa?       sim       não  
 Você já desmaiou?       sim       não

- Alguém da família tem doença nervosa, ou desmaio?  sim  não
- Você já sofreu algum acidente com pancada na cabeça?  sim  não
- Você está tomando algum remédio?  sim  não
- Qual? \_\_\_\_\_ Quantas vezes por dia? \_\_\_\_\_
- Você tem pressão alta, diabete, etc....  sim  não
- Se sim, qual? \_\_\_\_\_
- Você já teve hepatite, cirrose ou alguma doença do fígado?  sim  não
- Se sim, qual? \_\_\_\_\_
- Você se machuca no serviço  raramente  as vezes  sempre
- Você já notou alguma dificuldade para distinguir entre as cores?
- Amarelo e azul  sim  não
- Verde e vermelho  sim  não
- Você sente algum incômodo quando está pintando?
- tontura  dor de cabeça  sua vista escurece  gosto ruim na boca
- arder o nariz  arder a garganta  arder os olhos  tosse
- Alguma outra coisa? \_\_\_\_\_
- Você dorme bem, acorda descansado?  sim  não
- Você acorda durante a noite?  sim  não

## ANEXO 2

### QUESTIONÁRIO - GRUPO CONTROLE

#### 1-) DADOS SOBRE A AMOSTRAGEM

Nº da amostra: \_\_\_\_\_

Data da coleta: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Hora da coleta \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Volume de urina coletado: \_\_\_\_\_

Densidade da urina: \_\_\_\_\_

#### 2-) INFORMAÇÕES PESSOAIS

Nome: \_\_\_\_\_

Idade: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_ Altura: \_\_\_\_\_

Curso: \_\_\_\_\_ Período: \_\_\_\_\_

#### 3-) HÁBITOS PESSOAIS E DIETA

Você utiliza algum solvente ( ) sim ( ) não

Se sim, Qual(is) \_\_\_\_\_

Você é fumante? ( ) sim ( ) não

Se sim, quantos cigarros fuma por dia? \_\_\_\_\_

Há quanto tempo fuma? \_\_\_\_\_

Qual o tempo entre o ultimo cigarro e a hora da coleta da urina? \_\_\_\_\_

##### Você bebe?

Refrigerante ( ) sim ( ) não Quantos copos? \_\_\_\_\_

Café ( ) sim ( ) não Quantas xícaras? \_\_\_\_\_

Chá ( ) sim ( ) não Quantas xícaras? \_\_\_\_\_

Cerveja ( ) sim ( ) não Quantos copos? \_\_\_\_\_

Pinga ( ) sim ( ) não Quantas doses? \_\_\_\_\_

Qual o tempo decorrido entre a ultima ingestão da bebida e a hora da coleta? \_\_\_\_\_

##### Dieta

Conserva em lata ou vidro ( ) sim ( ) não

Suco concentrado ( ) sim ( ) não

Molho de tomate ou pimenta ( ) sim ( ) não

Queijo ( ) sim ( ) não

Frutas ( ) sim ( ) não

Mostarda ou ketchup ( ) sim ( ) não

Adoçante ( ) sim ( ) não

Produtos dietéticos ( ) sim ( ) não

Qual o tempo decorrido entre a sua ultima refeição e a hora da coleta? \_\_\_\_\_



**5-) SOBRE SUA SAÚDE**

Você tem dor de cabeça ao menos uma vez por semana? ( ) sim ( ) não

Você já desmaiou? ( ) sim ( ) não

Você está tomando algum medicamento? ( ) sim ( ) não

Qual? \_\_\_\_\_ Quantas vezes por dia? \_\_\_\_\_

Você tem pressão alta, diabetes, etc.... ( ) sim ( ) não

Se sim, qual? \_\_\_\_\_

Você já teve hepatite, cirrose ou alguma doença do fígado? ( ) sim ( ) não

Se sim, qual? \_\_\_\_\_

## ANEXO 3



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 :

.....  
 Documento de Identidade Nº : ..... Sexo: ( )M ( )F  
 Data de Nascimento: ...../...../.....  
 Endereço: ..... Nº: ..... Apto: .....  
 Bairro: ..... Cidade: .....  
 CEP: ..... Telefone: .....

**II – DADOS SOBRE A PESQUISA**

1. Título do Protocolo de Pesquisa: " Avaliação de ácidos biliares como biomarcadores precoces da hepatotoxicidade de solventes".

2. Pesquisador: Maria José Nunes de Paiva.  
 Cargo/Função: Farmacêutica-Bioquímica.  
 Inscrição Conselho Regional Nº  
 Departamento FCF/USP: Toxicologia e Análises Toxicológicas.

3. Avaliação do risco da pesquisa:  
 Sem Risco ( ) Risco Mínimo ( x ) Risco Médio ( )  
 Risco Baixo ( ) Risco Maior ( )

Obtenção de amostra de urina considerada não invasiva. O voluntário poderá apresentar hematomas, mal estar, nervosismo em virtude da coleta a de sangue

4. Duração da Pesquisa: 12 MESSES

**III - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:**

- Justificativa e os objetivos da pesquisa: A exposição no trabalho aos solventes nas tintas pode apresentar risco à saúde, por isto é necessário fazer exames de urina e de sangue para acompanhar a sua saúde. O objetivo da pesquisa é a determinação dos derivados das tintas (exames que verificam utilização do solvente que tem na tinta usada no local de trabalho) com o objetivo de ver se o exame de sangue confirma os resultados do exame de urina.
- Procedimentos que serão utilizados e propósitos; incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: Colheita de sangue no braço com seringa e agulha descartável pelo profissional da saúde capacitado e coleta de urina pelo próprio trabalhador; determinação cromatográfica do ácido hipúrico e o-cresol urinário; determinação dos ácidos biliares e de exames de laboratório para a verificação de algum dano no fígado
- Desconforto e riscos esperados: nenhuma substância ou procedimento que implique em riscos serão utilizados. Alguns indivíduos poderão apresentar hematomas, mal estar, nervosismo em virtude da coleta de sangue
- Benefícios que poderão ser obtidos: os resultados da pesquisa permitirão avaliar o uso de ácidos biliares no sangue como exame para ver se o solvente da tinta prejudica o fígado.

---

#### IV – ESCLARECIMENTOS DADO PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

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

---

#### V – INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA:

Pesquisadoras responsáveis: Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira  
 Maria José Nunes de Paiva

Endereço: Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas  
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714 – Alfenas M.G  
 CEP: 37130-000  
 Fone: 3292-1224/3292-1342

---

#### 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.

Cambuí, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
 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 aquela que será fornecida ao sujeito da pesquisa.
-

ANEXO 4



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

Ofício CEP nº 56

São Paulo, 09 de junho de 2003.

**Ilma. Sra.  
Maria José Nunes de Paiva**

Vimos informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP, em reunião realizada em 28 de abril passado, apreciou os esclarecimentos prestados por V.Sa., tendo resolvido **APROVAR** o seu projeto "Avaliação de ácidos biliares como biomarcadores precoces da hepatotoxicidade de solventes".

Lembramos que após a execução de 50% do cronograma do projeto, deverá ser apresentado um relatório parcial, de acordo com o Artigo 18 - item C, da Portaria FCF-111/97.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Fernando Salvador Moreno  
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da FCF/USP

Orientador: Prof. Maria Elisa Perreira Bastos de Siqueira  
FBC

ANEXO 5



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
ESCOLA DE FARMÁCIA E ODONTOLOGIA DE ALFENAS


COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

DECLARAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas declara para os devidos fins que se fizeram necessários que o projeto **Avaliação de Ácidos Biliares como Biomarcador Precoce da Hepatotoxicidade na Exposição Ocupacional a Solventes da Profa. Dra. Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira** foi devidamente apreciado e aprovado por este Comitê.

Por ser verdade, firmo a presente Declaração.

Alfenas, 6 de fevereiro de 2002.

  
Profa. Elisabeth Pizzamiglio Vieira  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da Efoa

**ANEXO 6****Parâmetros Bioquímicos**

parâmetro	KIT/método	valor de referência
creatinina	Bioclin® (picrato)	0,4 - 1,4 mg/dL
fosfatase alcalina	Bioclin® (Roy modificado)	12 – 43 u/L
alanina-aminotransferase	Bioclin® (Cinética-UV)	3 – 50 u/L
aspartatoaminotransferase	Bioclin® (Cinética-UV)	12 – 46 u/L
gama-glutamil transferase	Bioclin® (Zasz-modificado)	6 – 28 u/L
bilirubina total, direta e indireta	Bioclin® (Sims – Horn)	até 1,2 mg/dL, 0,4 mg/dL e 0,8 mg/dL