

**FLÁVIA CRISTINA SILVA DE PAULA**

**VALIDAÇÃO DO  
ÁCIDO *TRANS*, *TRANS*-MUCÔNICO  
URINÁRIO COMO BIOMARCADOR DE  
EXPOSIÇÃO AO BENZENO**

**Belo Horizonte  
Faculdade de Farmácia da UFMG**

**2001**

**FLÁVIA CRISTINA SILVA DE PAULA**

**VALIDAÇÃO DO  
ÁCIDO *TRANS*, *TRANS*-MUCÔNICO  
URINÁRIO COMO BIOMARCADOR DE  
EXPOSIÇÃO AO BENZENO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Professora Edna Maria Alvarez Leite

**Faculdade de Farmácia da UFMG**

**2001**

*Aos meus pais e aos meus irmãos, Carina e Leandro*

*Eis o momento!*

*Começando nesta porta, um longo e eterno caminho  
mergulha no passado: atrás de nós está uma eternidade!*

*Não será verdade que todos os que podem andar  
têm de já ter percorrido este caminho?*

*F. Nietzsche*

*Para ter*

*mais certezas tenho que me*

*saber de imperfeições.*

*Manuel de Barros*

## **AGRADECIMENTOS**

- Em especial à professora Edna Maria Alvarez Leite pela disponibilidade e pelo carinho ao orientar-me nessa dissertação.
- Aos professores do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, em especial à professora Josianne Nicácio Silveira.
- À professora Elene Cristina Pereira Maia por ter me mostrado o caminho da pesquisa científica.
- Aos amigos do LATO, especialmente ao amigo Márcio de Oliveira.
- À amiga Elizabete Zaulli Lopes e aos amigos Cláudio José de Castro Maciel e Múcio Denilson Capanema pela ajuda tão preciosa na coleta de material biológico.
- Ao pessoal da Meta Galvanização, da Caixa Econômica (agência Floresta) e do Laboratório Humberto Habrão que contribuíram com as amostras biológicas.
- À minha grande amiga Mirtes A. Pereira pela amizade, pelo tão valioso estímulo, por ter me inspirado com sua força e perseverança e por torcer por mim.
- Ao querido Érico Gonçalves Flores pelo apoio em todas as horas.
- A todos os amigos que mesmo à distância me apoiaram na execução deste trabalho.

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 Biotransformação do benzeno.....	16
2.2 Metabólitos e ação tóxica crônica do benzeno.....	17
2.3 Propriedades Físico-Químicas do ATTM.....	19
2.4 Fatores que podem influenciar a concentração do ATTM urinário.....	19
2.4.1 Nível de exposição ao benzeno.....	19
2.4.2 Co-exposição ao tolueno.....	20
2.4.3 Susceptibilidade genética.....	20
2.4.4 Dieta.....	20
2.4.5 Outros.....	21
3. ASPECTOS ANALÍTICOS.....	21
3.1 Coleta e armazenamento das amostras.....	21
3.2 Métodos de análise.....	21
3.2.1 Análise por cromatografia líquida de alta eficiência.....	21
3.2.2 Análise por cromatografia gasosa.....	22
4. OBJETIVOS E PLANO DE TRABALHO.....	23
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
5.1 MATERIAL.....	24
5.1.1 Equipamentos e acessórios.....	24
5.1.2 Reagentes.....	24
5.1.3 Vidraria.....	24
5.1.4 Soluções-padrão.....	25
5.1.5 Amostras Biológicas.....	25
5.1.5.1 Grupo não exposto ao benzeno.....	26
5.1.5.2 Grupo exposto ao benzeno.....	26
5.2 MÉTODO.....	26
5.2.1 Validação do método analítico .....	26
5.2.1.1 Otimização das condições cromatográficas .....	26
5.2.1.2 Técnica de extração do ATTM urinário.....	27
5.2.1.3 Linearidade.....	27
5.2.1.4 Limite de detecção do equipamento.....	28
5.2.1.5 Limite de quantificação .....	28
5.2.1.6 Efeito matriz.....	28

5.2.1.7	Precisão .....	28
5.2.1.8	Recuperação .....	29
5.2.1.9	Curva de calibração.....	29
5.3	Determinação dos níveis de ATTM nas amostras de urina dos indivíduos dos grupos exposto e não exposto ao benzeno.....	29
5.4	Análise estatística.....	29
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
6.1	Otimização das condições cromatográficas.....	30
6.2	Linearidade.....	31
6.3	Limite de detecção do equipamento.....	32
6.4	Limite de quantificação .....	32
6.5	Efeito matriz.....	32
6.6	Precisão .....	33
6.7	Recuperação.....	34
6.8	Curva de calibração.....	35
6.9	Concentração do ATTM em amostras de urina dos indivíduos do grupo não exposto ao benzeno.....	35
6.10	Concentração de ATTM em amostras de urina dos indivíduos do grupo exposto ao benzeno.....	40
7.	CONCLUSÕES.....	43
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
9.	APOIO FINANCEIRO.....	51
10.	APÊNDICE – PROTOCOLO TOXICOLÓGICO PREENCHIDO PELOS INDIVÍDUOS DOADORES DE AMOSTRAS DE URINA	52

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela I – Coeficientes de variação intra e interensaio do método analítico para a determinação do ATTM urinário

Tabela II – Porcentagem de recuperação do método analítico para a determinação do ATTM urinário

Tabela III – Valores de ATTM em amostras de urina de indivíduos não expostos ao benzeno, classificados de acordo com o gênero.

Tabela IV – Valores de ATTM em amostras de urina de indivíduos não expostos ao benzeno, divididos de acordo com a faixa etária.

Tabela V – Valores de ATTM em amostras de indivíduos não expostos ao benzeno, subdivididos de acordo com o hábito de fumar

Tabela VI – Valores de ATTM em amostras de urina de indivíduos não expostos ao benzeno, classificados de acordo com o hábito de ingerir bebidas alcólicas

Tabela VII – Valores de benzeno no ar ocupacional e do ATTM em amostras de urina dos indivíduos expostos ao solvente

Tabela VIII – Caracterização dos indivíduos do grupo expostos, em função de suas características individuais.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química do ácido *trans,trans* mucônico

Figura 2 – Principais vias de biotransformação do benzeno

Figura 3 –Cromatograma obtido após análise de *pool* de urina adicionado de ATTM (2,0µg/mL)

Figura 4 – faixa de resposta linear do detector UV para o ATTM

Figura 5 – Curva representativa do efeito matriz na determinação do ATTM

## **LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS**

1. ATTM – ácido *trans, trans* mucônico
2. AFM – ácido fenilmercaptúrico
3. CG – Cromatografia Gasosa
4. CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
5. CV – coeficiente de variação
6. IBMP –Índice Biológico Máximo Permitido
7. LDE – limite de detecção do equipamento
8. LQ – limite de quantificação
9. Mtb – Ministério do trabalho brasileiro
10. tr – tempo de retenção
11. VRT – Valor de Referência Tecnológico

## RESUMO

O presente trabalho foi realizado objetivando avaliar o uso do ácido trans,trans mucônico (ATTM) urinário como biomarcador na monitorização da exposição ocupacional ao benzeno. Inicialmente foi estudado o comportamento do ATTM em amostras de urina de indivíduos não expostos (n=116) e em seguida analisadas amostras de urina de indivíduos expostos ocupacionalmente ao solvente. Foi validado um método analítico para a determinação do ATTM utilizando-se cromatografia líquida de alta eficiência, em sistema isocrático, coluna de fase reversa Lichrosorb RP 18, 5 µm (250 x 4,2 mm), temperatura de 40°C, fase móvel: solução aquosa de ácido acético 1% - metanol (90-10), pH = 2,72 em fluxo de 1mL/min e detecção UV, comprimento de onda a 264 nm. O método apresentou linearidade (0,006 a 10,0 µg/mL) limites de detecção (0,006µg/mL) e quantificação (0,03µg/mL), precisão (CV intraensaio:9,57%, CV interensaio: 11,15%) e recuperação (86,42%) adequados aos objetivos propostos. Os valores de ATTM foram corrigidos em função da creatinina urinária. A faixa de referência do ATTM urinário no grupo não exposto variou de 0,03 a 0,26 mg/g de creatinina (média de 0,10 ± 0,08 mg/g de creatinina). A exposição média dos trabalhadores selecionados ao benzeno foi de 0,151± 0,052 mg/m<sup>3</sup> o que resultou em um valor médio de ATTM urinário de 0,189 ± 0,038. Foi encontrada diferença significativa entre os níveis de ATTM do grupo exposto e não expostos, mostrando a sensibilidade do metabólito para detectar a exposição ao solvente. Não houve correlação entre ATTM urinário e níveis de benzeno no ar, resultado esperado uma vez que os níveis do solvente no ar foram muito baixos (cerca de 0,05 ppm). Foi observada correlação entre ATTM urinário e hábito de fumar entre os indivíduos expostos, mas esta relação não foi suficientemente clara no grupo de não expostos. A ingestão de álcool num período de até 48 horas antes da colheita das amostras não mostrou interferir nos níveis de ATTM nos dois grupos estudados. Foi observado correlação entre este metabólito e a idade (faixa etária de 15 a 25 anos) no grupo de não expostos. Os resultados deste trabalho mostram a sensibilidade do ATTM para diferenciar indivíduos expostos de não expostos ao benzeno, mesmo em exposições baixas ao solvente. Este metabólito não se correlacionou, entretanto, com o benzeno no ar em níveis médios de 0,05 ppm.

## ABSTRACT

This work was conducted in an attempt to examine the trans, trans muconic acid (TTMA) usage as biomarker of exposure to benzene. It was studied urine samples of workers exposed (exposed group, n=40) and non-exposed (non-exposed group, n=117) to benzene. TTMA determination was performed by high performance liquid chromatography using isocratic system, reversed phase column Lichrosorb RP 18 (250 x 4.2 mm - 5  $\mu$ m) temperature of 40°C, phase mobile: acetic acid 1% and methanol (90-10) pH 2.72 flux of 1.0 mL/min and UV detection ( $\lambda$ =264 nm). The analytic validation results were linearity range of 0.006 – 10.0  $\mu$ g/mL, detection and quantification limits of 0.006  $\mu$ g/mL and 0.03 $\mu$ g/mL respectively, intra and interassay coefficient of variation 9.57% and 11.15% respectively and recovery of 86.42%. The reference value range of TTMA in non-exposed subjects was 0.03 to 0.26 mg/g of creatinine (mean  $0.1 \pm 0.08$  mg/g de creatinine). The workers were exposed to benzene levels of  $0.151 \pm 0.052$  mg/m<sup>3</sup> and they showed a urinary TTMA mean value of  $0.189 \pm 0.038$  mg/g of creatinine. There was statistic difference between TTMA level in urine samples from exposed and non-exposed groups showing the TTMA sensibility to detect benzene occupational exposure. It was not found correlation between urinary TTMA and air benzene levels. This result was expected as solvent levels in occupational air was low (almost 0.05 ppm). It was observed correlation between urinary TTMA levels in exposed group and smoking habits but this one was not so clear in non-exposed group. The alcohol beverage ingestion up to 48 hours before sampling procedure show no influence on TTMA levels both in exposed and no-exposed groups but a correlation between age (range 15 to 25 years) and urinary metabolite levels found in the last group.