

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

**DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO TRANS,TRANS-MUCÔNICO
URINÁRIO POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE
ALTA EFICIÊNCIA VISANDO A BIOMONITORIZAÇÃO
DE TRABALHADORES EXPOSTOS AO BENZENO**

ISARITA MARTINS

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

Orientadora:
Prof.^a Dr.^a MARIA ELISA PEREIRA BASTOS
DE SIQUEIRA

São Paulo

1999

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

Martins, Isarita

M386d Determinação do ácido trans, trans-mucônico urinário por cromatografia líquida de alta eficiência visando a biomonitorização de trabalhadores expostos ao benzeno / Isarita Martins. -- São Paulo, 1999.
102p.

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. Benzeno : Toxicologia
3. Análise toxicológica I. T. II. Siqueira, Maria Elisa Pereira Bastos de, orientador.

615.902 CDD

ISARITA MARTINS

**DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO TRANS,TRANS-MUCÔNICO
URINÁRIO POR CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA DE
ALTA EFICIÊNCIA VISANDO A BIOMONITORIZAÇÃO
DE TRABALHADORES EXPOSTOS AO BENZENO**

Comissão julgadora

**Dissertação para obtenção do grau
MESTRE**

**Prof^a. Dr^a. Maria Elisa P. B. de Siqueira
Orientadora/ Presidente**

**Prof. Dr. José Salvador Lepera
1º Examinador**

**Prof^a. Dr^a. Mírian Meyer Passarelli
2º Examinadora**

São Paulo, 06 de dezembro de 1999

Dedico este trabalho

*a **DEUS** pois “Ainda que eu conheça todos os mistérios e toda ciência... “ sem a fé em um ser Superior eu nada serei,*

*aos meus pais **Wilberth e Marina** pela educação que me indicou o caminho,*

*ao **Eduardo** pela força e compreensão nos momentos difíceis que lhe foram impostos.*

À Prof. Dra. Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira

*todo meu carinho, admiração e agradecimento pela
orientação, contribuindo de maneira significativa
para meu crescimento pessoal e profissional .*

Agradecimentos

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

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento -CNPq- pela concessão da bolsa de estudo;

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

Aos professores Henrique Vicente Della Rosa, José Salvador Lepera e Miriam Meyer Passarelli, pelas valiosas sugestões feitas no exame de qualificação;

A bibliotecária Maria Luíza, pela elaboração da ficha catalográfica;

Aos funcionários da secretaria de Pós-Graduação, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pela dedicação e ajuda;

Aos funcionários Dalva, Luzia, Roseli, Helena, Luíza, Márcia pela efetiva ajuda na rotina de trabalho;

Aos colegas do curso de pós-graduação em Toxicologia e Análises Toxicológicas, pelos momentos bons e ruins que dividimos nessa fase de nossas vidas;

`A Cristiane, Lolla e Patrícia Rosa, pela valiosa contribuição na revisão final de alguns itens deste trabalho;

`A Ana Cristina, pela ajuda preciosa nas coletas das amostras;

`A Janaína, pelo contato com a empresa que permitiu a coleta das amostras;

`A Luciane, pelas valiosas sugestões e discussões;

`A alguns familiares e amigos, por existirem e permanecerem presentes nesta fase da minha vida.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO BENZENO	05
2.1 Propriedades físico-químicas	05
2.2 Usos e fontes de exposição	07
2.3 Toxicocinética.....	11
2.4 Toxicodinâmica.....	19
2.5 Efeitos Tóxicos	22
2.6 Monitorização biológica.....	27
2.7 Avaliações periódicas do estado de saúde dos trabalhadores expostos.....	33
2.8 Aspecto analítico.....	34
3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO.....	48
4. MATERIAL E MÉTODO.....	49
4.1 Material.....	49
4.1.1 Reagentes e solventes	49
4.1.2 Soluções-padrão e fase móvel	50
4.1.3 Vidraria, aparelhos e acessórios.....	50
4.2 Método.....	51
4.2.1 Validação do método analítico para a determinação do ácido trans, trans- mucônico urinário	51
4.2.1.1 Otimização das condições cromatográficas.....	54
4.2.1.2 Linearidade	54
4.2.1.3 Curva de calibração	54
4.2.1.4 Limite de quantificação	55
4.2.1.5 Limite de detecção.....	55
4.2.1.6 Recuperação	56
4.2.1.7 Precisão do método analítico.....	56

4.2.1.8	Estabilidade do analito na amostra.....	56
4.2.1.9	Exatidão.....	57
4.2.1.10	Efeito da matriz.....	57
4.2.2	Determinação do ácido trans, trans-mucônico (ttAM) em urina de trabalhadores que manipulam o benzeno.....	57
4.2.2.1	Casuística.....	57
4.2.2.2	Análise do ácido trans, trans-mucônico (ttAM) urinário.....	60
4.2.3	Determinação da densidade e da creatinina urinária.....	60
4.2.4	Análise estatística.....	60
5	RESULTADOS.....	61
5.1	Otimização das condições cromatográficas.....	61
5.2	Linearidade.....	63
5.3	Limite de quantificação.....	65
5.4	Limite de detecção.....	65
5.5	Recuperação.....	65
5.6	Precisão.....	66
5.7	Estabilidade do analito na amostra.....	66
5.8	Exatidão.....	68
5.9	Efeito da matriz.....	68
5.10	Determinação do ácido trans,trans-mucônico em urina de trabalhadores que manipulam benzeno.....	69
6	DISCUSSÃO	74
7	CONCLUSÕES.....	83
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
9	ANEXOS.....	100

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Trabalhadores afastados, com diagnóstico de intoxicação benzênica, em alguns estados do Brasil, segundo instituições públicas.....	27
TABELA 2- Condições analíticas utilizadas na determinação de ttAM em urina.....	37
TABELA 3- Características da população avaliada, para a determinação do ácido trans, trans-mucônico em urina.....	59
TABELA 4- Recuperação de ácido trans,trans-mucônico (ttAM) adicionado às amostras de <i>pool</i> de urina.....	65
TABELA 5- Precisão do método analítico para determinação de ácido trans,trans-mucônico (ttAM) urinário, expressa em função dos coeficientes de variação (CV).....	66
TABELA 6- Estabilidade do ácido trans,trans-mucônico na amostra conservada dez dias a 4 °C.....	66
TABELA 7- Inexatidão do método de determinação do ácido trans,trans-mucônico (ttAM) em urina, expressa em função de porcentagem (%).....	68
TABELA 8- Valores de ácido trans,trans-mucônico (ttAM) em urina de trabalhadores que manipulam benzeno numa refinaria.....	70
TABELA 9- Medidas descritivas para as concentrações do ácido trans,trans-mucônico (mg/g creat.) nos 3 períodos de coleta.....	71
TABELA 10- Medidas descritivas para as concentrações do ácido trans,trans-mucônico urinário (mg/L) nos 3 períodos de coleta.....	72
TABELA 11- Medidas descritivas para as concentrações do ácido trans,trans-mucônico urinário, em mg/g creat nos três diferentes períodos de coleta, de acordo com o hábito de fumar.....	73
TABELA 12- Medidas descritivas para as concentrações do ácido trans,trans-mucônico urinário, em mg/g creatinina nos 3 períodos de coleta, de acordo com ingestão de bebidas alcoólicas.....	73

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Produção, destino e consumo do benzeno no Brasil.....	10
FIGURA 2- Biotransformação do benzeno.....	17
FIGURA 3- Fluxograma da técnica de determinação do ácido trans,trans-mucônico urinário.....	53
FIGURA 4- Cromatogramas (CLAE) referentes a soluções-padrão.....	62
FIGURA 5- Curva de linearidade do ácido trans,trans-mucônico (ttAM) em urina.....	63
FIGURA 6- Cromatogramas (CLAE) referentes às amostras de urina.....	64
FIGURA 7- Estabilidade do ácido trans,trans-mucônico (0,2 mg/L) em amostra de urina conservada a – 20°C por sete semanas.....	67
FIGURA 8- Estabilidade do ácido trans,trans-mucônico (2,0 mg/L) em amostra de urina conservada a – 20°C por quinze semanas.....	67
FIGURA 9- Representação gráfica da curva de calibração do ácido trans,trans-mucônico (ttAM) em água e em urina, nas concentrações de 0,2 a 5,0 mg/L...68	68
FIGURA 10- Representação das concentrações de ácido trans,trans-mucônico urinário (mg/g creatinina) nos três períodos de coleta das amostras.....	71
FIGURA 11- Representação das concentrações de ácido trans,trans-mucônico urinário (mg/L) nos três períodos de coleta das amostras.....	72

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1- Comparação entre o diferentes bioindicadores para a exposição a baixas concentrações ambientais do benzeno.....	32
--	-----------

RESUMO

O benzeno é um solvente comprovadamente cancerígeno e, para substâncias com tal característica, não há limites de exposição considerados seguros. Em vista disso, as discussões internacionais e nacionais visam a diminuir, cada vez mais, os níveis de exposição ocupacional permitidos. O ácido trans, trans-mucônico (ttAM), um produto de biotransformação do benzeno, tem sido preconizado como um bioindicador sensível da exposição ao solvente. Este trabalho foi desenvolvido com o propósito de validar método capaz de detectar o ttAM em urina de indivíduos expostos ao benzeno, bem com estabelecer o melhor período de coleta das amostras. A técnica escolhida foi a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com coluna de fase-reversa, Lichrosorb RP 18, e detector de ultra-violeta. O método mostrou-se linear entre 0,2 a 5,0 mg/L ($r^2 = 0,9943$). Os limites de detecção e de quantificação obtidos foram, respectivamente, 0,1 e 0,2 mg/L. A porcentagem de recuperação absoluta média foi de 77,1% e de inexatidão de 27,9%. Os coeficientes de variação médios foram, para a precisão intra-ensaio 7,7 % e, para a interensaio 10,6%. O analito permaneceu estável na matriz por um período de 6 semanas para a concentração de 0,2 mg/L e de 15 semanas, para a 2,0 mg/L, se armazenada em freezer (-20 °C) e por até dez dias sob refrigeração (4 °C) para os adicionados de 0,2, 2,0 e 5,0 mg/L. Com estes resultados, a validação foi considerada satisfatória. O valor médio obtido nas amostras de trabalhadores ocupacionalmente expostos no final da jornada de trabalho foi de 0,81 mg/g creatinina (mediana=0,62 mg/g creatinina). Estes resultados foram superiores e estatisticamente diferentes ($p=0,025$) daqueles encontrados em amostras do início da jornada e do dia seguinte, mostrando ser o final da jornada o período que melhor reflete a exposição do dia de trabalho.

SUMMARY

Benzene is a carcinogenic chemical used in many plants. The national and international discussions aim to low more and more the permitted occupational exposure limit to benzene, although in fact, there is no safe limit to carcinogens. The trans, trans-muconic acid (ttMA), a benzene metabolite, has been recommended as a sensitive bioindicator in the biological monitoring of workers exposed to this solvent. This work was developed in order to validate a method for ttMA analysis in samples of benzene-exposed workers as well as to establish the best sample collecting time. The chosen technique was the high pressure liquid chromatography with reverse-phase column, Lichrosorb RP 18, and UV detection. A linear relationship ($r^2 = 0.9943$) was observed in the range from 0.2 to 5.0 mg/L. The detection and quantification limits were respectively 0.1 and 0.2 mg/L. The average recovery was 77.1 % and the inaccuracy (bias) was 27.9 %. Precision, evaluated by variation coefficient, were 7.7 % (intra-assay) and 10.6 % (inter-assay). The ttMA remained stable in the matrix during a period of six weeks for the 0.2 mg/L samples and fifteen weeks for the 2.0 mg/L samples, in both cases when stored at - 20°C. In 0.2, 2.0 and 5.0 spiked samples no significant differences were found when conserved at 4 °C for ten days. In the occupationally exposed workers, ttMA values were significantly higher in post-shift samples ($p = 0.025$) than in pre-shift or in those collected in the following day. These results reveal that the end of the shift is the best period to take urine samples for benzene biomonitoring.

1 INTRODUÇÃO

O benzeno foi isolado primeiramente por M. Faraday, em 1825, por meio da pirólise do óleo de baleia e outros materiais. O início do processo de desenvolvimento comercial para a obtenção deste composto e outros hidrocarbonetos aromáticos através de carvão mineral ocorreu entre 1840 e 1850 ^{38,45,74}.

Na produção de coques, em usinas siderúrgicas, o benzeno é separado na fração de óleos leves de alcatrão, designada BTX siderúrgico ou simplesmente BTX, constituído de mistura de benzeno, tolueno e xileno, sendo o benzeno o componente de maior concentração. A destilação fracionada do BTX separa os três componentes e a denominação comercial de *benzol* decorre desta fonte de produção. O *benzol* comercial pode ser tanto o benzeno relativamente puro como misturas de benzeno, tolueno e frações menores de xileno ^{13,32}.

A obtenção do benzeno pelo processo carboquímico, nas indústrias siderúrgicas, teve grande importância industrial e, por mais de um século, representou a principal fonte de produção de benzeno. Seu destino eram as indústrias de artefatos de borracha e pneus, couro e calçados, cola e adesivos, ceras e resinas, tintas e vernizes, móveis, solventes e diluentes, as gráficas, os produtos formulados em geral e os variados processos industriais ^{56,60,63}.

Essa forma de obtenção acabaria por atingir número significativo de pessoas, incluindo os trabalhadores e a população em geral. A longa casuística médica internacional de danos à saúde e mortes atribuídas à exposição ocupacional ao benzeno, até a década de 50, é decorrente destas formas de produção e utilização ^{56,60,63}.

A produção industrial de origem petrolífera começou no final da década de 40 e no início da década de 50, passando o benzeno a ser obtido em refinarias de petróleo e indústrias petroquímicas.

Segundo NOVAES (1992)⁸⁵, entre as décadas de 40 e 70, verificou-se internacionalmente uma modificação radical no perfil de produção e consumo de benzeno em relação às décadas iniciais deste século. Assim, o benzeno de origem carboquímica, obtido nas siderúrgicas, foi paulatinamente perdendo importância industrial e econômica. Os hidrocarbonetos aromáticos, obtidos a partir de matérias-primas originárias do petróleo, passaram então a ter maior grau de pureza e qualidade.

Os três maiores produtores mundiais de benzeno são os Estados Unidos, o Japão e os países do oeste da Europa, sendo a produção mundial superior a 26 milhões de toneladas por ano^{31,45}. O Brasil contribui para esta produção com aproximadamente 700 mil toneladas, o que significa cerca de 2,5% do total, sendo o maior produtor de benzeno da América Latina. Suas principais fontes de produção são os parques de produção petroquímica e de refino de petróleo de Camaçari-BA, Triunfo-RS, Capuava-SP e Cubatão-SP, responsáveis por 95% da produção nacional. O restante provém da destilação fracionada de óleos leves do alcatrão (BTX siderúrgico), obtida a partir do carvão mineral pela Companhia Siderúrgica Nacional (CSN), Companhia Siderúrgica Paulista (COSIPA), AÇOMINAS e USIMINAS^{8,9,13,82}.

Segundo CARVALHO *et al.* (1995)³², “para consideração de saúde ocupacional, mais do que volume de produção, interessa saber com exatidão o destino da produção nacional”. Este autor também comenta que o Brasil não dispõe de estruturas governamentais central e/ou regional adequadas à fiscalização e ao controle da distribuição do benzeno a partir de suas fontes de produção.

Como as demais patologias decorrentes de agressões de ambientes de trabalho sobre a saúde, a prevalência dos danos à saúde causados por exposição ao benzeno mostra-se baixa. A avaliação da

situação é dificultada pela ausência de diagnóstico, de subnotificação e de sub-registro. Os dados de morbidade encontram-se dispersos e não globalizados em muitos estados. Em certos setores produtivos não existe identificação de casos de benzenismo, o que contribui para o sub-registro nacional ⁸².

De qualquer modo, os dados disponíveis mostram que em diversas realidades regionais o benzeno constitui importante problema de saúde pública ³².

Nos locais de trabalho onde está prevista a utilização de benzeno, deve-se desenvolver um programa preventivo que possa se revelar eficaz para evitar os distúrbios oriundos das exposições ocupacionais. Este programa, de responsabilidade de cada empresa, deve ser conduzido de forma integrada entre as áreas responsáveis pela prevenção, produção e administração, tendo como objetivo fundamental evitar a exposição ao benzeno ²⁴.

Uma vez que o benzeno é substância comprovadamente cancerígena ⁵⁴, é inerente a dificuldade de estabelecer limites considerados "seguros" para exposição às substâncias com tal propriedade. Efetivamente, as discussões internacionais e nacionais sinalizam a tendência de diminuir cada vez mais os níveis de exposição ocupacional permitidos. A *American Conference of Governmental Industrial Hygienists*[®] (ACGIH) ⁵ recomenda para o benzeno um valor limite de tolerância- média ponderada pelo tempo (TLV-TWA) de 0,5 ppm e um limite de exposição de curta duração (STEL) de 2,5 ppm. No Brasil, o *Acordo e Legislação sobre Benzeno* (1996) ²⁶, através do Anexo 13-A da Norma Regulamentadora n^o 15, define um valor de referência tecnológico-média ponderada pelo tempo (VRT-MPT) de 1 ppm para as empresas que produzem, transportam, armazenam e utilizam ou manipulam o benzeno e suas misturas líquidas e de 2,5 ppm para as empresas siderúrgicas.

A análise detalhada do processo de produção e de suas operações e a análise das atividades executadas pelos trabalhadores

permitem identificar as situações de maior probabilidade de exposição, assim como as principais fontes de vazamento. Assim, o ambiente de trabalho deve ser monitorizado periodicamente, e toda máquina, equipamento ou recipiente que contenha benzeno deve ser sistematicamente inspecionado ⁴⁰.

A monitorização do trabalhador é outra medida importante na prevenção das intoxicações ocupacionais. Quatro indicadores biológicos têm sido preconizados para a biomonitorização da exposição: benzeno no ar exalado; benzeno no sangue e os produtos de biotransformação: ácido trans,trans-mucônico (ttAM) e ácido fenilmercaptúrico em urina (S-AFM) ¹⁷. A ACGIH[®] recomenda a determinação do S-AFM em urina, um produto secundário de biotransformação do benzeno, considerado um bom bioindicador para avaliar a exposição a baixas concentrações ⁵.

Alguns autores propõem o ácido trans-trans, mucônico (ttAM) como bioindicador que também permite avaliar a exposição a baixas concentrações de benzeno no ar ^{80,87,110}. Produto, também secundário, de biotransformação do benzeno, o ttAM é originado de um intermediário altamente reativo, o aldeído trans, trans- mucônico, ao qual tem sido atribuída a ação mielotóxica e leucemogênica do benzeno. Assim, a medida do ttAM permitiria avaliar este risco, apesar de sua inespecificidade ¹¹⁰. Na última publicação da ACGIH[®], de 1999, é proposta a determinação do ttAM em urina (como intenção de mudança) recomendando um índice biológico de exposição (BEI) de 0,5 mg/g creatinina ⁶.

Face a estes dados, torna-se importante desenvolver a análise de bioindicadores por métodos precisos, rápidos, exatos e exequíveis que permitam avaliar a exposição a baixos níveis de benzeno, assim como de se estabelecer as condições de amostragem mais adequadas.

2 EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO BENZENO

2.1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

O benzeno é a unidade básica para a classe de compostos aromáticos, muitos dos quais são intermediários para a produção de grande variedade de produtos comerciais. Este composto é termicamente estável e sua formação é cinética e termodinamicamente favorecida a temperaturas $\geq 500^{\circ}\text{C}$. Por essa razão, temperaturas elevadas são requeridas para sua decomposição térmica ou para que ocorram as reações de condensação e desidrogenação ³⁸.

Deve ser distinguido da benzina, que é produto de destilação do petróleo constituído de mistura de hidrocarbonetos, contendo de 5 a 7 carbonos, em proporções variáveis. O benzol é mistura de 75 % de benzeno, 15 % de tolueno e de 9 % de xileno ⁶⁴.

O conhecimento das propriedades físico-químicas de um composto é importante para o delineamento dos fatores que condicionam a disponibilidade química e a biodisponibilidade da substância. A alta volatilidade do benzeno, em função da pressão de vapor (74,66 mmHg a 20°C), e seu ponto de ebulição relativamente baixo (80°C) são características responsáveis por sua rápida evaporação, podendo resultar em altas concentrações ambientais.

Algumas de suas propriedades físico-químicas são ^{13,26,39,53,66,74}.

- nome químico e sinônimos : benzeno, ciclo-hexatrieno, benzol, pirobenzol;
- fórmula molecular: C_6H_6 ;

- estado físico: líquido, incolor, volátil;
- peso molecular: 78,11 (C-92,25%; H-7,75%);
- solubilidade: 1,780 mg/L (água a 25 °C);
- solventes orgânicos: álcool, clorofórmio, éter, acetona, tetracloreto e dissulfeto de carbono e óleos;
- coeficientes de partição: 2,13-2,15 (log K/ octanol-água)
1,8-1,9 (log K/ carbono orgânico);
- limites de inflamabilidade: 1,3 a 7,1 (% em volume no ar);
- fator de conversão: 1 ppm= 3,2 mg/m³ (a 20°C, a 1 atm);
- ponto de fusão: 5,5 °C;
- ponto de ebulição: 80,1 °C (1 atm=760 mmHg);
- pressão de vapor: 74,66 mmHg a 20 °C;
- temperatura e pressão críticas: 288,5 °C/ 47,7 atm;
- densidade específica: 0,878 a 20 °C;
- limite de odor: 2,0 mg/L (água) e 1,5 – 4,7 ppm (ar);

O benzeno reage violentamente em contato com substâncias químicas de vários tipos, como o ácido nítrico, fluoretos e percloratos ²⁶.

2.2 USOS E FONTES DE EXPOSIÇÃO

O uso do benzeno no Brasil vem diminuindo progressivamente em virtude da proibição de sua utilização como solvente industrial ²⁵.

Este hidrocarboneto, no entanto, ainda apresenta sério risco ocupacional para milhares de indivíduos, estimando-se a utilização global média de 32 milhões de toneladas por ano. Cerca de 14 milhões de toneladas são do composto puro e o remanescente é originado de vários produtos de destilação, tais como a benzina, gasolina, querosene e óleo combustível. Estima-se que 4 milhões de toneladas são dispersas anualmente no ambiente ³⁶.

As principais fontes de exposição ao benzeno incluem a exaustão e as operações de abastecimento de veículos, as emissões industriais e o hábito de fumar, destacando-se nos estudos de avaliação de poluição ambiental ³⁰.

A fumaça do cigarro é uma das principais fontes de exposição não ocupacional ao benzeno. Segundo BRUGNONE *et al.* (1992) ²⁸, em ambientes fechados como as residências, as concentrações de benzeno podem atingir níveis de 500 $\mu\text{g}/\text{m}^3$. Os fumantes inalam, em média, aproximadamente 1800 μg de benzeno/dia, comparados aos 50 $\mu\text{g}/\text{dia}$ dos não-fumantes. Os níveis sanguíneos de benzeno entre os fumantes, diretamente proporcionais ao número de cigarros fumados, são 90% superiores aos dos não-fumantes.

Nos Estados Unidos, mais de 90% do benzeno produzido se origina do petróleo, a partir dos processos de refino, da queima da gasolina e da hidroalquilação do tolueno. Na Califórnia, 70% dos vapores emitidos são provenientes de exaustão de veículos automotivos. Já na Europa Ocidental, cerca de 55% das emissões para a atmosfera são atribuídos à combustão da

gasolina, 10% à queima do carvão e o restante aos processos de transformação catalítica e hidroalquilação do tolueno ¹³.

Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), *apud* PEZZAGNO (1995) ⁹³ nos últimos anos somente 1% de trabalhadores estão expostos, mundialmente, a níveis de concentrações ambientais de benzeno superiores a 32 mg/m³. Em torno de 60% dos trabalhadores estão expostos a concentrações ambientais de benzeno inferiores a 0,32 mg/m³, cerca de 30%, entre 0,33 e 1,6 mg/m³; 5% ,entre 1,6 e 3,3 mg/m³ e 4%, a valores entre 3,3 e 16,1 mg/m³. Em conclusão, 95% dos trabalhadores expostos ao benzeno se expõem a teores limitados a 3,2 mg/m³.

No Brasil, antes da proibição da fabricação de produtos contendo benzeno em concentrações superiores a 1% em volume ²⁵, as indústrias misturadoras de solvente o utilizavam em larga escala para produção de solventes comerciais e produtos formulados. Estes, por sua vez, eram usados nas indústrias gráficas, de calçados e couros, de colas, de tintas e vernizes, em oficinas mecânicas e em serviços de pintura, entre outros. O benzeno contaminava o ambiente pela evaporação, a partir dos solventes que o continham ³².

O benzeno também pode ser encontrado na gasolina automotiva, como impureza ou como um componente de misturas carburantes. O fato de a gasolina ser utilizada como solvente de limpeza, em ambientes caseiros, indústrias gráficas e oficinas mecânicas amplia o problema da exposição.

Os teores de benzeno na gasolina não têm sido analisados ou controlados, exceto para a gasolina de exportação, na qual os resultados mostram em torno de 0,8 a 1,0 % ³².

Os laboratórios químicos, farmacêuticos e biológicos também podem utilizar o benzeno, na sua forma pura ou em misturas, em atividades analíticas específicas. Nestes ambientes a contaminação por benzeno, considerando-se a via respiratória, pode se dar em virtude da inexistência ou funcionamento irregular das capelas de exaustão, manipulação de produtos fora de capelas, descarte inadequado de resíduos contendo benzeno, derramamentos acidentais, destilação do benzeno, usos em análises cromatográficas e procedimentos que o utilizam como solvente extrator, entre outros.

No Brasil, a partir de 1^o de janeiro de 1997, de acordo com o Anexo 13-A, da norma Regulamentadora nº15/Portaria 3214 do Ministério do Trabalho, ficou proibida a utilização desta substância para qualquer emprego, exceto em indústrias e laboratórios que o produzam; ou que o utilizem em processos de sínteses químicas ou em trabalhos de análise quando não é possível sua substituição; ou ainda o usem como azeótropo na produção de álcool anidro até possibilidade de substituição; ou o empreguem combustíveis derivados de petróleo²⁶.

A Figura 1 demonstra esquematicamente a distribuição do benzeno no Brasil, desde a produção até o consumo.

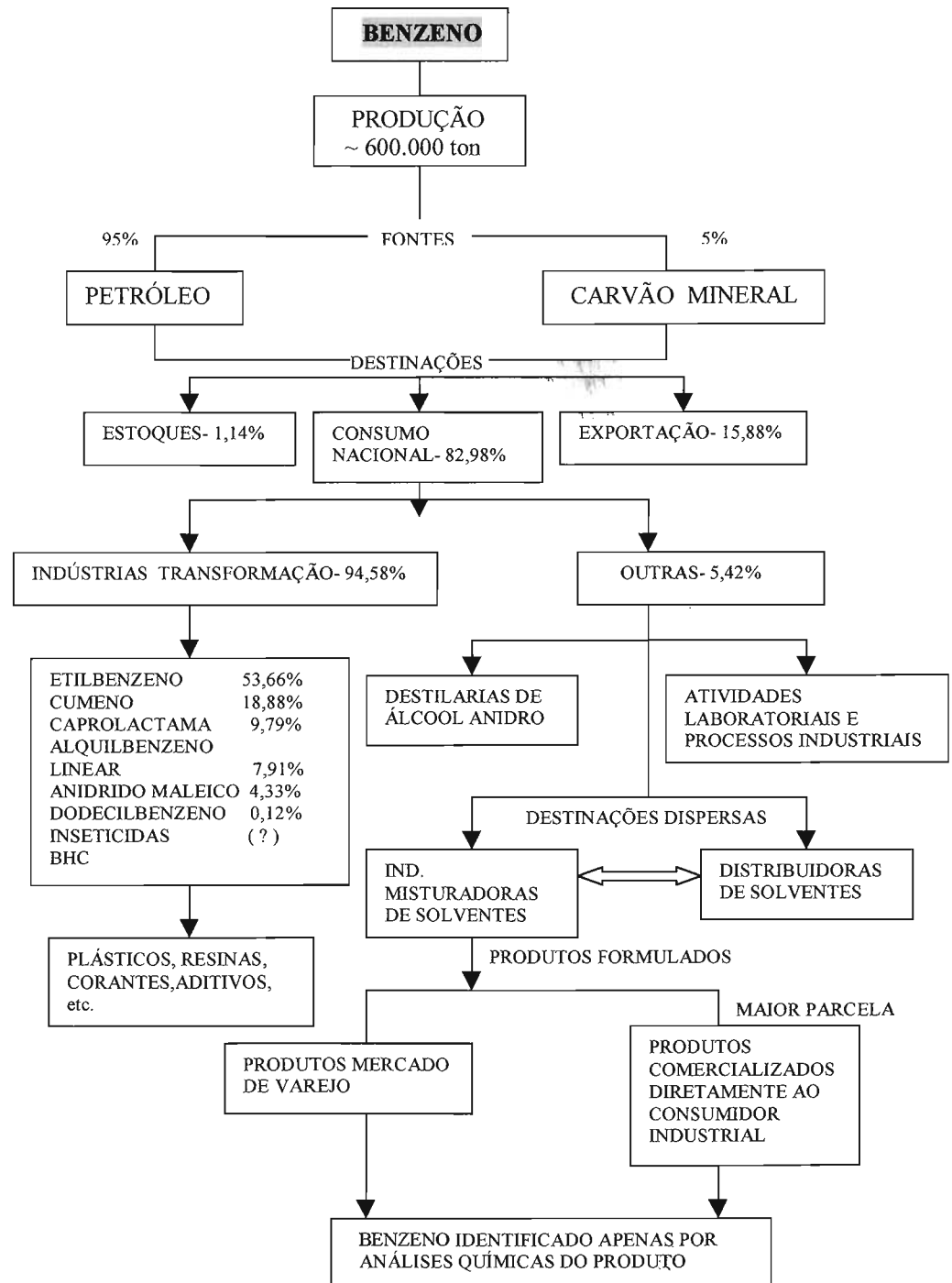


FIGURA 1- Produção, destino e consumo do benzeno no Brasil

Fonte: CARVALHO, A . B. *et al.*, 1995 ³², modificado

2.3 TOXICOCINÉTICA

Nas exposições ocupacionais o benzeno é absorvido pelas vias cutânea e pulmonar. A mais freqüente via de introdução é a respiratória, através da inalação dos vapores; entretanto, a absorção cutânea pode se dar com velocidade de 0,4 mg/cm²/h pela pele íntegra. Os efeitos tóxicos têm sido, muitas vezes, imputados à absorção combinada através da pele e das vias aéreas³⁸.

Em humanos, a quantidade que é absorvida através da pele, no contato direto com o líquido, pode ser considerável; contudo, representa 5% do que é absorvido na forma de vapor pelos pulmões^{38,80}.

O composto é rapidamente absorvido, por inalação ou por ingestão, e valores máximos de concentração nos tecidos são obtidos após 3 horas cessada a exposição⁶⁴. Os níveis de retenção de benzeno nos pulmões são bastante variáveis em função de sua concentração no ambiente e do tempo de exposição.

Cerca de 65-75% do benzeno inalado é absorvido ao nível pulmonar³¹ e o equilíbrio entre a concentração no ar expirado e no sangue é lentamente alcançado. Cessada a exposição, a fração que ficou retida nos pulmões é excretada, inalterada, pelo ar exalado^{38,64}.

A absorção total (Q), como mostra a equação abaixo, é função de três parâmetros: a concentração ambiental (C_{ar}), a ventilação pulmonar (V) e o índice de retenção (R)⁹³ que, para o benzeno, é praticamente constante e igual a 0,5,

$$Q = C_{ar} \times V \times R$$

Alguns fatores podem condicionar a quantidade de benzeno absorvida. A alimentação rica em frutas, peixes, vegetais e ovos, entre outros, pode ser fonte natural de benzeno; os ovos podem conter entre 500 e 1900 µg/ kg. Também pode ser encontrado na água potável, fonte responsável por 0,01 a 0,5 µg da quantidade absorvida ^{10,31,38,104,105}.

O tráfego de veículos também é responsável por exposição ao benzeno, tanto que em populações rurais a concentração de benzeno no sangue é mais baixa do que em populações urbanas ¹⁰.

O hábito de fumar representa a maior fonte individual de benzeno para a população geral, não-exposta ocupacionalmente. A concentração alveolar de benzeno em fumantes correlaciona-se com a concentração ambiental do solvente, com o número de cigarros fumados e com o tempo decorrido do último cigarro. No local de moradia de um fumante, a concentração ambiental de benzeno é 30 a 50% maior do que na de um não-fumante. O fumo aumenta em 5-20 vezes a concentração urinária de benzeno ^{10,28,38,52}.

Alguns *hobbies* podem incrementar a concentração de benzeno, como o contato doméstico com produtos como cola, tintas, vernizes e até mesmo em atividades de jardinagem, onde se empregam utensílios movidos a combustíveis que podem conter este solvente ¹⁰.

Finalmente, a atividade física influencia a absorção do benzeno, já que a maior porcentagem é absorvida pelos pulmões. Aumento na ventilação pulmonar, causada por atividade média ou elevada poderia aumentar a absorção em 50-100% quando comparada ao repouso ¹⁰.

Cerca de 10 a 50% do benzeno inalado é imediatamente eliminado pela respiração e o restante é absorvido e distribuído de acordo com o coeficiente de partição tecido/sangue e com o fluxo sanguíneo. Uma vez no sangue, o benzeno atinge principalmente o sistema nervoso central e sua distribuição em

outros órgãos e tecidos varia com o tempo decorrido após a exposição. Os tecidos ricos em lipídios (fígado, baço, medula óssea e lipoproteínas sangüíneas) são os mais atingidos, funcionando como um reservatório, do qual a eliminação do composto é lenta ³⁸.

Enquanto as evidências experimentais sugerem que o fígado é o principal órgão envolvido na biotransformação do benzeno, a medula óssea é o principal alvo de seu efeito tóxico, acumulando-se aí os produtos de biotransformação gerados no hepatócito ³⁸.

A distribuição do benzeno e seus produtos de biotransformação para a medula óssea é atribuída ao seu alto coeficiente de partição tecido/sangue e à baixa vascularização do tecido gorduroso. São reportados, em coelhos, os seguintes coeficientes de partição tecido/ sangue: fígado 1,6; rins 1,1; cérebro 1,9; pulmões 1,3; coração 1,4; músculo femural 1,1; medula óssea 16,2 e tecido adiposo 58,5 ³⁸.

Para entender o mecanismo de ação do benzeno é essencial estudar sua biotransformação, o que é um pré-requisito para avaliar a especificidade de um biomarcador. Produtos de biotransformação do benzeno que aparecem na urina incluem conjugados dos derivados fenólicos com ácido glicurônico e sulfato, ácido trans, trans- mucônico, resultante da abertura do anel benzênico e ácidos mercaptúricos, resultantes da conjugação com a glutathione ¹⁰⁴.

MEDINSKY *et al.* (1989) ⁸¹ publicaram um modelo de simulação da biotransformação do benzeno, usando ratos e camundongos. Os resultados sugerem que camundongos biotransformam mais o benzeno do que ratos após a inalação do composto. Todavia, após administração oral, ratos biotransformam mais o benzeno. Os camundongos formam maior quantidade de derivados da hidroquinona, tanto na exposição oral quanto na respiratória em relação aos ratos.

Usando os parâmetros obtidos para camundongos, que são as espécies mais susceptíveis, a biotransformação do benzeno em humanos foi simulada para exposição de 8 horas a várias concentrações. Os resultados indicaram que, em exposições abaixo de 10 ppm, a biotransformação do benzeno e a formação de produtos individuais são linearmente relacionados à concentração inalada. Em níveis acima de 10 ppm, este modelo prediz mudança, com proporção aumentada dos produtos de detoxificação quando comparado aos produtos potencialmente tóxicos. Esta simulação sugere que, para um valor de TLV-TWA de benzeno no ambiente de 1 ppm, a quantidade total de produtos potencialmente tóxicos não é proporcional às quantidades formadas em exposições elevadas ⁸¹.

A biotransformação do benzeno tem sido bem estudada e há mais de 100 anos sabe-se que ele é convertido a fenol, catecol e hidroquinona; em 1953, PARKE & WILLIAMS ⁹¹ reportaram a ocorrência dos ácidos fenilmercaptúrico e trans, trans- mucônico.

Os estudos têm-se concentrado, nos últimos anos, na biotransformação do benzeno em várias espécies, no seu mecanismo usando técnicas *in vitro* e na relação entre a biotransformação e a toxicidade ^{38,87}.

O benzeno absorvido é biotransformado no fígado e, em menor proporção, na medula óssea. A primeira reação é catalisada pela oxidase microssômica formando o benzeno-epóxido, intermediário reativo que, ou se liga diretamente a constituintes celulares (ex. DNA e proteínas) ou se transforma em outros derivados. Suspeita-se que o benzeno epóxido seja o responsável pela ação mielotóxica do benzeno ⁶¹.

Esse composto pode ser transformado não-enzimaticamente em fenol, que muitas vezes se conjuga com sulfato ou ácido glicurônico. Alguns autores sugerem ainda que o fenol pode ser formado pela inserção de um radical livre à molécula do benzeno. Seja qual for a formação, o fenol sofre hidroxilação

aromática, produzindo o quinol e o catecol que são, respectivamente, transformados em *p*-benzoquinona e triidroxibenzeno. Os glicuronídeos e os sulfoconjugados do fenol são excretados na urina ^{38,61,87}.

O benzeno-epóxido pode ainda reagir com a glutatona, sendo o produto formado chamado glutatona S1. A ação subsequente da glutatona S-transferase, na presença de um aceptor glutamina, a peptidase e a acetilCoa acetiltransferase, resulta na formação do ácido pré-mercaptúrico, o qual é posteriormente excretado como ácido S-fenilmercaptúrico na urina. O epóxido pode também, através da enzima epóxidohidrolase, formar o benzeno dihidrodiol que, após a ruptura do anel, é biotransformado a trans, trans- muconaldeído e subsequente a ácido trans, trans-mucônico, os quais são excretados na urina ^{38,61,87,104}.

JOHNSON & LUCIER (1992) ⁵⁷ sugeriram uma meia-vida biológica curta do ttAM, em humanos, de cerca de 6 horas.

Provavelmente, quinonas e semiquinonas são os produtos finais dentro os de anel intacto e o ácido trans, trans-mucônico, o produto final dentro os de cadeia aberta ¹⁰⁴.

A Figura 2 mostra a biotransformação do benzeno em humanos.

Estudos experimentais mostram que pode haver interação na biotransformação, principalmente hepática, entre o benzeno e o tolueno, ou seja, a co-administração *in vivo* do tolueno causa a redução da excreção urinária dos metabólitos do benzeno ^{10,31,38}.

Alguns autores relatam que há aumento da biotransformação do benzeno a fenol em indivíduos que fazem uso de fenilsalicilatos. Outras substâncias também podem interferir nesta biotransformação, como o etanol

que age acelerando as reações de oxidação da fase I, podendo resultar em maior concentração de produtos reativos ¹⁰.

Há variações neste efeito com relação à quantidade e ao tempo de uso da bebida: única dose pode trazer efeito inibitório, mas doses administradas em tempo prolongado podem, ao contrário, aumentar a biotransformação, tanto deste composto quanto dos demais, de baixo peso molecular. A interferência metabólica do etanol, *in vivo*, é aumentada quando a redução do conteúdo de carboidratos está associada à dieta ¹⁰.

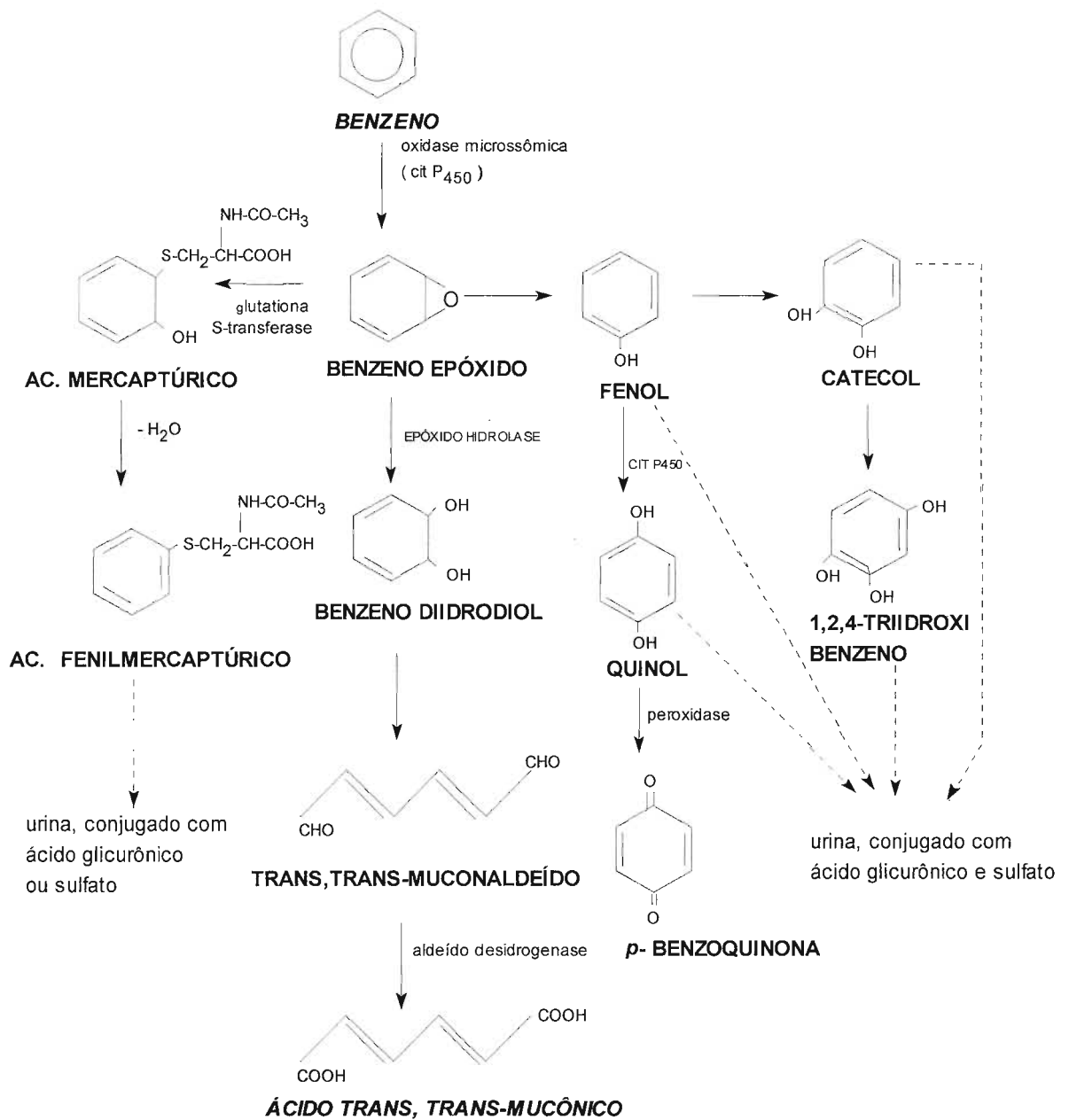


FIGURA 2- Biotransformação do benzeno

Fonte: LEITE, E.M.A. (1996)⁷⁰, modificado

Estudos de biotransformação deveriam incluir a análise dos produtos biotransformados na urina e a determinação de atividades de enzimas hepáticas e medulares; isto identificaria as mudanças enzimáticas que alteram a formação e a excreção dos metabólitos do benzeno em resposta às exposições repetidas e também avaliaria os efeitos da exposição crônica sobre as ações de enzimas ⁴².

Tanto humanos quanto animais podem eliminar, inalterado pelo ar exalado, cerca de 3,8 a 27,8% do benzeno absorvido pelo organismo ⁸⁷. Após exposição única, observa-se eliminação pulmonar gradual que ocorre em três fases distintas, caracterizando a cinética do benzeno pelo modelo tricompartmental. A primeira fase de excreção pulmonar representa a eliminação do solvente nos pulmões e no sangue e tem meia-vida de 90 minutos; a segunda corresponde à eliminação do benzeno presente nos tecidos moles e ocorre de 3 a 7 horas após a exposição; a terceira representa principalmente a eliminação do solvente concentrado no tecido adiposo, com meia-vida de cerca de 25 horas.

A eliminação está inversamente relacionada ao fluxo sangüíneo, sendo o tecido adiposo o compartimento que menos libera o solvente, não havendo diferenças significativas entre homens e mulheres. Porém, menor eliminação do benzeno ao nível pulmonar foi observado em espécies do sexo feminino, o que pode estar relacionado à quantidade maior de tecido adiposo neste sexo ^{31,38}.

A maior parte do benzeno absorvido sofre biotransformação e a proporção dos produtos formados depende de fatores individuais e do tipo de exposição. Em exposições ocupacionais, observa-se, em média, a excreção urinária de 15 a 25% de fenol, 4% de hidroquinona e catecol, 1,5 % de ácido fenilmercaptúrico e 2% de ácido trans, trans-mucônico. Apenas 0,1 a 0,3% de benzeno inalterado é detectado na urina ⁸⁷.

A excreção do fenol, principal produto de biotransformação do benzeno, ocorre em duas fases, sendo que a primeira, ocorre cerca de 4,5 horas após o final da exposição, corresponde à maior parte do solvente biotransformado e a segunda, bem mais lenta, tem duração de \pm 24 horas^{31,93}.

A excreção dos metabólitos é usualmente completa dentro de 24-48 horas após exposição única, o que representa uma meia-vida biológica de aproximadamente 12 horas⁸⁷.

Cerca de 5 a 10% da dose administrada em animais é excretada com as fezes, sendo aproximadamente 1% por excreção biliar⁶⁴.

Na exposição ao BTX, os produtos excretados são aqueles resultantes da biotransformação do benzeno, tolueno e xileno; devido à interferência metabólica entre estes solventes, todos os produtos de biotransformação do benzeno são diminuídos^{31,38}.

2.4 TOXICODINÂMICA

É consenso afirmar que os efeitos adversos do benzeno são, em parte, imputados à sua biotransformação: dados experimentais *in vivo* e *in vitro* mostram o envolvimento de um ou vários produtos capazes de se ligar às macromoléculas.

Além da irritação da pele e de mucosas, a principal ação tóxica do benzeno, em exposições agudas, resulta em depressão do SNC. Este composto apresenta também propriedades radiomiméticas, ou seja, pode gerar radical livre de oxigênio, o que explicaria várias de suas ações tóxicas.

Em exposições crônicas, destaca-se a ação mielotóxica, em que fenol, hidroquinona e muconaldeído estão envolvidos. A transferência destes metabólitos para a medula óssea, onde se ligariam covalentemente às macromoléculas impedindo a produção e/ou a maturação das células sangüíneas iniciais, é uma das teorias propostas para explicar esta ação. Posteriormente, há progressiva degeneração e aplasia medular. A extensão destas alterações depende de fatores individuais, intensidade e duração da exposição. As alterações hematológicas aparecem após meses ou anos de exposição^{31,41}.

Vários tipos de aberrações cromossômicas são produzidas pelo benzeno, ainda que por mecanismo não bem esclarecido. Outros mecanismos, como a inibição da síntese do DNA e RNA, alquilação das sulfidrilas celulares, alteração do ciclo celular, fenômeno de estresse oxidativo e formação de radical livre, entre outros, são propostos para explicar a ação mielotóxica do benzeno^{19,31,46}.

A hidroquinona, formada durante a biotransformação, tende a acumular-se na medula e a presença de um outro produto, o fenol, favorece a conversão da hidroquinona em *p*-benzoquinona responsável pela carcinogênese e a leucemogênese⁴¹.

Evidências epidemiológicas demonstram que exposições crônicas a elevadas concentrações de benzeno podem desencadear episódios de leucemia, até mesmo anos após o término da exposição ocupacional. Em humanos, há relação causal entre a exposição ao solvente e a ocorrência da leucemia, do tipo mielogênica aguda, caracterizada pelo aumento de células morfológicamente semelhantes aos mieloblastos^{38,112}.

Alguns autores sugerem que o desenvolvimento da leucemia ocorre devido à combinação entre fatores intrínsecos e a exposição ambiental; assim,

a susceptibilidade individual deve ser considerada como um dos principais fatores no desenvolvimento do processo crônico de intoxicação benzênica ².

O benzeno está classificado pela *International Agency for Research of Cancer* (IARC) ⁵⁴ como carcinogênico do grupo I (há suficientes evidências de carcinogênese em animais e na espécie humana).

Segundo CANDURA *et al.* (1995) ³¹, a medula óssea contém baixa concentração de citocromo P₄₅₀ e alta de mieloperoxidase, enzima da qual fenol, catecol e hidroquinona são substratos. Estes metabólitos se oxidam gerando radicais intermediários altamente reativos, como por exemplo a semiquinona. O fígado, apesar de ser o principal órgão de ativação metabólica, não é alvo do benzeno. Isto pode ser explicado pela existência, no tecido hepático, de enzimas que impedem a formação de elevadas quantidades de intermediários reativos. Um outro fator importante é que o fígado contém uma alta quantidade de enzimas da fase II (enzimas de conjugação), que asseguram uma eficiente detoxificação local e uma rápida excreção dos conjugados com a bile.

É importante observar que os produtos de biotransformação do benzeno potencializam a ação de agentes que depletam a glutatona, podendo assim o efeito ser sinérgico ¹⁰⁴.

Estudos atuais mostram que o aldeído mucônico possui ação genotóxica e hematotóxica, podendo desempenhar papel significativo na ação carcinogênica do benzeno ³¹.

A exposição crônica ao benzeno pode ainda ativar a proteína C-quinase (PCK), enzima que participa de processos de transdução intracelular e de controle de crescimento celular. A ativação da PCK pode determinar uma excessiva fosforilação oxidativa de proteínas celulares que levam proliferação celular alterada ³¹.

Outros estudos ainda demonstram que o benzeno-epóxido tende a formar adutos com o resíduo valina da hemoglobina humana. É possível que, dependendo do nível de exposição, este metabólito seja altamente biotransformado e detoxificado no seu local de formação, limitando sua passagem para a circulação sistêmica e a conseqüente interação com macromoléculas³¹.

2.5 EFEITOS TÓXICOS

Efeitos agudos

O benzeno líquido é potente irritante das mucosas e sua aspiração provoca edema pulmonar e hemorragia nas áreas de contato. Os vapores, em altas concentrações, são também irritantes para as mucosas ocular e respiratória. A absorção do benzeno provoca efeitos neurotóxicos centrais de intensidades proporcionais às quantidades absorvidas: narcose, excitação seguida de sonolência, vertigem, cefaléia, náuseas, taquicardia, dificuldade respiratória, tremores, convulsões, perda de consciência e morte^{31,74}.

O benzeno possui efeitos neurotrópicos não específicos, como os demais solventes voláteis lipofílicos que se fixam nos centros nervosos, mais particularmente, na medula e no bulbo. Pode apresentar também uma miocardiotoxicidade, caracterizada por arritmia e fibrilação ventricular, provavelmente devida à sensibilização da fibra às catecolaminas endógenas⁷⁴.

Em caso de morte por intoxicação aguda, verifica-se inflamação no trato respiratório, hipoplasia ou hiperplasia da medula óssea, congestão dos rins e edema cerebral^{74,105}.

A concentração tóxica mínima (CTM₀) e concentração letal mínima (CLM₀) do benzeno, por inalação, estimada em humanos é de 100 ppm e 2000 ppm/5min, respectivamente ⁷⁴.

Efeitos crônicos

Atualmente, ainda é difícil estabelecer uma correlação direta entre as concentrações do benzeno, o tempo de exposição e as formas graves de intoxicação crônica, considerando a influência de outros fatores, como a susceptibilidade individual, na expressão da toxicidade do benzeno ¹³.

A intoxicação crônica - decorrente de exposições por tempo prolongado a baixas concentrações - é chamada de benzenismo ou benzolismo e caracteriza-se por:

- **alterações hematológicas:** efeito unicamente do benzeno, quando comparado a outros hidrocarbonetos aromáticos simples, associado a exposições ≥ 50 ppm no ambiente de trabalho ¹⁰⁵. REVOL & GERARD (1969) ⁹⁷ reportaram que a síndrome estava relacionada às leucoses agudas e, mais raramente, a leucemias crônicas ou síndromes mieloproliferativas.

As manifestações clínicas relacionadas aos efeitos medulares do benzeno refletem-se na funcionalidade da série branca (gingivite, estomatite, baixa resistência a infecções), da série vermelha (anemias) e da plaquetária (púrpuras, sangramentos), até o quadro fatal de aplasia medular observada na fase avançada do benzenismo ³².

As alterações morfológicas celulares no sangue periférico são do tipo quantitativo e qualitativo: leucopenia, neutropenia, eosinofilia, linfocitopenia, anemia, plaquetopenia, linfocitose e macrocitose, entre outras ⁷⁴.

AUGUSTO (1993) ¹¹ avaliou 61 trabalhadores com neutropenia e sem antecedentes de utilização de medicamentos mielotóxicos nos seis meses precedentes. O estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a evolução do quadro hematológico periférico com a intensidade das alterações quantitativas observadas nas células da medula óssea. Verificou-se que 98% dos trabalhadores apresentaram alterações, tais como aumento do tecido gorduroso, focos de necrose, edema e hemorragia intersticial e fibrose.

Na medula óssea são observadas alterações no tecido estromal (necrose, edema, hemorragia e presença aumentada de eosinófilos, plasmócitos, monócitos) e nas células de hematopoiese (alterações quantitativas e qualitativas). Os registros mais freqüentes de alterações encontradas na medula óssea de trabalhadores brasileiros intoxicados por benzeno são hipocelularidade do setor granulocítico e a presença de micromegacariócitos ^{41,74}.

Não há correlação entre a intensidade das alterações centrais e as observadas no sangue periférico. O tempo médio para a normalização dos níveis de leucócitos totais e/ou neutrófilos é de 5 anos, após o afastamento da exposição, sendo que grande número de intoxicados permanece com alterações mesmo após esse período. Isto demonstra que há compensação hematimétrica do sangue periférico, o que não significa plena recuperação das células primitivas danificadas. São fundamentais os estudos em animais, para estabelecer a relação dose-efeito entre exposição ao benzeno e depressão na hematopoiese e/ou incidência de leucemia ⁴¹.

- **neoplasias:** os resultados dos experimentos com animais e dos dados epidemiológicos suportam a hipótese de que o benzeno é promotor de tumores, provocando hiperplasia e crescimento de células ^{23,41,108}.

Embora a leucemia atribuída ao benzeno possa ser de qualquer tipo, a mais freqüentemente observada é a aguda, que pode aparecer durante a

exposição ou após longo período de latência, sendo, algumas vezes, revelada poucas semanas antes da morte ³².

AKSOY (1980) ¹ em estudo realizado com trabalhadores expostos ao benzeno, observou que em 26% dos leucêmicos existia um período pancitopênico. Os tipos mais freqüentes de leucemia foram a mieloblástica aguda, a eritroleucemia aguda e a pré-leucemia, distribuição esta significativamente diferente do grupo de leucêmicos sem exposição ao benzeno. Alguns pacientes também apresentavam outros carcinomas, como o de pulmão, e estes achados levaram-no a sugerir que o benzeno não só causa leucemia como também outros tipos de tumores.

Confirmando esse achado, estudos mais recentes mostram que as seguintes neoplasias podem estar relacionadas à exposição ao benzeno: doença de Hodgkin, câncer de pulmão, mieloma múltiplo, cânceres de estômago, esôfago, intestino e nasofaringe ³².

- **alterações neurocomportamentais:** a presença de alterações neurocomportamentais ou neuropsicológicas, crônicas ou agudas, quando há exposição a solventes têm sido relatadas. Entretanto, não há muitos estudos que tratem do benzeno enquanto substância pura.

LOCATELLI *et al.* (1995) ⁷⁴ reportaram distúrbios neuropsiquiátricos tais como: astenia, cefaléia, anorexia, insônia, vertigem e agitação. Este autor descreve ainda que são observados casos isolados de polineurite periférica e mielite transversa.

Sabe-se que, em exposições crônicas concomitantes ao benzeno e ao tolueno, podem ocorrer sensação de inadequação e resposta emocional exacerbada. Seguem-se sintomas de depressão moderada e irritabilidade, cefaléia e redução da eficiência no trabalho, além de distúrbios do sono. Síndromes obsessiva, compulsiva ou maníaco-depressiva também podem

surgir, dependendo da personalidade do indivíduo. Os testes periódicos revelam redução das funções cognitivas, da memória e da atenção ³³.

Além destas síndromes, têm sido relatados distúrbios psicossomáticos, encefalopatia crônica, alterações neuronais que resultam em daltonismo adquirido ou disacusia ³².

- **alterações mutagênicas:** estudos da ação do benzeno sobre o sistema reprodutor, detectaram efeitos sobre a espermatogênese, tendo os machos se mostrado mais susceptíveis que as fêmeas.

Os efeitos genotóxicos são devidos aos produtos de biotransformação que interagem sinergicamente produzindo mutação gênica, cromossômica e genômica ¹². LIU *et al.* (1996) ⁷³ detectaram danos oxidativos no DNA em trabalhadores expostos ao benzeno.

A literatura não indica se baixos níveis de exposição benzênica são definitivamente fator de risco na indução da troca de cromátides irmãs e se o consumo de bebidas alcoólicas e o hábito de fumar interferem na incidência desta síndrome ²⁰.

Apesar da subnotificação de benzenismo no Brasil, pode-se observar na Tabela 1 o número significativo de trabalhadores afastados das empresas, no ano de 1993, em alguns estados do país ³².

TABELA 1- Trabalhadores afastados, com diagnóstico de intoxicação benzênica, em alguns estados do Brasil, segundo instituições públicas.

estado	empresa	nºde trabalhadores afastados	Fonte	período compreendido
Bahia	Indústrias do pólo Petroquímico de Camaçari, Petrobrás e empreiteiras	351	Unidade de Saúde do Trabalhador de Camaçari (USAT)- Centro de Estudos de Saúde do Trabalhador (CESAT)	Maior/ 1991 a junho/ 1993
Espírito Santo	Companhia Siderúrgica de Tubarão e empreiteiras	18	Instituto Nacional de Seguro Social (INSS) e Delegacia Regional do Trabalho (DRT)	1990 a 1992
Minas Gerais	Ind. Siderúrgica, Metalúrgica e de materiais elétricos	97	Núcleo de Saúde do Trabalhador (NUSAT)	1989 a 1992
Rio de Janeiro	Companhia Siderúrgica Nacional	714	INSS e Secretaria Municipal de Saúde de Volta Redonda	1985 a junho 1993
São Paulo	Companhia Siderúrgica Paulista e empreiteiras, Petroquímica União	2147	Secretaria Estadual de Saúde, INSS e Secretaria Municipal de Saúde de Sto. André	1983 a 1993
Piauí	VEGETEX	04	Sub- DRT- Parnaíba	1982
Total		3331		

Fonte: CARVALHO, A.B. *et al* (1995)³² - modificado

2.6 MONITORIZAÇÃO BIOLÓGICA

A monitorização biológica, definida como “a medida e avaliação de agentes químicos ou de seus produtos de biotransformação em tecidos,

secreções, excreções, ar exalado ou alguma combinação destes, para estimar a exposição e o risco à saúde, quando comparados com uma referência apropriada”¹⁸, encontra dificuldades de ordem analítica, em virtude da falta de sensibilidade dos métodos que são utilizados para sua execução quando as exposições ocorrem em baixas concentrações¹⁰⁰.

Entretanto, muitas vezes depara-se com a falta de especificidade do indicador biológico, este sim um problema difícil de ser resolvido. Bioindicadores, como o ácido trans, trans-mucônico (ttAM) e o ácido S-fenilmercaptúrico (S-AFM), têm um futuro promissor por detectarem a carga corpórea de benzeno resultante de diversas fontes, conhecidas ou não^{22,57}.

Atenção especial deve ser dada não só ao momento da coleta das amostras, já que a meia-vida biológica do benzeno e de seus produtos de biotransformação é baixa, como também à interpretação dos resultados, quando se faz necessário considerar os possíveis fatores que interferem na avaliação, tanto na determinação deste solvente e seus produtos^{87,100}.

A metodologia usada para a determinação do benzeno no ar exalado, no sangue e de seus produtos de biotransformação na urina, ainda é amplamente discutida⁷.

Biomarcadores de dose interna

Os bioindicadores de dose interna - aqueles que apresentam boa correlação com a quantidade absorvida e aplicabilidade para a realização da monitorização biológica do benzeno - são: em urina, fenol, catecol, quinol, triidroxibenzeno, ácido trans, trans-mucônico e ácido S-fenilmercaptúrico; em sangue, urina e ar exalado, o benzeno inalterado.

- **fenol na urina:** o fenol é, quantitativamente, o principal produto de biotransformação do benzeno. Este composto e seus conjugados já foram

bastante utilizados, porém, devido à falta de especificidade e de sensibilidade, a determinação do fenol na urina não é mais recomendada para as avaliações de rotina de exposições ocupacionais ^{66,87,100}.

Até 1996, a literatura reportava valores em torno de 50 mg/g creatinina para um TWA em torno de 10 ppm ou 32 mg/m³ como índice biológico de exposição ^{4,66,68}. A coleta deveria ser realizada após 2 dias de trabalho e em duas amostras, sendo a primeira no início da jornada e a segunda ao seu término, por cromatografia gasosa ou por cromatografia líquida de alta eficiência ²⁴. São reportados valores de referência de 20 mg/g creatinina, os quais também podem ser observados em exposições a 3,2 mg/m³ de benzeno ^{66,68}.

Com as propostas de mudança dos níveis de exposição ambiental, ficou evidente que o fenol não poderia ser utilizado como bioindicador para exposição a tal substância, salvo em exposições superiores a 10 ppm.

- **catecol, quinol e triidroxibenzeno:** são produtos secundários de biotransformação do benzeno ainda pouco estudados ^{87,100}. Segundo ONG & LEE (1994) ⁸⁷, exposições a 10 ppm podem ser relacionadas a 17,3 mg/g creatinina de catecol e 59,4 mg/g creatinina de quinol, sendo os dois produtos de difícil separação cromatográfica.

- **ácido trans, trans-mucônico:** é detectado na urina de animais e humanos expostos ao benzeno. É produto de biotransformação secundário, derivado da abertura do anel benzênico, sendo excretado na proporção de 2%. Estudos com trabalhadores expostos revelam correlação linear entre o ttAM urinário e a concentração ambiental do solvente, podendo ser evidenciado na urina quando as concentrações ambientais de benzeno são superiores a 0,5 ppm. Portanto, pode ser um valioso marcador da exposição a tal substância ^{7,58,82,86,113}.

Este biomarcador não é específico da exposição benzênica, podendo ser originado após a ingestão de sorbatos em geral, aditivos presentes em grande variedade de alimentos. Pode, ainda, sofrer interferência metabólica quando há exposição concomitante ao tolueno e, nesta situação, ocorre menor excreção de ttAM. Os fumantes têm maiores teores urinários do ácido trans, trans-mucônico quando comparados aos não-fumantes ^{72,80,82,87,100,102,111}.

Ainda não foram determinados os valores de referência (VR), nem tão pouco um valor limite para o ttAM. Valores médios reportados para exposições a 1 ppm de benzeno variam entre 0,9 e 1,9 mg/g creatinina ^{47,58,65,102}. Em indivíduos não-expostos, SCHERER *et al.* (1998) ¹⁰² cita um valor médio de 0,14 mg/g creatinina. A ACGIH[®] reporta, como intenção de mudança, a determinação desta substância, propondo como índice biológico de exposição o valor de 0,5 mg/g creatinina, sendo a amostra coletada no final do turno de trabalho ⁶.

Em comparação com outros biomarcadores para a exposição ao benzeno, o ttAM oferece vantagens, mas em níveis muito baixos de exposição, os fatores interferentes necessitam ser levados em consideração ¹⁰².

- **ácido fenilmercaptúrico**: é formado a partir do benzeno-epóxido e sua eliminação urinária é em torno de 1,5 a 2%, da quantidade de benzeno absorvida ⁸⁷. Como os outros produtos de biotransformação benzênica, o S-AFM é excretado dentro de 24-48 horas e a coleta de urina deve ser feita nesse período, para melhor eficácia analítica. Apresenta correlação altamente significativa com o benzeno ambiental se a amostra é coletada no final da jornada de trabalho ^{80,87}.

Embora seja considerado específico ¹⁰⁰, NELSON (1992) ⁸³ demonstrou sua excreção, proveniente de fonte desconhecida, em grupos de indivíduos não-expostos ocupacionalmente. É indicado pela ACGIH, (1998) ⁵ tendo com índice biológico de exposição o valor de 25 µg/g creatinina, já incluindo os

níveis basais. A análise do S-AFM é complexa, de alto custo e requer método com baixo limite de detecção, portanto de aplicação dificultada na maioria dos laboratórios^{78,87}, especialmente em nosso país.

- **benzeno inalterado:** o benzeno no ar exalado é considerado bioindicador específico e chegou a ser proposto pela ACGIH[®] 4,66,100, com um índice biológico de 0,16 ppm (amostra coletada 16 horas após a exposição) para exposição de 8 horas, a 10 ppm de benzeno⁶⁸. No sangue, é bioindicador sensível e utilizado em alguns países europeus⁸⁷, tendo como limite biológico o valor de 5 µg/ 100mL (TWA de 1 ppm)⁶⁸; na urina, ainda necessita ser melhor avaliado quanto à sensibilidade¹⁰⁰. Alguns autores sugerem a substituição do benzeno no sangue pelo benzeno na urina, método não-invasivo e relativamente simples⁸⁷.

O Quadro 1 mostra uma comparação entre os diferentes bioindicadores que podem ser utilizados nas exposições a baixas concentrações ambientais de benzeno.

QUADRO 1- Comparação entre os diferentes bioindicadores para a exposição a baixas concentrações ambientais do benzeno.

	<i>benzeno no ar exalado</i>	<i>benzeno no sangue</i>	<i>benzeno na urina</i>	<i>ácido s-fenil mercaptúrico na urina</i>	<i>ácido trans-trans, mucônico na urina</i>
vantagens	coleta não-invasiva; amostra não exige tratamento	amostra representa o equilíbrio cinético da substância	boa sensibilidade e especificidade; indica exposição recente	boa sensibilidade e especificidade; não sofre grande influência de fatores externos	simplicidade analítica
desvantagens	não é amostra homogênea e sim mistura	coleta invasiva e amostra de complexidade analítica	grande volume de amostra para a análise	complexidade analítica	especificidade influenciada por fatores externos, tais como a ingestão de sorbitol e o hábito de fumar
aplicação para níveis ambientais	1 ppm	1 ppm	0,1 ppm	1 ppb	0,5- 1ppm
índices biológicos propostos	0,12 ppm (amostra do final da expiração)	5 µg/ 100ml	_____	25 µg/g creatinina	0,5 mg/g creatinina

Fonte: BARBOSA, E.M. (1997) ¹³- modificado

Biomarcadores de efeito

- **adutos de benzeno com DNA e proteínas:** a característica comum de substâncias químicas carcinogênicas genotóxicas é sua ligação covalente ao DNA ou a moléculas de proteínas, lesão bioquímica inicial que pode levar ao câncer. A estabilidade destes adutos sugere seu emprego na monitorização da exposição, como também na investigação de danos não detectáveis por outros métodos analíticos ⁸⁷.

As amostras usadas têm sido células nucleadas e proteínas sangüíneas (hemoglobina e albumina), já que as boas práticas em Saúde Ocupacional não permitem o uso de amostras como a medula óssea, cuja coleta poderia ser prejudicial ao indivíduo ^{17,87}.

NORPOTH *et al.* (1988) reportaram a excreção de N-7- fenilguanina em urina de ratos que eram expostos ao benzeno e concluíram ser substância excretada após o quarto dia de exposição ao toxicante, o que indica que esta análise detectaria uma lesão bioquímica precoce do benzeno ⁸⁴.

A determinação da S-fenilcisteína em albumina também tem sido estudada e permite avaliar a exposição ao benzeno cerca de 20 dias precedentes à análise, já que é um biomarcador persistente (meia-vida igual à da albumina) ⁸³.

2.7 AVALIAÇÕES PERIÓDICAS DO ESTADO DE SAÚDE DOS TRABALHADORES EXPOSTOS

- **hemograma:** constitui o principal exame para indicar o efeito em trabalhadores expostos ao benzeno. Este teste inclui, além das três séries sangüíneas, exames diferenciais dos glóbulos brancos, hemoglobina, hematócrito e volume corpuscular médio (VCM). A diminuição do número de

linfócitos e do VCM são sinais precoces da toxicidade benzênica. Qualquer alteração hematológica encontrada em indivíduos expostos deve ser criteriosamente interpretada. A recomendação é que se faça um hemograma completo de toda pessoa que trabalhará em situação de risco, o qual deverá ser repetido a cada 6 meses durante a exposição ¹¹.

- **testes imunológicos:** a capacidade fagocitária, lítica e quimiotáxica dos neutrófilos, além de dosagens de imunoglobulinas têm sido sugeridos ³².

- **avaliação de alterações neuropsicológicas:** por meio dos relatos dos trabalhadores e de testes ³³.

- **alterações cromossômicas:** falta especificidade e a interpretação dos resultados é feita por comparação estatística das aberrações encontradas em grupos de indivíduos expostos com um grupo controle de não-expostos ao benzeno ⁸².

- **avaliação da função respiratória:** os níveis de exposição ambiental e os efeitos no sistema respiratório são bem correlacionados, entretanto é necessário considerar o fator susceptibilidade individual ⁹⁰.

2.8 ASPECTO ANALÍTICO

Como já mencionado anteriormente, os dois indicadores biológicos urinários que avaliam a exposição ocupacional a baixos níveis de benzeno mais exeqüíveis são o ácido trans,trans-mucônico e o ácido fenilmercaptúrico.

Na determinação do ácido trans,trans-mucônico, os métodos mais empregados são os que utilizam a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A detecção ocorre na faixa do ultra-violeta ou pelo uso do

espectrômetro de massa, e a separação, pelo uso de colunas cromatográficas de fase reversa, levando em conta a polaridade da substância a ser analisada, fato de importância na escolha dos componentes da fase móvel^{21,27,43,47,55,59,69,75,86,92,94,96,101}.

Ultimamente, na tentativa de aperfeiçoar a análise, alguns autores optaram pela cromatografia gasosa associada à espectrometria de massa (CG-EM) que, apesar de bastante sensível e específica, torna a análise mais complexa e cara^{15,99}.

Dentre as técnicas de separação e extração, as mais utilizadas são as que usam resinas de troca iônica^{27,43,49,75}. Este processo melhorou o rendimento da recuperação em relação à extração líquido-líquido^{16,55}.

JOHNSTON *et al.* (1991)⁵⁹ preconizam que o pH, a força iônica e o tipo de tampão requeridos para a extração com tais resinas são muito importantes e influenciam na mobilidade do benzeno e seus metabólitos.

Em 1994, BARTCZAK *et al.*¹⁴ compararam os resultados encontrados na análise por cromatografia líquida e gasosa e concluíram que ambas apresentam boa correlação com valores de ttAM acima de 0,1 mg/L e que a cromatografia líquida só é limitada para a análise de concentrações inferiores a 0,04 mg/L, devido à presença de picos interferentes nos cromatogramas.

Para a determinação do ácido fenilmercaptúrico, os primeiros trabalhos preconizavam a análise por cromatografia líquida; contudo, os níveis compatíveis com baixa exposição são dificilmente detectados, o que tornou necessária modificações para obter limites de detecção mais adequados. MAESTRI *et al.* em 1993⁷⁶ e em 1997⁷⁸, GHITTORI *et al.* em 1995^{47,48} e KIVISTO *et al.* em 1997⁶² utilizaram a cromatografia líquida com detector de fluorescência em seus trabalhos. Paralelamente, foram desenvolvidos métodos

de determinação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa^{80,94,106,109}

A Tabela 2 demonstra as principais condições analíticas preconizadas nos trabalhos revistos, para a determinação de ttAM em urina.

TABELA 2 – Condições analíticas utilizadas na determinação de ttAM em urina

identificação	extração	característica cromatográficas	resultados	referência
CLAE-UV	com metanol (proporcional à amostra)	- coluna: SPHERISORB ODS (250 x 4mm) - fase móvel: metanol-HAc1% (10:90) - fluxo: 1mL/min - λ : 265 nm	-LD= 0,1mg/L -<0,1 mg/L (não expostos) -6,7mg/gcreat (expostos a 5ppm) -redução urinária em coexposição ao tolueno	Inoue <i>et al.</i> (1989) ⁵⁵
CLAE-UV	com resina SAX-sorbent (500 mg) e 3mL HAc10%	- coluna: LICHROSORB C18 (250 x 4,6 mm) - fase móvel: metanol-HAc1% (10:90) - fluxo: 1mL/min - λ : 259 nm	-LD=0,05mg/L -0,2 a 0,5 mg/L (não expostos) - aumento de ttMA u após ingestão de ácido sórbico - t $\frac{1}{2}$ do ttMA semelhante ao fenol	Ducos <i>et al.</i> (1990) ⁴⁴
CG-EM	100 μ L de ácido fórmico+ 3mL de éter (2X)	-derivação com Pierce Tri-Sil BSA/ dimetilformamida - coluna: Ultra 1 (25 m x 0,25 mm) - T coluna : 80°C por 1 min, 12°C/min até 265°C	-0,27 μ g/ mg creat (não expostos) -6,2 μ g/ mg (expostos a 4,4 ppm) * ttAM excede 0,1 mg/L em todos os controles	Bechtold <i>et al.</i> (1991) ¹⁶

Continuação da TABELA 2

identificação	extração	características cromatográficas	resultados	referência
CL-EM		-coluna: HAMILTON PRP- X100 (250 x 4,6 mm) / fluxo: 1,5 mL/min e HAMILTON PRP- X100 (250 x 2,1 mm) / fluxo: 0,25 mL/min -fase móvel: tampão fosfato 0,05 M-acetonitrila (55:45) -λ 230 nm	- força iônica, pH e tipo de tampão são importantes para a mobilidade do benzeno e seus metabólitos * esses compostos não são voláteis e termicamente instáveis o que dificulta o uso da CG	Johnston et al. (1991) ⁵⁹
CLAE-UV	com resina SAX-sorbent (500 mg) e 3mL HAC10%	- coluna: LICHROSORB C18 (250 x 4,6 mm) - fase móvel: metanol-HAC1% (10:90) - fluxo: 1mL/min -λ 259 nm	- excreção de ttMAu diminui até 30 % quando o indivíduo está exposto a 100- 200 ppm de tolueno e 5- 20 ppm de benzeno	Brondeau et al. (1992) ²⁷
CLAE-UV	com resina SAX-sorbent (500 mg) e 3 mL H ₂ SO ₄ 0,5 M	- coluna: Nucleosil ODS (250 x 4,6 mm) - fase móvel: fosfato (pH 3,4)-metanol-(70:30) - fluxo: 1mL/min -λ 270 nm	-LD=3 mg/L -variação na recuperação/ ± 50% (uso de enzimas para hidrólise dos conjugados pode afetar)	Schad et al. (1992) ¹⁰¹

Continuação da TABELA 2

identificação	extração	características cromatográficas	resultados	referência
CLAE	com resina SAX-sorbent (500 mg) e 3mL HAC10%	- coluna: LICHROSORB C18 (250 x 4,6 mm) - fase móvel: metanol-HAc1% (10:90) - fluxo: 1mL/min - λ : 259 nm	-LD= 0,04 mg/L -0,6 a 7,3 mg/ gcreat (expostos) - 0,7 mg/ gcreat (não expostos)	Ducos <i>et al.</i> (1992) ⁴³
CLAE- UV	com resina Dowex1 e metanol: Na Cl (1:1) ácido vanílico (padrão interno)	- coluna: Partisphere 5 (110 x 4,7 mm) - fase móvel: HAC- metanol- acetato de sódio 5 mmol/L pH 3,2 (10:100:890) - fluxo: 1mL/min - λ : 265nm	-LD=0,025mg/L - 0,14mg/gcreat (não expostos) - 0,27mg/gcreat (expostos a 0,01-0,63 ppm/ não fumantes) - 0,44mg/gcreat (expostos 0,01- 0,6ppm/ fumantes)	Lee <i>et al.</i> (1993) ⁶⁹
CG-EM	padrão interno (¹³ C ₆ benzeno)+ ácido fórmico 88% + 3 mL de éter etílico (2X)	-derivatização com Pierce Tri- Sil BSA/ dimetilformamida - coluna: Ultra 1 (25 m x 0,25mm) -T coluna: 80°C por 1 min, 12°C/min até 265°C	- 0,27 μ g/gcreat (não expostos) - 6,2 μ g/gcreat (expostos a 4,4 ppm)	Bechtold & Henderson (1993) ¹⁵

Continuação da TABELA 2

identificação	extração	características cromatográficas	resultados	referência
análise 1: CLAE e análise 2: CG (ionização de chama)	- análise 1: com resina SAX- sorbent (500 mg) e 3mL HAC10% - análise 2: com 5 mL de éter dietílico (2X)	-coluna: LICHROSORB RP 18 (250 x 4,6 mm) - fase móvel: metanol-HAC 1% (10:90) -fluxo: 1,0 mL/min -λ 255 nm -der. diazometano - detector: 270°C -coluna: 80°C por 2 min e depois, 12°/ min até 170°C	-anál. 1:LD= 0,02 mg/L -anál. 2:LD=0,03 mg/L - 8 a 550 ng/L pelas 2 análises (não expostos) -branco=0,09 mg/L -< 0,04 mg/L picos interferentes (ttAM limitado) tempo de retenção do ácido hipúrico =12 a 15 minutos	Bartczak <i>et al.</i> (1994) ¹⁴
CLAE- UV	com resina SAX- sorbent (500 mg) e 3mL HAC10%	- coluna: LICHROSORB C18 (250 x 4,6 mm) - fase móvel: metanol-HAC1% (10:90) - fluxo: 1mL/min -λ 259 nm	- < 0,5mg/gcreat (não expostos fumantes ou não- Bélgica) - 0,8 a 1,4 mg/ gcreat (expostos a 0,5 a 1,0 ppm)	Lauwenys <i>et al.</i> (1994) ⁶⁷
CLAE- UV	com resina SAX- sorbent (500 mg) e 4mL HAC10%	- coluna e pré-coluna: ODS HYPERSIL RP18 (100 x 2,1 mm) e (20x2,1) - fase móvel: metanol-HAC1%(10:90) - fluxo: 0,2mL/min -λ 259 nm	- LD=0,05 mg/L -1,6 a 2,8 mg/L (expostos a 0,32 a 2,63 mg/m ³ - 0,1 a 0,8 ppm) - 0,6 mg/L (expostos a 0,3 mg/m ³ - 0,08 ppm)	Rauscher <i>et al.</i> (1994) ⁹⁶

Continuação da TABELA 2

identificação	extração	características cromatográficas	resultados	referência
CLAE-UV	-com resina SAX-sorbent (500 mg)- 2 cartuchos	- coluna e pré- coluna: ODS HYPERSIL RP18 (100 x 2,1 mm) e (20 x 2,1 mm) - fase móvel: metanol- HAC 1% (10:90) -fluxo:0,2 mL/min -λ 259 nm	-LD= 0,1 mg/L -1,3 mg/gcreat versus 0,6 mg/gcreat (fim e início da jornada, em mecânicos)	Popp <i>et al.</i> (1994) ⁹⁴
CLAE-UV	com resina Dowex 1 e metanol: Na Cl (1:1) ácido vanílico (padrão interno)	- coluna: Partisphere 5 (110 x 4,7 mm) - fase móvel: HAC- metanol- acetato de sódio 5 mmol/L, pH3,2 (10:100:890) - fluxo:1 mL/min -λ 265nm	- 0,14mg/gcreat (não expostos/ não fumantes) - 0,19mg/gcreat (não expostos/ fumantes) - 0,44mg/gcreat (expostos e fumantes)	Ong <i>et al.</i> (1994) ⁸⁶
CLAE-UV	com resina SAX- sorbent (500 mg) e 4 mL de HAC 10%	-coluna: SPHERISORB 5 ODS-2 (100x 2,1mm) - fase móvel: metanol 20%-HAC1% (50:50) - fluxo:1 mL/min -λ 259 nm	-LD=0,01 mg/L -t ½ do ttMA de ± 5 horas -0,04 mg/gcreat (não expostos/ não fumantes) -0,06 mg/gcreat (não expostos/ fumantes)	Boogaard & Van Sittert (1995) ²¹

Continuação da TABELA 2

identificação	extração	características cromatográficas	resultados	referência
CG- EM	- com resina Bakerbond + 4 mL de HAC 1%	- derivação : BF ₃ - padrão interno: ácido 2-bromoexanóico coluna: Ultra 5 (30 m x 0,25 mm) -T coluna : 80°C por 1 min, 20°C/ min até 280°C	-LD= 0,01 mg/L -0,05 mg/gcreat <i>versus</i> 0,09mg/ gcreat (não fumantes e fumantes)	Ruppert <i>et al.</i> (1995) ⁹⁹
CLAE	com resina SAX- sorbent (500 mg) e 3mL HAC10%	- coluna: LICHROSORB C18 (250 x 4,6 mm) - fase móvel:metanol-HAC1% (10:90) - fluxo:1mL/min -λ 259 nm	- 0,23 <i>versus</i> 0,06 mg/gcreat (fumantes e não fumantes, expostos a 0,1 ppm)	Ghittori <i>et al.</i> (1995) ^{47,48}
CLAE-UV	com resina SAX- sorbent (500 mg) e 3 mL de HAC 10%	- coluna: Hypersil ODS (250 x 4,6 mm), pré-coluna C18 Resolve (5x4,6 mm) -fase móvel:água metanol- HAC1% (93,5: 5,5:1) - fluxo:0,7mL/min -λ 259 nm -T coluna: 25°C	-114 µg/gcreat (não expostos/ não fumantes) -245 µg/gcreat (não expostos fumantes) - 342 µg/gcreat (expostos a 251 µg/m ³)	Maestri <i>et al.</i> (1995) ⁷⁵

Continuação da TABELA 2

identificação	extração	características cromatográficas	resultados	referência
CLAE-UV	com resina Dowex 1 e metanol: Na Cl (1:1) ácido vanílico (padrão interno)	- coluna: Partisphere 5 (110 x 4,7 mm) - fase móvel: HAC-metanol-acetato de sódio 5 mmol/L, pH3,2 (10:100:890) - fluxo: 1 mL/min - λ 265 nm	- 0,11 mg/gcreat (não expostos/ não fumantes) - 0,36 mg/gcreat (expostos a < 1 ppm) - 21,4 mg/gcreat (expostos a 1-5 ppm) - 46,7 mg/gcreat (expostos a > 5 ppm)	Ong <i>et al.</i> (1995) ⁸⁹
CLAE-UV	- com resina SAX-sorbent (500 mg) e 4 mL HAC 10%	- coluna : SPHEREX C8 (150 x 4,6 mm) - fase móvel: metanol-HAC 1% (10:90) - fluxo: 0,2 mL/min - λ 259 nm	- 108 µg/gcreat (não expostos/ não fumantes) - 0,22 µg/gcreat (fumantes de ± 6 cigarros/dia)	Vivoli <i>et al.</i> (1995) ¹¹⁰
CLAE-UV	com resina SAX- sorbent (500 mg) e 3 mL de HAC 10%	-coluna: Hypersil ODS (250 x 4,6 mm), pré-coluna C18 Resolve (5x4,6 mm) - fase móvel: água-metanol- HAC 1% (93,5: 5,5:1) - fluxo: 0,7 mL/min - λ 259 nm - T coluna: 25°C	- 62 µg/gcreat (não expostos/ não fumantes) - 228 µg/gcreat (não expostos/ fumantes) - 404 µg/gcreat (expostos a 1850 µg/m ³ - 0,6 ppm)	Ghittori <i>et al.</i> (1996) ⁴⁹

Continuação da TABELA 2

identificação	extração	características cromatográficas	resultados	referência
CLAE-UV	fase sólida: SAX + 12 mL de HAc 1% (técnica da "column switching") * melhora LD e promove uma eliminação dos picos retidos na pré-coluna	-coluna: Hypersil ODS (250 x 4,6 mm), pré-coluna C18 Resolve (5x4,6 mm) -fase móvel: água metanol- HAc1% (93,5: 5,5:1) - fluxo: 0,7 mL/min -λ 259 nm -T coluna: 25°C	-114 µg/gcreat (não expostos/ não fumantes) -245 µg/gcreat (não expostos fumantes) - tempo de corrida= 25 minutos	Maestri <i>et al.</i> (1996) ⁷⁷
CLAE-UV	fase sólida: resina Dowex 1 e metanol: NaCl (1:1) ácido vanílico (padrão interno)	- coluna: Partisphere 5 (110 x 4,7 mm) - fase móvel: HAc- metanol- acetato de sódio 5 mmol/L, pH 3,2 (10:100:890) - fluxo: 1 mL/min -λ 265nm	- 0,14mg/gcreat (não expostos) - 0,10mg/gcreat (expostos a 0,01- 0,25 ppm) - 0,63mg/gcreat (expostos a > 0,25 ppm)	Ong <i>et al.</i> (1996) ⁸⁸
CG- EM (IC)	-1 mL de HClc + 5 mL de éter dietílico(2X)	-derivatização : diazometano - coluna: DB 5 (30 m x 0,3 mm) - T coluna : 80°C por 2 min, 12°C/ min até 170°C	-94 ng/mgcreat (não fumantes/ não expostos) - eliminação de ttMA= 4,1 µg/h (pré exposição) - 4,9 a 24 µg/h (pós exposição, dose interna de 16- 267 µg)	Yu & Weisel (1996) ¹¹⁴

Continuação da TABELA 2

identificação	extração	características cromatográficas	resultados	referência
CLAE-UV	com resina SAX- sorbent (500 mg) e 3mL HAC10%	- coluna: LICHROSORB C18 (250 x 4,6 mm) - fase móvel: metanol-HAc1% (10:90) - fluxo: 1mL/min -λ 259 nm	-LD=0,01 mg/L -0,07 mg/L (pré exposição) -0,11 mg/L (expostos a> 40µg/m ³ ± 0,01 ppm)	Priante <i>et al.</i> (1996) ⁹⁵
CLAE- UV	fase sólida:SAX sorbent + ácido fórmico 2%	-coluna: Supelcosil C18 (50 x 4,6mm) e pré: Supelguard C18 (20x4,6 mm) - fase móvel: Ac.fórmico-tetraidrofuram-água (14:17:969) - fluxo: 1mL por 4 min depois, 3 mL/min -λ 263 nm	-32 µg/ gcreat (pré exp.) -50 µg/gcreat (pós exp.) -47 µg/gcreat/fumantes 17 cigarros/dia, pré exposição) -100 µg/gcreat (fumantes 17cigarros/dia, pós exposição)	Buratti <i>et al.</i> (1996) ²⁹
CLAE- UV	fase sólida: SAX-sorbent + 2 mL de ácido fórmico 2%	- coluna: LICHROSORB C18 (250 x 4,6 mm) - fase móvel: metanol-HAc1% (10:90) - fluxo: 1mL/min -λ 264 nm	-LD= 1µg/L e LQ= 3 µg/L - volumes = 5 mL(não exp.) e 3 mL (exp. a baixas concentrações) *as condições melhoram sensibilidade e recuperação	Giardin <i>et al.</i> (1997) ⁵⁰

Continuação da TABELA 2

identificação	extração	características cromatográficas	resultados	referência
CG-EM	com resina Bakerbond + 4 mL de HAC 1%	- derivação : BF ₃ - padrão interno: ácido 2-bromoexanóico coluna: Ultra 5 (30 x 0,25) - T coluna : 80°C por 1 min, 20°C/ min até 280°C	-LD= 0,01 mg/L -0,05 mg/gcreat (não fumantes/ não expostos) no 1º dia, 0,55 mg/L no 2º e 3º dia, após a ingestão de 500 mg/ dia de ácido sórbico	Ruppert <i>et al.</i> (1997) ⁹⁸
CLAE	com resina SAX-sorbent (500 mg) e 3mL HAC10%	- coluna: LICHROSORB C18 (250 x 4,6 mm) - fase móvel: metanol-HAC1% (10:90) - fluxo: 1mL/min -λ. 259 nm	- 2 mg/gcreat (expostos a 1 cm ³ /m ³) - exposição concomitante ao tolueno parece influenciar mas, não em baixas concentrações deste solvente	Kivisto <i>et al.</i> (1997) ⁶²
CLAE-UV	com resina SAX-sorbent (500 mg) e 4mL HAC 10%	- coluna e pré-coluna: ODS HYPERSIL RP18 (100 x 2,1 mm) e (20 x 2,1 mm) - fase móvel: metanol - HAC 1% (10:90) - fluxo: 0,2 mL/min -λ. 259 nm	- LD=0,01 mg/L - 0,16 mg/gcreat (não exp./ não fum.) - 0,29 mg/gcreat (motorista de ônibus) *rel. ttAM/ benz. urina = 0,15 (met. "pobres") rel. ttAM/ benz. urina = 0,85 (met. "eficientes"- mais susceptíveis ao efeito hematológico)	Gobba <i>et al.</i> (1997) ⁵¹

Continuação da TABELA 2

identificação	extração	características cromatográficas	resultados	referência
CLAE-UV	extração em fase sólida: SAX - sorbent (500mg) e 2,5 mL de HAC 10%	-coluna: Hypersil ODS (250 x 4,6 mm) - fase móvel: água - metanol - HAC 1% (93,5 : 5,5 : 1) -fluxo: 0,7 mL/min - coluna: Apex II (150 x 4,6 mm) - fase móvel: água - metanol - HAC 1% (97:2:1) - fluxo: 0.8 mL/min -λ 259 nm - T coluna: 25°C	- 60 a 140 µg/gcreat (não expostos/ não fumantes)	Maestri <i>et al.</i> (1998) ⁷⁹

3 OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO

A finalidade primordial da monitorização biológica é proteger a saúde dos trabalhadores, prevenindo conseqüentemente, a incidência dos efeitos nocivos decorrentes da exposição às substâncias químicas. No entanto, na biomonitorização dos indivíduos expostos ao benzeno muitas são as dificuldades quanto ao uso de bioindicador adequado.

Assim, este trabalho objetiva validar um método analítico em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinação do ácido trans, trans-mucônico (ttAM) em urina, bem como avaliar sua aplicação em amostras de trabalhadores que manipulam o benzeno. Por outro lado, também pretende definir o melhor período de coleta das amostras de urina.

O plano de trabalho delineado para se atingir os objetivos propostos foi:

- realizar o levantamento e o estudo de vários aspectos da exposição humana ao benzeno, particularmente dos métodos analíticos propostos para a determinação do ttAM;
- escolher e validar um método por CLAE, através do estudo de linearidade, limite de detecção, limite de quantificação, recuperação, precisão, efeito da matriz, exatidão e estabilidade;
- determinar o ácido trans, trans-mucônico em urina de trabalhadores em contato com o benzeno, coletada em três diferentes períodos;
- avaliar os resultados obtidos através de análise estatística.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 MATERIAL

4.1.1 Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes utilizados nesse trabalho foram :

- padrão de ácido trans,trans-mucônico (ttAM) 98%- Aldrich[®], lote n.º 08809MR;
- padrão de ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzóico (ácido vanílico) 97% - Aldrich[®], lote n.º 04302MQ;
- resina Dowex 1x2-100 íon-exchange-cloride, strongly basic anión, 50-100 mesh- Aldrich[®], lote n.º 13201PG;
- acetato de sódio anidro p.a. - Baker Analyzed[®], lote n.º 23093, solução a 0,1 mol/L (pH=7)* ;
- cloreto de sódio p.a. - Merck[®], lote n.º 210169, solução a 1,5 mol/L;
- ácido orto-fosfórico 85% p.a.- Merck[®], lote n.º 1005737004, solução a 0,2 mmol/L;
- tris (hidroximetil) aminometano- Sigma[®], lote n.º 11H5607, solução- tampão a 0,5 mol/L (pH=10)*;
- metanol Omnisolv, grau de pureza cromatográfica- EM Science[®], lote n.º 381706;
- ácido acético glacial 100% p.a. Merck[®], lote n.º 10980, solução a 1%;
- ácido clorídrico 37% p.a. Merck[®], lote n.º 604084, solução a 60 mmol/L e 6 mol/L.

Utilizou-se no preparo água de grau reagente (resistividade > 10 megaohm), Millipore[®] (Milli Q).

* o acerto do pH, quando necessário, foi realizado em peagâmetro usando-se solução de HCl ou NaOH.

4.1.2 Soluções-padrão e fase móvel

Foram preparadas soluções-padrão estoque de ácido trans,trans-mucônico (ttAM) e de ácido vanílico (padrão interno), separadamente, a 1000 mg/L, pela dissolução de 10 mg de cada padrão em 8 mL de metanol e diluição para 10 mL com água Milli Q. Esta solução era preparada a cada mês e conservada a -20°C.

A segunda solução-padrão estoque de ttAM, a 20 mg/L, foi preparada semanalmente por diluição da solução a 1000 mg/L em solução de HCl 60 mmol/L.

A partir da solução a 20 mg/L foram preparados os adicionados em amostras de urina para a validação do método e acompanhamento das análises posteriores.

A solução-padrão de uso de ácido vanílico (AV) a 10 mg/L foi obtida por diluição da solução estoque a 1000 mg/L com tampão Tris a 0,5 mol/L, no próprio dia da análise.

Paralelamente, foram preparadas soluções contendo os dois padrões para a avaliação de parâmetros do equipamento.

A fase móvel foi preparada medindo-se 900 mL de ácido acético a 1% e acrescentando-se 100 mL de metanol (9:1). Em seguida, foi filtrada e desgaseificada, sob pressão, através de filtro Millipore 0,45 µm.

4.1.3 Vidraria, aparelhos e acessórios

- colunas de vidro : de 15 cm de altura, 1 cm de diâmetro interno e torneira de teflon;
- conjunto para filtração à vácuo contendo: funil, base e tampa

tubulada em vidro borossilicato e garra de alumínio anodizado-Millipore®;

- balança analítica Sartorius® research- modelo R200 D
- urodensímetro Urinometer®;
- agitador de tubos Fanem®- modelo 251;
- pipetas automáticas de diferentes capacidades volumétricas Finpipette®;
- bomba de ar Fabbe Primar®- modelo 151/VC;
- ultra- som Thornton®;
- peagâmetro Digimed®- modelo DMPH-2;
- membrana de celulose MFS®, poro 0,45µm, diâmetro 47 mm;
- sistema de purificação de água Milli Q- Plus Millipore®;
- espectrofotômetro- UV/ visível Intralab®- modelo DMS80;
- kit para determinação de creatinina Labtest®- lote n°80564;
- cromatógrafo líquido Hewlett Packard®, modelo 1100, equipado com detector de UV, acoplado a computador modelo Vectra XM, série 4-5/150, com *ChemStation* para integração e processamento dos cromatogramas, munido de coluna Chrompack®- tipo Lichrosorb 5 RP18 (150x3 mm) e pré- coluna Chrompack® R2 10x2 mm).

4.2 MÉTODO

4.2.1. Validação do método analítico para a determinação do ácido *trans, trans-mucônico* urinário

As amostras destinadas à validação do método analítico foram preparadas a partir de *pool* de urina, obtido de funcionários e alunos de pós-graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. As amostras foram colhidas, homogeneizadas e enriquecidas com solução padrão de ácido *trans, trans-mucônico* em diferentes concentrações para o preparo da curva de calibração, estudo da linearidade,

precisão, exatidão, recuperação, limite de detecção e quantificação, efeito da matriz e estabilidade do método proposto.

As técnicas de extração e identificação do ttAM em urina foram realizadas com base nos métodos propostos por LEE *et al.* (1993)⁶⁹ e DUCOS *et al.* (1990)⁴³, respectivamente.

O método utilizado pode ser descrito nas seguintes etapas:

- em tubo de 15 mL misturar 1 mL de urina e 2 mL de tampão Tris 0,5 mol/L (pH 10), contendo ácido vanílico 10 mg/L;
- transferir a mistura acima para coluna de vidro contendo 300 mg da resina Dowex, pré-condicionada com 2 mL de água Milli Q, 2 vezes;
- lavar a coluna com 1 mL ácido fosfórico 0,2 mmol/L; 1 mL de tampão acetato de sódio 0,1 mol/L (pH 7) e 1 mL de água Milli Q;
- descartar todos os efluentes;
- em seguida, eluir o ttAM com 2 mL de uma mistura de cloreto de sódio 1,5 mol/L / metanol, na proporção 1:1;
- injetar 20 µL desse eluato no cromatógrafo a líquido, segundo condições especificadas no item 4.2.1.1.

A Figura 3 mostra o fluxograma do método de extração do ácido trans, trans- mucônico em urina.

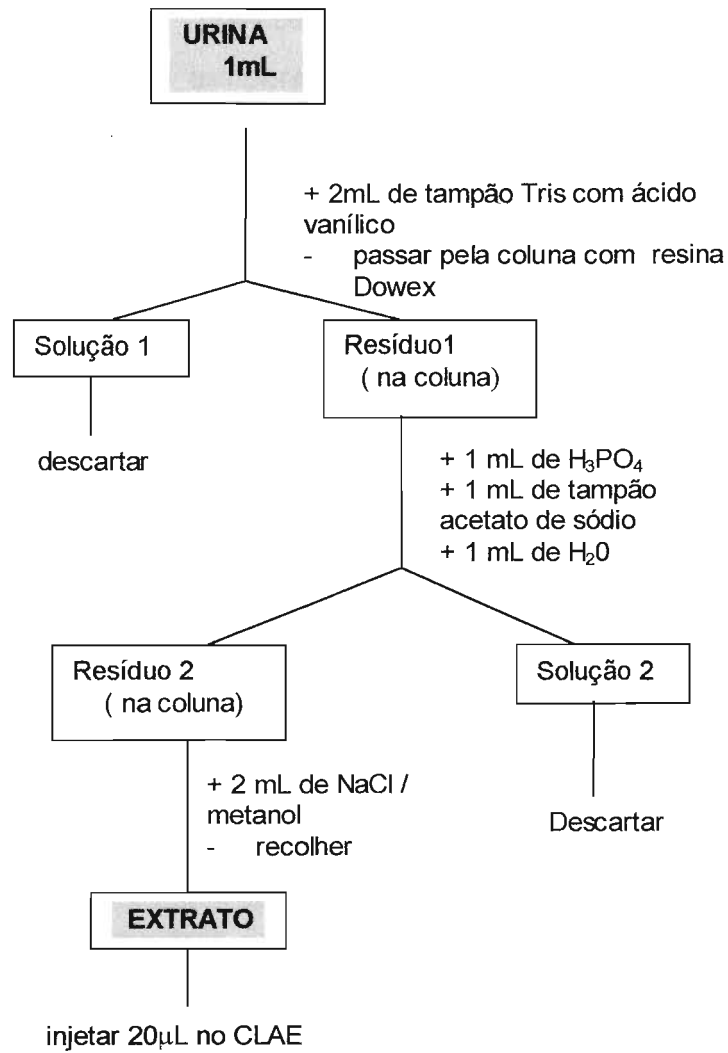


FIGURA 3- Fluxograma da técnica de determinação de ácido trans,trans-mucônico urinário

4.2.1.1 Otimização das condições cromatográficas

Para melhor separação cromatográfica foram escolhidas as seguintes condições:

- colunas: Lichrosorb RP 18 (150x3 mm) com pré-coluna R2 (10x2 mm);
- temperatura da coluna: 27°C;
- fluxo do eluente: 1 mL/min;
- comprimento de onda: 259nm;
- eluente: ácido acético 1%/ metanol (9:1).

Com essas condições, foram injetadas no aparelho soluções- padrão de ttAM , nas concentrações de 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 mg/L contendo também ácido vanílico a 10 mg/L (6 replicatas cada) para verificar a linearidade e o limite de detecção do instrumento, bem como estabelecer um intervalo de tempo de retenção relativo do analito em relação ao padrão interno, o ácido vanílico.

4.2.1.2 Linearidade

Para verificar a faixa de linearidade do método, foram adicionadas às amostras de *pool* de urina, solução-padrão de ácido trans, trans-mucônico, de modo a obter as seguintes concentrações: 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 5,0 mg/L. Estas amostras foram, assim como um branco de urina, analisadas em sextuplicata, segundo o procedimento descrito em 4.2.1.

4.2.1.3 Curva de calibração

Para o preparo da curva de calibração foram adicionadas às amostras de *pool* de urina, solução-padrão de ácido trans, trans-mucônico, de modo a obter as seguintes concentrações: 0,2; 0,5; 1,0;

2,0; 4,0; 5,0 mg/L. Tais amostras foram analisadas em duplicata, assim como um branco de urina, pelo procedimento analítico descrito em 4.2.1. A partir dos resultados obtidos, foi feita a regressão linear, usando-se a equação da reta para o cálculo da concentração de ttAM nas amostras. Repetiu-se esse processo com cada lote de amostras.

4.2.1.4 Limite de quantificação (LQ)

Considerou-se como limite de quantificação, a menor concentração que se pôde medir com precisão adequada, ou seja, com uma imprecisão avaliada pelo coeficiente de variação menor que 10%, encontrado por adição do padrão de ttAM em urina, em concentrações inferiores a 1,0 mg/L. Além disso, foi considerado como LQ do método, a concentração que gerou um pico de ttAM 10 vezes maior que o encontrado no branco de urina. As análises descritas foram realizadas de acordo com o procedimento descrito em 4.2.1.

4.2.1.5 Limite de detecção (LD)

O LD foi considerado como a menor concentração determinada com confiabilidade, ou seja, diferenciando-se do branco de amostra com um pico três vezes maior que o do branco de urina. De outra forma, o LD foi avaliado para a concentração mínima que se diferenciou do zero, com determinada precisão, isto é, a mínima concentração adicionada à amostra que apresentou um coeficiente de variação menor que 30%. Obteve-se por diluições sucessivas da amostra adicionada de 0,5 mg/L e submetidas ao método descrito em 4.2.1.

4.2.1.6 Recuperação

Para avaliar a eficiência do método de tratamento da amostra ou seja, sua recuperação, foram utilizadas três concentrações: 0,2; 2,0 e 5,0 mg/L. Foram feitos 6 adicionados para cada concentração, que foram então submetidos ao procedimento descrito (item 4.2.1). Por comparação da resposta quando a adição foi feita antes da extração *versus* a resposta quando a adição foi realizada após este procedimento, obteve-se a porcentagem de analito recuperado.

4.2.1.7 Precisão do método analítico

Para avaliar a precisão, amostras de urina enriquecidas com 0,2; 2,0 e 5,0 mg/L de ttAM foram analisadas em 10 replicatas/ concentração, para o estabelecimento da precisão intra-ensaio e em triplicata, dia-após-dia, durante dez dias, para o estudo da precisão interensaio.

4.2.1.8 Estabilidade do analito na amostra

A estabilidade foi avaliada através de ciclos de congelamento em freezer a -20°C e descongelamento, durante um período de 15 semanas, das amostras enriquecidas com 0,2 e 2,0 mg/L. As amostras foram também enriquecidas com 0,2, 2,0 e 5,0 mg/L, conservadas em geladeira a 4°C e avaliadas durante dez dias

Todas as amostras foram acidificadas, submetidas ao procedimento (item 4.2.1).

4.2.1.9 Exatidão

Para o estudo da exatidão, amostras de urina foram enriquecidas com ttAM para se obter concentrações de 0,2; 2,0 e 5,0 mg/L (sexuplicata/ concentração) e tratadas segundo método descrito em 4.2.1. A inexatidão foi calculada pela tendenciosidade (*bias*) de acordo com a equação:

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

4.2.1.10 Efeito da matriz

Para avaliar o efeito da matriz biológica, ou seja, se havia a presença de outros constituintes que resultassem em picos próximos ou iguais ao do analito nas condições otimizadas, amostras de urina e de água enriquecidas em duplicata com as concentrações 0,2; 0,5; 1,0; 2,0 e 5,0 mg/L foram submetidas ao procedimento descrito no item 4.2.1.

4.2.2 Determinação do ácido *trans,trans*-mucônico (ttAM) em urina de trabalhadores que manipulam o benzeno

4.2.2.1 Casuística

As amostras destinadas à determinação do ácido *trans,trans*-mucônico foram obtidas de trabalhadores expostos ao benzeno, numa refinaria, onde o petróleo passa por uma série de operações de beneficiamento até a obtenção de mais de 80 produtos de ampla utilização na indústria em geral, como gás natural, gasolina, óleo diesel, solventes de borracha, asfalto, lubrificantes e o próprio benzeno.

O trabalhador se expõe ao solvente na sua obtenção, na unidade de reforma catalítica, no manuseio, no transporte, no laboratório

de controle de qualidade. O trabalho se faz segundo sistema de rodízio, ou seja, o trabalhador fica na área onde se utiliza benzeno apenas 1 dia/semana, em turno de 6 horas. Nesta área trabalha usando equipamento de proteção individual tal como: luvas, óculos, máscara, botas, capacete e protetores auriculares.

Foram avaliados 25 trabalhadores. As coletas foram realizadas em três diferentes períodos: início da jornada de trabalho, final da jornada e na manhã do dia seguinte, antes da jornada, totalizando 75 amostras. A urina, proveniente de única micção, foi coletada diretamente em frasco de polietileno, quimicamente limpo. Após a coleta, as amostras foram mantidas e transportadas em câmara refrigerada, no mesmo dia, até o laboratório onde seriam realizadas as análises. Para conservação, foi adicionado à cada amostra 1mL de HCl 6 mol/L para cada 100 mL de urina, e realizadas as medidas da densidade e da creatinina. As amostras foram conservadas a -20°C até o momento da determinação do ttAM. Os trabalhadores responderam a um questionário sobre vários itens como: hábitos pessoais e alimentares, local de moradia, presença de patologias e ingestão de medicamentos e assinaram um termo consentindo na participação no trabalho (anexos).

A Tabela 3 mostra algumas características da população avaliada.

TABELA 3 – Características da população avaliada, para a determinação do ácido trans,trans-mucônico em urina.

trabalhador	idade	sexo	hábito de fumar	tempo de trabalho no setor (anos)	local de trabalho no dia da coleta*	ingestão de bebida alcoólica
C.A.D.Jr.	38	m	F	20	I.c.q.	não
J.J.A.L.N.	32	m	F	13	I.c.q.	sim
N.H.Jr.	41	m	F	13	u.r.c.	sim
R.A.F.	41	m	F	11	u.r.a	não
R.S.	35	m	F	12	u.r.c.	sim
V.A.	45	m	F	22	I.c.q.	sim
C.A.C.S.	35	m	NF	10	u.r.a.	não
C.R.D.F.	37	m	NF	17	I.c.q.	não
D.S.M.	36	m	NF	14	I.c.q.	não
E.B.M.	-	m	NF	14	u.d.p.	não
E.P.F.	41	m	NF	14	I.c.q.	não
F.M.M.	32	m	NF	13	u.r.c.	sim
J.L.V.	35	m	NF	11	u.d.p.	sim
J.S.V.	34	m	NF	13	u.r.c.	sim
L.A.B.V.	39	m	NF	19	I.c.q.	sim
M.A.R.F.	32	m	NF	12	u.r.c.	sim
M.H.F.F.S.	33	f	NF	12	I.c.q.	não
M.L.C.V.	35	f	NF	14	I.c.q.	não
M.V.N.S.	36	f	NF	14	I.c.q.	sim
O.S.L.	33	m	NF	3	u.r.c.	sim
P.S.S.S.	26	m	NF	6	u.r.c.	não
S.S.T.	34	m	NF	8	u.r.c.	não
T.M.M.	35	f	NF	14	I.c.q.	não
V.R.L.	35	m	NF	13	I.c.q.	não

* I.c.q.: laboratório de controle de qualidade; u.d.p.: unidade de destilação de petróleo; u.r.c.: unidade de reforma catalítica; u.r.a.: unidade de reforma de aromáticos

4.2.2.2 Análise do ácido trans,trans-mucônico (ttAM) urinário

As análises do ttAM nas 75 amostras provenientes dos trabalhadores que manipulavam o benzeno foram realizadas pelo método descrito em 4.2.1 e nas condições cromatográficas descritas em 4.2.1.1.

4.2.3 Determinação da densidade e da creatinina urinária

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

4.2.4 Análise estatística

O teste não paramétrico de FRIEDMAN ³⁷ ($p=0,025$) foi utilizado para verificar diferenças entre os valores de ttAM em amostras coletadas nos três períodos considerados: antes e depois da jornada de trabalho e no dia seguinte.

5 RESULTADOS

5.1 Otimização das condições cromatográficas

De acordo com as condições escolhidas para a separação cromatográfica, descritas no item 4.2.1.1, foram obtidos os cromatogramas representados na Figura 4 que reproduz as injeções diretas de branco de reagentes e das soluções- padrão de ttAM e PI juntas.

O tempo de retenção relativo do ttAM/AV (trr) foi de $0,39 \pm 0,02$.

A equação de regressão obtida na determinação da linearidade instrumental foi $y = 0,125834x - 0,00344$ com um r^2 de **0,99965**.

Foi considerado limite de detecção instrumental a concentração de 0,05 mg/L que, nas condições estabelecidas, forneceu um pico de ttAM três vezes o ruído da linha de base.

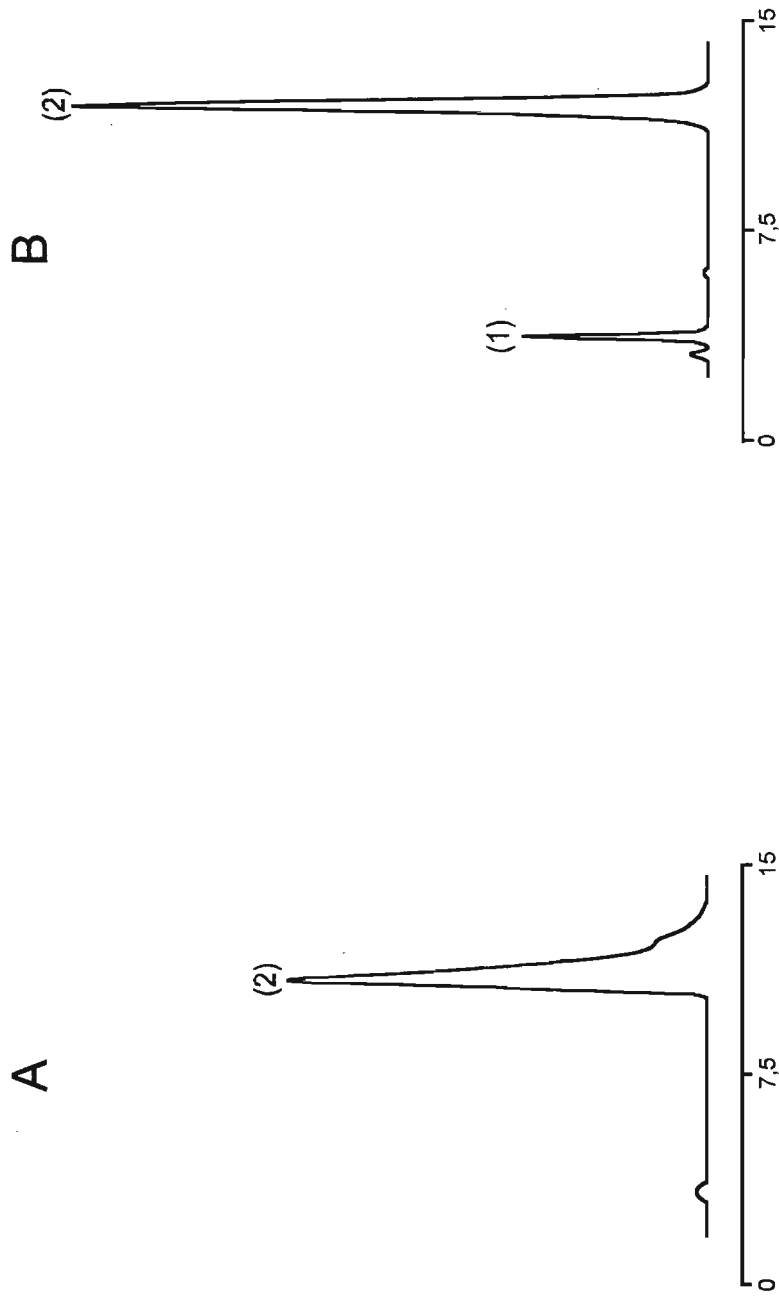


FIGURA 4 - Cromatogramas (CLAE) referentes a soluções-padrão

A - solução contendo padrão de ácido vanílico - PI (2)

B - solução contendo padrão do ácido trans, trans-mucônico (ttAM) na concentração 1mg/L (1) e PI (2)

CLAE: HP 1100

Coluna: Lichrosorb RP 18 (150 x 3mm), com pré-coluna R2 (10 x 2mm)

T coluna: 27°C; fase móvel: ácido acético 1%-metanol (9:1); fluxo: 1mL/min.

5.2 Linearidade

Na Figura 5 está representada a curva de linearidade de ttAM em amostras de *pool* de urina, nas concentrações: 0,2; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 5,0 mg/L. Cada ponto corresponde à média dos valores encontrados na análise das sextuplicatas, além do branco de urina.

Na Figura 6 estão representados os cromatogramas relativos à urina sem adição, à alíquota enriquecida com padrão de ttAM na concentração de 1,0 mg/L e à amostra de um indivíduo exposto.

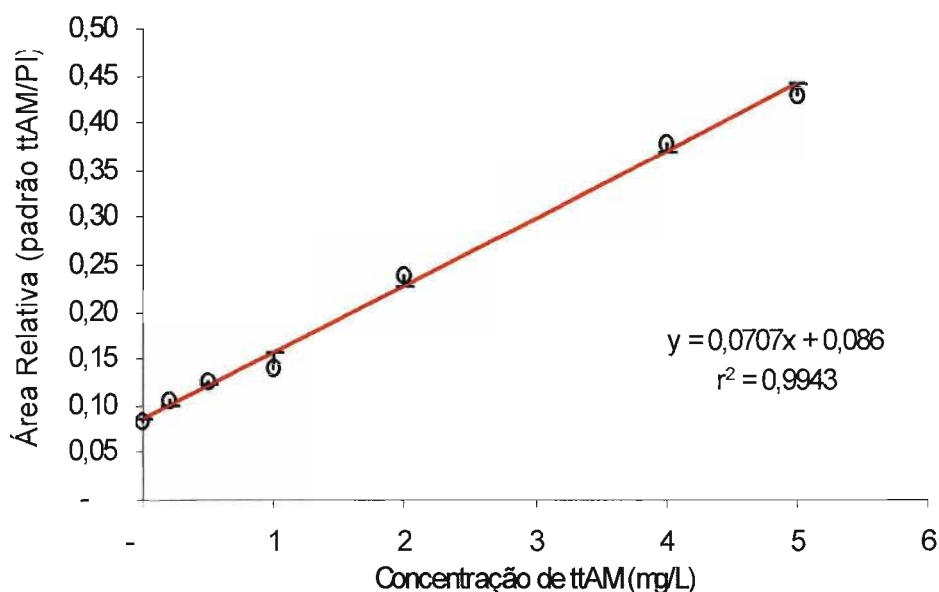


FIGURA 5 – Curva de linearidade do ácido trans,trans-mucônico (ttAM) em urina.

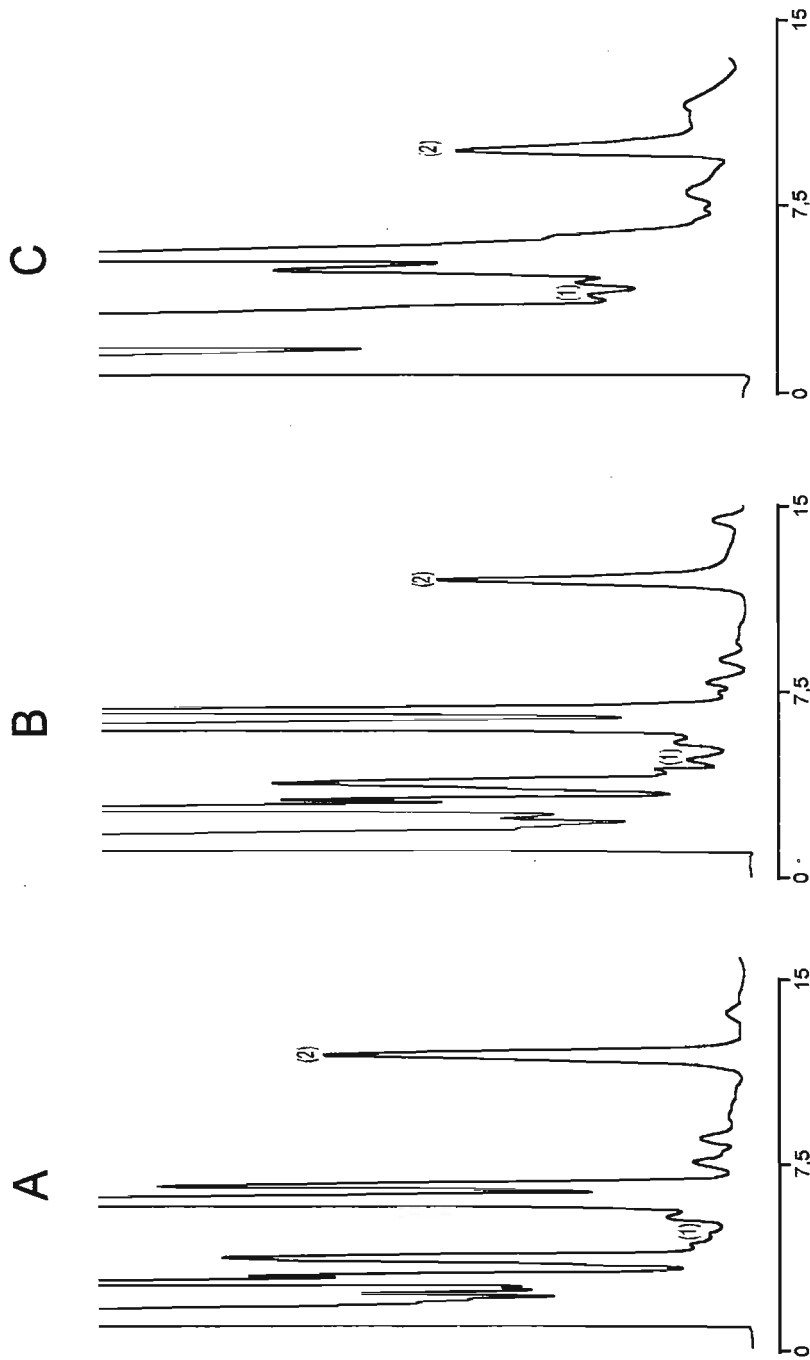


FIGURA 6 - Cromatogramas (CLAE) referentes às amostras de urina

A - urina sem adição: (1) ácido trans,trans- mucônico; (2) ácido vanílico- PI

B - urina enriquecida com 1,0 mg/L(1) de ácido trans,trans-mucônico (1)

C - amostra de urina de trabalhador exposto, coletada no final da jornada de trabalho

CLAE: HP 1100

Coluna: Lichrosorb RP 18 (150 x 3mm), com pré-coluna R2 (10 x 2mm)

T coluna: 27°C; fase móvel: ácido acético 1%-metanol (9:1); fluxo: 1mL/min.

5.3 Limite de quantificação

Foi considerado limite de quantificação do método a concentração de 0,2 mg/L de ttAM em urina, que forneceu um pico de ttAM dez vezes maior que o pico produzido pela análise da urina sem adição e um CV de 7,6%.

5.4 Limite de detecção

Considerou-se como limite de detecção do método a concentração de 0,1 mg/L de ttAM em urina, que forneceu um pico de ttAM três vezes maior que a urina sem adição e cujo coeficiente de variação foi de 25,7%.

5.5 Recuperação

Os valores de recuperação estão apresentados na Tabela 4, cada ponto correspondendo à média de seis alíquotas.

TABELA 4 – Recuperação de ácido trans,trans-mucônico (ttAM) adicionado às amostras de *pool* de urina.

concentração de ttAM urinário (mg/L)	recuperação (%)
0,2	70,5
2,0	82,4
5,0	78,3
% média = 77,1	

5.6 Precisão

Os coeficientes de variação obtidos no estudo da precisão intra e interensaio, são apresentados na Tabela 5.

TABELA 5 - Precisão do método analítico para determinação de ácido trans,trans-mucônico (ttAM) urinário, expressa em função dos coeficientes de variação (CV).

ttAM (mg/ L)	CV (%) intra-ensaio*	CV (%) interensaio**
0,2	7,6	13,5
2,0	8,7	10,0
5,0	6,9	8,5
	média= 7,7	média= 10,6

* dez replicatas de cada ponto, analisadas no mesmo dia

** triplicata de cada ponto, analisadas dez dias consecutivos

5.7 Estabilidade do analito na amostra

Os resultados do estudo da estabilidade são mostrados na Tabela 6, para amostras conservadas a 4 °C, e nas Figuras 7 e 8, para as conservadas a -20°C.

TABELA 6- Estabilidade do ácido trans,trans-mucônico (ttAM) na amostra conservada dez dias a 4 °C.

ttAM (mg/ L)	CV (%)
0,2	13,5
2,0	10,0
5,0	8,5
	média= 10,6

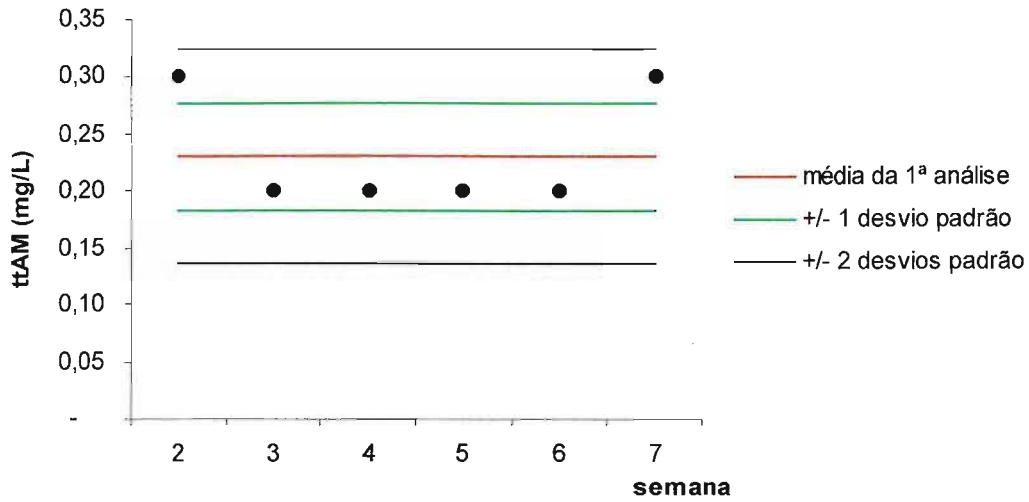


FIGURA 7 - Estabilidade do ácido trans,trans-mucônico (0,2 mg/L) em amostra de urina, conservada a -20°C por sete semanas.

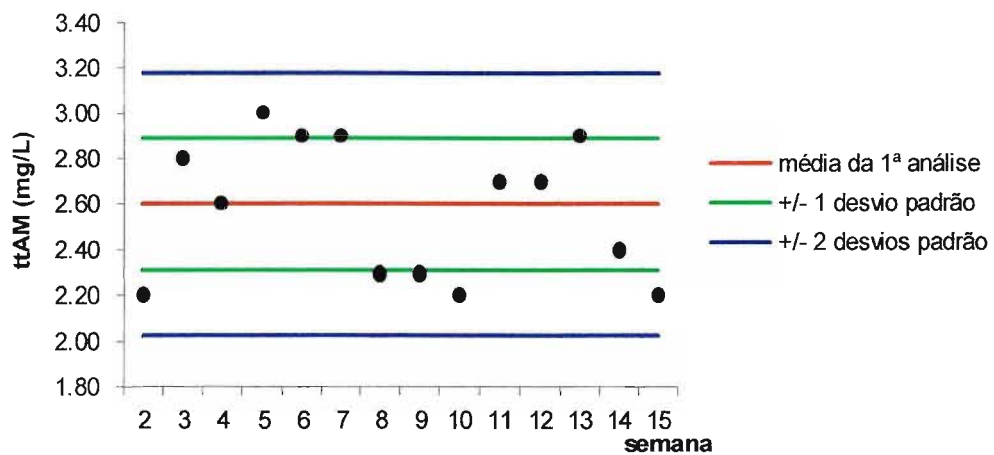


FIGURA 8 - Estabilidade do ácido trans,trans-mucônico (2,0 mg/L) em amostra de urina, conservada a -20°C por quinze semanas.

5.8 Exatidão

A exatidão do método tem os valores do percentual de tendenciosidade representados na Tabela 7.

TABELA 7 - Inexatidão do método de determinação de ácido trans,trans-mucônico (ttAM) em urina, expressa em função de porcentagem (%)

ttAM (mg/L)	inexatidão (%)
0,2	- 29,5
2,0	-26,4
5,0	- 27,8
% média= 27,9	

5.9 Efeito da matriz

A Figura 9 demonstra as curvas de calibração obtidas dos adicionados de ttAM em água e em urina.

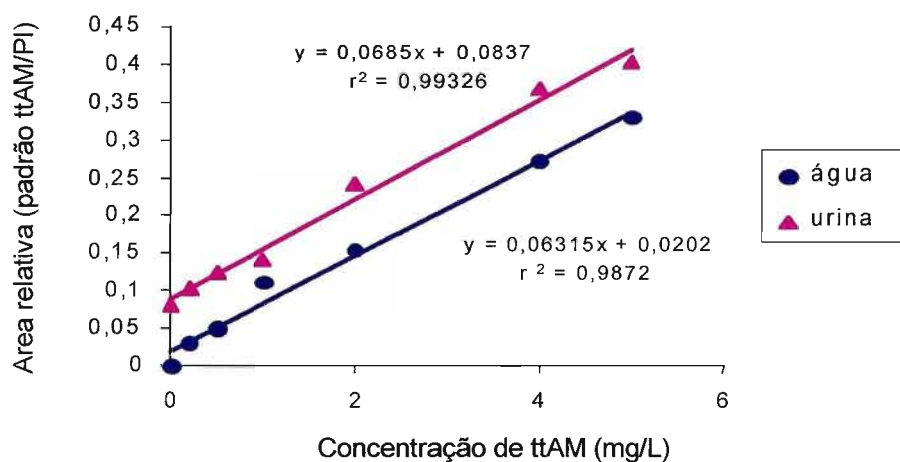


FIGURA 9- Representação gráfica da curva de calibração do ácido trans,trans-mucônico (ttAM) em água e em urina nas concentrações de 0,2 a 5,0 mg/L.

5.10 Determinação do ácido trans,trans-mucônico em urina de trabalhadores que manipulam benzeno.

As Tabelas 8, 9 e 10 e as Figuras 10 e 11 apresentam os resultados da determinação de ttAM urinário em trabalhadores que manipulam benzeno. Os resultados estão expressos em mg/L, corrigidos pela densidade, e em mg/g creatinina. As Tabelas 11 e 12 demonstram os resultados obtidos em grupos de fumantes, em relação aos não-fumantes e em relação à ingestão de bebida alcoólica, respectivamente.

TABELA 8- Valores de ácido trans-trans, mucônico (ttAM) em urina de trabalhadores que manipulam benzeno numa refinaria

trabalhador	início da jornada		final da jornada		dia seguinte`a jornada	
	mg/L	mg/g creat.	mg/L	mg/g creat.	mg/L	mg/g creat.
C.A.D.Jr.	0,4120	0,2200	0,1880	0,1000	0,4300	0,2290
C.R.D.F.	0,4130	0,1220	1,2880	0,3810	0,2610	0,0770
D.S.M.	0,3870	0,0950	6,0900	1,7480	1,2140	0,2980
E.B.D.	0,4660	0,1590	0,7610	0,2600	0,8550	0,2920
F.M.M.	0,3770	1,7940	0,1010	0,4800	0,1010	0,4830
J.J.A.L.N.	0,2960	0,1110	2,6300	0,9870	0,4880	0,1830
J.S.V.	1,1600	0,4290	2,9000	1,0740	0,3200	0,1185
L.A.B.V.	0,1410	0,1060	0,2660	0,2000	0,1860	0,1410
M.H.F.F.S.	1,3320	0,7600	2,2400	1,1430	0,3030	0,1720
M.L.C.V.	0,3510	0,1020	2,4770	1,8730	1,0060	0,2910
N.M.Jr.	0,3130	0,2130	0,7830	0,5320	2,3090	1,5690
O.S.L.	0,3330	0,1620	0,3550	0,1740	0,6680	0,3257
R.A.F.	1,2450	1,6670	1,0000	1,5400	1,1900	1,5950
R.S.	0,1860	0,1730	0,6520	0,6040	0,1250	0,1160
V.A.	0,5360	0,1840	3,3880	1,1520	1,3800	0,4690
V.R.L.	0,4440	0,1360	2,0710	0,6320	0,8230	0,2510

TABELA 9 - Medidas descritivas para as concentrações de ácido trans,trans-mucônico (mg/g creat.) nos 3 períodos de coleta

	início da jornada	final da jornada	dia seguinte à jornada
média	0,40	0,81	0,41
erro padrão	0,14	0,14	0,12
mediana	0,17	0,62	0,27
desvio padrão	0,55	0,57	0,47
mínimo	0,10	0,10	0,08
máximo	1,79	1,87	1,60
contagem	16	16	16

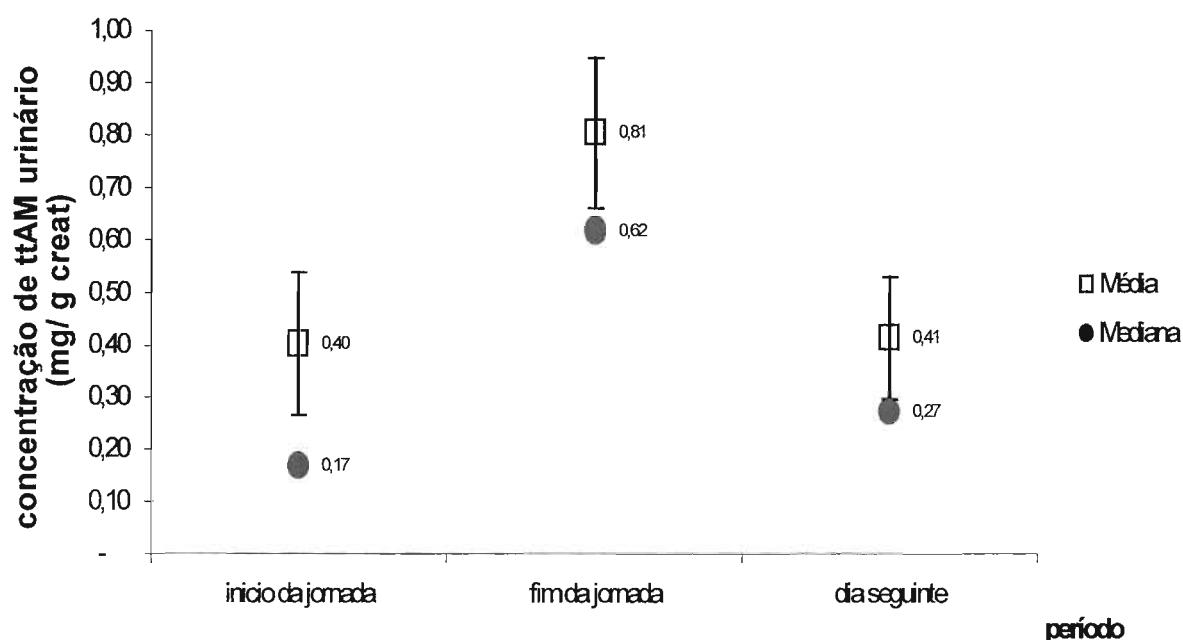


FIGURA 10- Representação das concentrações de ácido trans,trans-mucônico urinário (mg/g creatinina) nos três períodos de coleta das amostras.

TABELA 10- Medidas descritivas para as concentrações de ácido trans, trans-mucônico urinário (em mg/L) nos 3 períodos de coleta

	início da jornada	final da jornada	dia seguinte à jornada
média	0,52	2,01	0,73
erro padrão	0,09	0,54	0,15
mediana	0,40	1,14	0,58
desvio padrão	0,37	2,17	0,59
mínimo	0,14	0,10	0,10
máximo	1,33	6,09	2,31
contagem	16	16	16

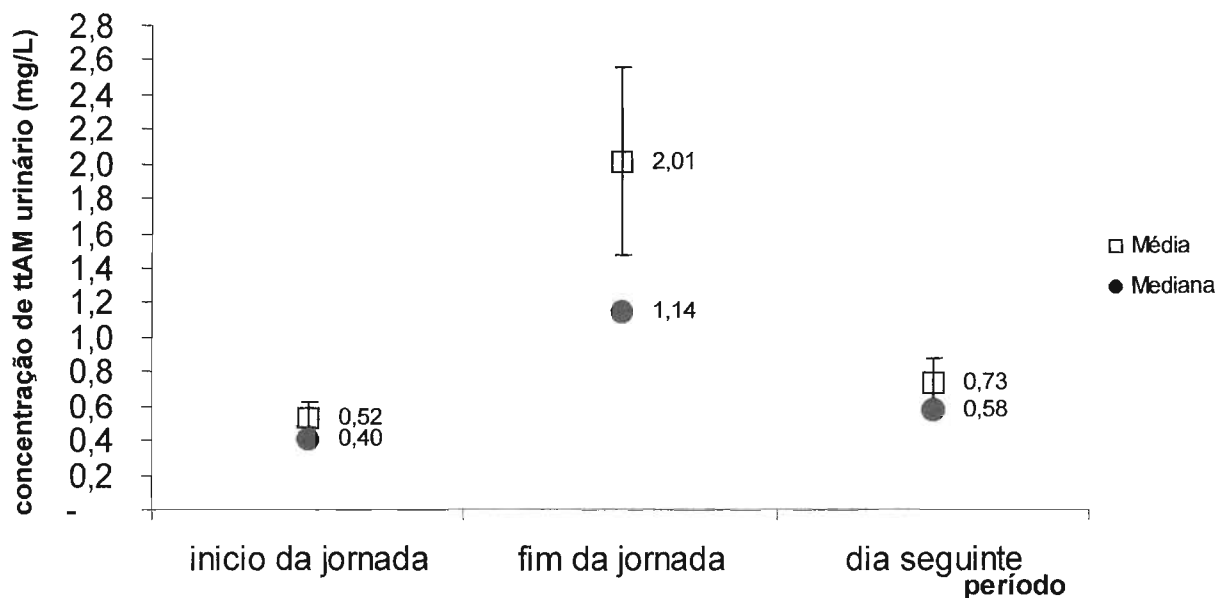


FIGURA 11- Representação das concentrações de ácido trans,trans-mucônico urinário (mg/L) nos três períodos de coleta das amostras.

TABELA 11- Medidas descritivas para as concentrações do ácido trans,trans-mucônico urinário, em mg/g creat nos três diferentes períodos de coleta, de acordo com hábito de fumar.

	fumante*	início da jornada	final da Jornada	dia seguinte à jornada
média	NF	0,33	0,83	0,34
	F	0,40	0,82	0,44
erro padrão	NF	0,11	0,25	0,09
	F	0,26	0,21	0,24
mediana	NF	0,15	0,51	0,27
	F	0,18	0,80	0,21
desvio padrão	NF	0,41	0,98	0,37
	F	0,62	0,51	0,59

* NF=não-fumante; F=fumante

TABELA 12- Medidas descritivas para as concentrações de ácido trans,trans-mucônico urinário (em mg/g creatinina) nos 3 períodos de coleta, de acordo com a ingestão de bebidas alcoólicas.

	ingestão de bebida alcoólica	início da jornada	fim da jornada	dia seguinte à jornada
média	sim	0,47	0,49	0,25
	não	0,37	0,95	0,49
erro padrão	sim	0,33	0,15	0,07
	não	0,14	0,18	0,17
mediana	sim	0,16	0,48	0,18
	não	0,18	1,07	0,29
desvio padrão	sim	0,74	0,33	0,15
	não	0,47	0,61	0,55

6 DISCUSSÃO

A classificação do benzeno pela *International Agency for Research of Cancer* (IARC) como agente carcinogênico⁵⁴ resultou numa redução dos níveis de exposição ocupacional, com conseqüente busca por outros biomarcadores que pudessem ter uma correlação significativa com o solvente presente no ambiente. Atualmente, a ACGIH propõe como média ponderada pelo tempo, TWA, um valor de 0,5 ppm, e a tendência é que valores cada vez mais baixos sejam preconizados futuramente. SCHERER *et al.* (1998)¹⁰² já relatam que o atual valor pode ser reduzido para 0,3 ppm, o que aumenta a necessidade de se obter um biomarcador eficaz.

Vários estudos, tanto em humanos como em animais, indicam que o ácido trans, trans-mucônico poderia ser um bom biomarcador na avaliação da exposição benzênica. Identificado como um produto de biotransformação do benzeno no início deste século, o ácido trans,trans-mucônico (ttAM) vem ganhando importância recentemente, pois apresenta boa correlação com o benzeno ambiental presente em baixas concentrações^{29,62,88,95,114} e, por outro lado, é uma substância que requer metodologia comumente empregada em análises toxicológicas. Apesar disso, alguns autores sugerem que é necessário certo cuidado com o uso do ttAM para concentrações de benzeno abaixo de 0,3 ppm, devido à influência de fatores interferentes, tais como hábitos alimentares, hábito de fumar e co-exposição a outros solventes aromáticos^{72,80,82,87,89,100,102,111}.

Este trabalho teve como objetivo, além de validar método para a determinação do ácido trans, trans-mucônico urinário, aplicá-lo em situações de exposição real, ou seja, em trabalhadores que manipulam o benzeno, além de definir o melhor período de coleta das amostras biológicas.

Após levantamento bibliográfico, foi feito estudo para a escolha de um método com características tais que permitissem seu emprego em análises de biomonitorização.

Neste trabalho, a escolha da cromatografia em fase líquida com detector de UV foi feita com base no fato de, além de ser a técnica bastante utilizada para determinação do ttAM em urina^{21,22,27,29,43,44,47,50,51,55,62,67,69,75,77,79,86,88,89,94,96,101,110}, é crescente a disponibilidade do equipamento em nosso país. Também foi verificado que a cromatografia líquida poderia detectar baixas quantidades do analito na amostra, tanto quanto a cromatografia gasosa, usada por outros autores^{14,15,16,98,99,114}.

O método de DUCOS *et al.* (1990)⁴³ foi considerado apropriado para a fase da identificação do analito, dado que as condições cromatográficas eram possíveis de serem reproduzidas. O método de LEE *et al.* (1993)⁶⁹ foi o escolhido para a extração do analito em fase sólida, sendo a coluna empacotada no próprio laboratório.

A padronização analítica foi iniciada através de testes preliminares com duas diferentes colunas cromatográficas para verificar em qual seriam obtidos baixo tempo de retenção e boa separação entre os picos de componentes normais da urina e o pico do ttAM. A primeira a ser utilizada foi a Partisphere 5 C18 (110 x 4,7 mm) da Whatman e, posteriormente, a Lichrosorb RP18 acoplada a uma pré- coluna R2 da Chrompack.

Nos trabalhos revistos eram utilizadas sempre as colunas de fase reversa e, na maioria deles, a de octadecilsilano. A Lichrosorb RP18, por ter partículas irregulares segundo os catálogos explicativos dos fabricantes, seria de grande aplicação para a análise de ácidos orgânicos, característica esta do ttAM.

A fase móvel deveria apresentar polaridade suficiente para liberar a substância dos sítios de ligação da coluna e conduzi-la até o detector. Para isso, duas fases foram testadas: uma composta de metanol:ácido acético 1% (10:90) e a outra, por metanol: ácido acético: acetato de sódio 5 mmol/L (1:10:89).

Em virtude dos testes realizados com a coluna Partisphere C18 não terem apresentado bons resultados, sendo considerada ineficiente a separação cromatográfica com as duas fases móveis, passou-se a testar a eficiência da Lichrosorb RP18. Esta permitiu boa separação entre os picos do padrão, padrão interno e dos outros componentes endógenos da urina, sendo a escolhida para as análises posteriores.

As duas fases móveis apresentaram bons resultados; entretanto, a constituída de ácido acético/ metanol/ acetato de sódio aumentava o tempo de retenção em cerca de 3 minutos, tanto do padrão do analito quanto do padrão interno. Por outro lado, não resultou em melhor separação dos picos, quando comparados a resolução obtida com a fase metanol/ ácido acético, nem produzia menor flutuação dos tempos de retenção após cada injeção. Segundo LEE *et al.* (1993)⁶⁹, tais variações seriam minoradas com a inclusão do acetato de sódio na solução, o que poderia também aumentar a possibilidade de entupimento da coluna. O aumento no tempo de retenção foi considerado uma desvantagem, pois análises rotineiras com maior quantidade de amostras iriam consumir maior tempo.

Portanto, a coluna Lichrosorb RP18 e a pré- coluna R2, em conjunto com a fase móvel ácido acético 1%: metanol (9:1), mostraram-se adequadas para a separação. O fluxo de 1 mL/min da fase móvel e o comprimento de onda do detector de 259 nm, adotados neste trabalho, foram anteriormente utilizados por outros autores^{27,44,62,68,95,110}.

O ácido vanílico, preconizado por LEE *et al.* (1993)⁶⁹, foi utilizado como padrão interno para eliminar as variações durante a preparação da amostra e para compensar as perdas advindas do procedimento de extração, além de auxiliar a correta identificação do ttAM. DUCOS *et al.* (1992)⁴³ reportaram o uso do ácido hipúrico, presente normalmente na urina, como um composto de referência para esta análise.

Com as condições estabelecidas, foram feitas injeções de soluções-padrão de ttAM em diferentes concentrações, e os resultados mostraram covariância positiva entre x e y, sendo o coeficiente encontrado de 0,9996 e

o limite de detecção de 0,05 mg/L. A relação dos tempos de retenção do ttAM e do ácido vanílico permitiu a identificação do analito ($t_{rr} = 0,39 \pm 0,02$), sendo 15 minutos o tempo gasto para a análise de cada amostra.

Ultimamente, a extração em fase sólida vem sendo muito utilizada nos laboratórios de Toxicologia Analítica, por ser uma técnica que pode ser empregada nas mais variadas matrizes biológicas, apresentando sobre a extração líquido-líquido inúmeras vantagens, dentre elas, a não exposição do analista a grandes quantidades de solventes e a obtenção de extratos límpidos¹⁰³.

A resina de troca iônica DOWEX 1[®] usada para a extração do ttAM da urina mostrou-se adequada, observando-se que a recuperação analítica é modificada em função do pH dos reagentes e também da quantidade de resina. Esta extração foi considerada simples e de custo operacional reduzido, em comparação com outros métodos, que utilizam os cartuchos prontos SAX⁴³.

Com o intuito de melhorar a separação do ttAM dos interferentes urinários, a coluna Lichrosorb RP 18 (150 x 3 mm) foi mantida à temperatura constante de 27°C, conforme sugerido por MAESTRI *et al.* (1998)⁷⁹.

Para que os resultados analíticos fossem confiáveis, a validação do método foi devidamente estabelecida visando a minimizar os erros e a assegurar a máxima qualidade do trabalho.

Os dados do estudo da linearidade demonstram que há covariância positiva entre as concentrações de ttAM, de 0,2 a 5,0 mg/L e as respectivas áreas relativas (padrão ttAM/ padrão interno). O coeficiente de determinação obtido de 0,9933 está de acordo com os publicados por outros autores, como LEE *et al.* (1993)⁶⁹ de 0,99 e MAESTRI *et al.* (1995)⁷⁵ de 0,9998.

O intervalo de concentrações escolhido permite analisar amostras de trabalhadores expostos a altas e a baixas concentrações de benzeno. Assim, com o intervalo linear encontrado, pode-se detectar os teores

urinários de ttAM em indivíduos que manipulam o benzeno, ainda que não seja suficiente para detectar os níveis de referência, média de 0,14 mg/g creat, conforme relatados por SCHERER *et al* (1998)¹⁰².

Pelos cromatogramas obtidos com a injeção de extrato de urina sem adição e de adicionado de 1 mg/L, é possível verificar que há separação dos picos de ttAM dos outros componentes urinários. Nesta etapa, também foram efetuadas algumas modificações condicionando a resina maior número de vezes com água. O fluxo de eluição dos líquidos através da coluna foi mantido constante, nunca excedendo 1 mL/ min.

Ainda assim, não foi possível boa separação, o que também pôde ser observado em outros trabalhos que já utilizaram estas condições. Além disso, é possível haver na urina um pico de igual tempo de retenção do ttAM (Fig. 6), ele mesmo presente como constituinte na amostra, o que concorda com as observações de outros autores^{43,69}.

Neste estudo, a curva de calibração foi injetada a cada lote de amostras para possibilitar a quantificação mais confiável do analito. Visto a pequena variação nas respostas de mesma concentração, optou-se por usar os calibradores em duplicata. As curvas eram injetadas, uma no início e outra no final de cada lote de amostras.

O limite de quantificação (LQ) foi determinado de duas maneiras. A primeira como sendo a concentração que forneceu um pico de ttAM dez vezes maior que o pico de urina de adição e a segunda, a menor concentração quantificada imprecisão determinada, ou seja, um coeficiente de variação menor que 10%^{35,71,107}. Com um CV de 7,6%, e uma área dez vezes maior que a obtida com a urina sem adição, a concentração 0,2 mg/L foi considerada como sendo este limite, para qualquer um dos dois modos de obtê-lo.

O limite de detecção (LD) também foi determinado de duas maneiras e os resultados se confirmaram. Com um CV de 25,7% e área três vezes maior que a obtida com uma urina sem adição, a concentração 0,1 mg/L foi

considerada como LD do método. Segundo alguns autores, coeficientes entre 20 e 30% são adequados ¹⁰⁷. INOUE *et al.* (1989) ⁵⁶ e POPP *et al.* (1994) ⁹⁴ obtiveram LD similares, usando CLAE/UV na identificação e extração líquido-líquido e em fase sólida, respectivamente.

Os resultados da recuperação do método, obtidos a partir de adicionados de padrão de ttAM às amostras de urina nas concentrações de 0,2; 2,0 e 5,0 mg/L, forneceram valores respectivamente de 70,5; 82,4 e 78,3 % (média de 77,1%). Este estudo foi realizado três vezes e somente aumentando a quantidade de resina de 300 para 500 mg e, proporcionalmente, os líquidos de eluição, é que os resultados foram aceitos e considerados satisfatórios para a análise. Valores em torno de 90% foram reportados por outros autores ^{43,51,69,98}. Acredita-se que nas concentrações mais baixas, a perda envolvida na técnica de extração seja maior, somando-se a isto o fato da extração em fase sólida, com colunas previamente empacotadas diminuir as perdas com relação àquelas preparadas manualmente.

Os coeficientes de variação obtidos para a precisão intra-ensaio para as concentrações de 0,2; 2,0 e 5,0 mg/L, de 7,6; 8,7 e 6,9% e os da precisão interensaio, de 13,5%; 10,0% e 8,5% foram considerados satisfatórios, similares aos reportados por outros autores ^{55,69,98}. Variações de até 15-20% têm sido consideradas aceitáveis ^{34,107}.

No estudo de estabilidade, os resultados mostraram que no intervalo analisado, de 15 semanas, a concentração de 0,2 mg/L de ttAM em urina mostrou-se estável somente por 6 semanas; a partir da sétima semana, o valor já se encontrava fora do gráfico controle. Já para o calibrador 2,0 mg/L, a estabilidade foi de 15 semanas, permanecendo o analito na amostra estável durante o período. Optou-se por analisar o material biológico semanalmente, levando-se em conta os ciclos de congelamento e descongelamento e com uso de HCl 6 mol/L ¹⁰² pois, acredita-se que, nos laboratórios especializados, será esse o procedimento usado para conservar a amostra. Também foi analisada a estabilidade por um período de dez dias

em amostras conservadas a 4 °C (Tab. 6), e os resultados permitem concluir que o analito permaneceu estável durante este período para as concentrações estudadas.

Alguns autores relatam períodos de estabilidade do ttAM em urina, tais como de 2 semanas, para amostras, contendo 5,5 mg/L do analito, conservadas à temperatura ambiente ⁴³; um mês a -20°C, para adicionados de 0,3 a 4,8 mg/L e com uso de HCl 6 mol/L ⁶⁹; quatro meses a -20°C, sem conservante e uma semana à temperatura ambiente, para uma solução a 40 mg/L ²⁹.

Os resultados obtidos no estudo da exatidão, apesar de realizados com amostra adicionada, pela impossibilidade de se obter amostra certificada, mostraram-se satisfatórios (Tab. 7), principalmente para as concentrações mais altas, de 2,0 e 5,0 mg/L.

Avaliou-se, ainda, o efeito da matriz (Fig. 9) e através da análise da regressão múltipla, foi possível verificar que o coeficiente angular das duas retas pode ser considerado igual ($p=0.474$), mas os coeficientes lineares foram considerados diferentes ($p<0.001$). Isto significa que um aumento na concentração de ttAM produz em média o mesmo aumento na área relativa, utilizando-se tanto a curva em água quanto em urina, embora a resposta difira pela constante, o coeficiente linear. Optou-se por fazer os calibradores sempre em urina.

Aplicando-se o método validado, mantidas fixas as condições cromatográficas descritas em 4.2.1.1., foram analisadas amostras de 25 trabalhadores de uma refinaria, em três períodos diferentes (total de 75 amostras), para se estabelecer o melhor período de coleta das mesmas.

Os valores de referência individuais de ttAM urinário foram determinados nas análises de uma das amostras coletadas antes da exposição ocupacional, no início da jornada de trabalho, sendo que, como descrito anteriormente, cada trabalhador fica apenas 1 dia da semana em ambiente onde se manipula o benzeno.

De acordo com os resultados obtidos, o limite de quantificação do método não permitiu a quantificação de ttAM nas amostras de 9 trabalhadores, pois os valores encontrados situaram-se abaixo dele. Assim, como não foi possível comparar os níveis de ttAM nos três períodos de coleta, as amostras desses trabalhadores foram desconsideradas.

Os resultados obtidos (Tabela 8) foram expressos em função da creatinina e da densidade urinária, pois, na impossibilidade da obtenção de amostras de urina de 24 horas, entendeu-se que essas seriam as melhores formas de expressar a excreção urinária do ttAM, sendo a creatinina considerada mais satisfatória que a densidade ³.

Se for considerado o valor de 0,5 mgttAM/gcreatinina, sugerido pela ACGIH^{® 6}, como índice biológico de exposição, pode-se observar (Tab. 8) que 62,5% dos trabalhadores apresentaram valores superiores no final da jornada.

Valores de ttAM urinário entre 0,9 e 1,9 mg/g creatinina têm sido relacionados à exposições a 1 ppm de benzeno ^{47,58,65,102}, limite aceito atualmente no Brasil. Apesar de não ter sido possível realizar a análise de amostras ambientais pela impossibilidade da empresa em fazê-lo e que poderiam implementar a discussão dos resultados de ttAM urinário nas amostras dos trabalhadores, as concentrações do analito detectadas na população avaliada indicam que, provavelmente, a exposição era a baixos níveis, necessitando contudo, de estudos posteriores para confirmar estes achados.

Utilizando o teste de FRIEDMAN (análise não-paramétrica), foi detectada diferença ($p=0.025$) entre as medidas nos três períodos de coleta. Estimativas para a mediana levam à constatação de que as amostras do final da jornada forneceram resultados significativamente superiores às demais e que existe igualdade para as coletadas antes da jornada e no dia seguinte ($p=0.225$).

Comparando-se a mediana, medida mais robusta, encontrada (Tab. 11) para o grupo de fumantes em relação ao de não-fumantes, não foi possível detectar diferenças, discordando dos achados de outros autores^{69,86}, que encontraram níveis superiores de ttAM em fumantes. Todavia, os resultados deste trabalho, em relação ao hábito de fumar, se somam aos de VIVOLI *et al.* (1995)¹¹⁰, que encontrou níveis de ttAM levemente superiores nas amostras analisadas, comparando-se essas duas populações. Contudo, para confirmar estas observações, são necessários trabalhos com maior número de amostras.

Como pode ser observado na Tabela 12, níveis superiores de ttAM, são observados em indivíduos que não ingerem bebidas alcoólicas provavelmente por ser o etanol um potente inibidor de enzimas. Esta inibição é pronunciada sobre as enzimas biotransformadoras dos solventes de baixo peso molecular¹⁰.

Não foram observadas grandes diferenças nos resultados de ttAM encontrados nos trabalhadores, em relação ao tempo de trabalho na empresa nem tão pouco, a atividade exercida nos vários setores (Tab. 3).

Os valores obtidos nas amostras coletadas antes da jornada variaram de 0,10 a 1,79 mg/g creatinina. Pela análise dos questionários, foi possível observar que das amostras coletadas antes da jornada (referência) que apresentaram valores um pouco acima do referido por SCHERER *et al.* (1998)¹⁰², algumas são de indivíduos fumantes, outras de trabalhadores com história de exposição fora do local de trabalho, e outras de indivíduos com o hábito de ingerir alimentos com sorbatos, como sucos de frutas e margarina, interferentes difíceis de se quantificar.

Estes achados não são suficientes para delimitar a real dimensão dos fatores interferentes sobre os teores urinários de ttAM, mas com certeza, vêm reforçar os achados de outros autores.

7 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados experimentais obtidos no presente trabalho, podemos concluir que:

- O método analítico por cromatografia líquida de alta eficiência e extração em fase sólida para análise do ácido trans, trans-mucônico (ttAM) em urina apresentou linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção e de quantificação adequados à sua aplicação na biomonitorização de trabalhadores expostos ao benzeno;
- O uso da coluna de fase reversa Lichrosorb RP 18, a pré-coluna R2 e a fase móvel metanol: ácido acético 1% (10:90) possibilitou a separação do ttAM dos vários interferentes presentes na matriz biológica co-extraídos e sua posterior quantificação com relação ao padrão interno, ácido vanílico;
- As amostras de urina podem ser conservadas a -20°C por 15 semanas sem perdas significativas do analito, sendo este período variável com a concentração de ttAM presente;
- Há diferenças estatisticamente significativas entre os teores de ácido trans-trans, mucônico nos três diferentes períodos de coleta de amostras. As coletadas no final do turno apresentam maiores quantidades de ttAM, em relação às coletadas no início da jornada e no dia seguinte, anterior à próxima exposição. Assim, os dados demonstram que, o final da jornada de trabalho é o período de maior excreção do analito em questão e pode ser escolhido para a coleta das amostras;
- Não há diferença significativa entre os níveis encontrados no início da jornada e os do dia seguinte, mostrando a rápida excreção urinária do ttAM;

- Teores mais elevados de ttAM urinário em alguns trabalhadores antes da exposição ao benzeno corroboram a inespecificidade deste bioindicador, sendo importante considerar outros fatores ao se avaliar resultados do ttAM, especialmente se os níveis da exposição ocupacional ao benzeno são baixos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. AKSOY, M. Different types of malignancies due to occupational exposure to benzene: a review of recent observations in Turkey. **Environ. Res.**, New York, v. 23, p. 181-190, 1980.
2. AKSOY, M. Malignancies due to occupational exposure to benzene. **Am. J. Ind. Med.**, New York, v. 7, p.395-402, 1985.
3. ALESSIO, L., BERLIN, A., TOFFOLETTO, F., GHEZZI, I. Reability of urinary creatinine as a parameter used to adjust of urinary biological indicators. **Int. Arch. Occup. Environm. Health**, Berlim, v.55, p.99-106, 1985.
4. AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS. **Threshold limit values for chemical substances and physical agents. Biological exposures indices**. Cincinatti: ACGIH, 1996.
5. AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS. **Threshold limit values for chemical substances and physical agents. Biological exposures indices**. Cincinatti: ACGIH, 1998.
6. AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS. **Threshold limit values for chemical substances and physical agents. Biological exposures indices**. Cincinatti: ACGIH, 1999.
7. ANGERER, J. & HORSCH, B. Determination of aromatic hydrocarbons and their metabolites in human blood and urine. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.580, p.229-255,1992.
8. ANUÁRIO DA INDÚSTRIA QUÍMICA BRASILEIRA. São Paulo, ABIQUIM. 1998.

9. ANUÁRIO PETROQUÍMICO LATINO AMERICANO. 1997/1998.
10. APOSTOLI, P. & ALESSIO, L. Fatori condizionanti assorbimento e metabolismo del benzene. In: MINOIA, C., APOSTOLI, P., BARTOLUCCI, G.B.. **Il benzene: tossicologia, ambienti di vita e di lavoro**. Milano: Morgan, 1995, p.17-26.
11. AUGUSTO, L.G.S. Histological damage in bone marrow by exposure to benzene and follow up of peripheral blood count of workers with chronic intoxication. **Rev. Bras. Saúde Ocup.**, São Paulo, v.21, n.78, p.86-92, 1993.
12. BARALE, R. Genotossicità del benzene. In.: **Il benzene: toxicologia, ambienti di vita e di lavoro**. Milano: Morgan, 1995. p.41-50.
13. BARBOSA, E.M. Exposição ocupacional ao benzeno: o ácido trans, trans-mucônico como indicador biológico de exposição na indústria de refino de petróleo. Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1997 (Dissertação de Mestrado).
14. BARTCZAK, A., KLINE, S.A., YU, R., WEISEL, C.P., GOLDSTEIN, B.D., WITZ, G. Evaluation of assays for the identification and quantification of muconic acid, a benzene metabolite in human urine. **J. Toxicol. Environ. Health**, Washington, v.42, p.245-258, 1994.
15. BECHTOLD, W.E. & HENDERSON, R.F. Biomarkers of human exposure to benzene. **J. Toxicol. Environ. Health**, Washington, v.40, p.377-386, 1993.
16. BECHTOLD, W.E., LUCIER, G., BIRNBAUM, L.S., YIN, S.N., LI, G.L., HENDERSON, R.F. Muconic acid determinations in urine as a biological exposure index for workers occupationally exposed to benzene. **Am. Ind. Hyg. Assoc. J.**, Akron, v.52, n.11, p. 473-478, 1991.

17. BECHTOLD, W.E., WILLIS, J.K., SUN, J.D., GRIFFITH, W.C., REDDY, T.V. Biological markers of exposure to benzene: S-phenylcysteine in albumin. **Carcinogenesis**, London, v.13 , n.7, p. 1217-1220, 1992.
18. BERLIN, A., YODAIKEN, R.E., LOGAN, D.C. International seminar on the assessment of toxic agents at the workplace: roles of ambient and biological monitoring, Luxemburg, 8-12 December, 1980. **Int. Arch. Occup. Environ. Health.**, Berlin, v.50, p.197-207, 1982.
19. BERLIN, M. Low levels benzene exposure in Sweden: effect on blood elements and body burdem of benzene. **Am. J. Ind. Med.**, New York, v.7, p.365-373, 1985.
20. BOGADI-SARE, A., BRUMEN, V., TURK, R., KARACIC, V., ZAVALIC, M. Genotoxic effects in workers exposed to benzene: with especial reference to exposure markers and confounding factors. **Ind. Health**, Kawasaki, v.35, n.3, p.367-371, 1997.
21. BOOGARD, P.J. & VAN SITTERT, N.J. Biological monitoring of exposure to benzene: a comparison between S-phenylmercapturic acid, trans, trans-muconic acid, and phenol. **Occup. Environ. Med.**, London, v.52, p.611-620, 1995.
22. BOOGARD, P.S. & VAN SITTERT, N.J. Suitability of s-phenylmercapturic acid and trans, trans-muconic acid as biomarkers for exposure to low concentrations of benzene. **Environ. Health Perspect.**, Research Triangle Park, v. 104 (suppl 6), p.1151-1157, 1996.
23. BOYLAND, E. **The role of benzene in carcinogenesis**. Forum TVC Centenary of Occupational Health, London School of Hygiene and Tropical Medicine, London WC1E7HT, Great Britain, 560-561.
24. BRASIL. Ministério da Previdência Social. **Benzenismo: Norma técnica sobre a Intoxicação ao benzeno**. INSS, Brasília, 1993, 28p.

25. BRASIL. Ministério do Trabalho e Ministério da Saúde. **Portaria Interministerial, n.3 de 28/04/1982**. Diário oficial da União, seção I , p. 7781, 30/04/1982.
26. BRASIL. Ministério do Trabalho/ Fundacentro. **Acordo e Legislação sobre o benzeno**. 1996.
27. BRONDEAU, M.T., DUCOS, P., GAUDIN, R., MOREL, G., BONNET, P., CEARRIZ, J. Evaluation of the interaction of benzene and toluene on the urinary excretion of t,t-muconic acid in rats. **Toxicol. Lett.**, Amsterdam, v.61, p. 311-316, 1992.
28. BRUGNONE, F., PERBELLINI, L., MARANELLI, G., ROMEO, L., GUGLIELMI, G., LOMBARDINI, F. Reference values for blood benzene in the occupationally unexposed general population. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlin, v. 64, p. 179-184, 1992.
29. BURATTI, M., FUSTINONI, S., COLOMBI, A. Fast liquid chromatographic determination of urinary trans, trans-muconic acid. **J. Chromatog. B**, Amsterdam, v. 677, p. 257-263, 1996.
30. CANADÁ. Minister of Supply and Services. Canadian environmental protection act. Benzene. (**Priority substances list assessment report**). Canadá, 1993.
31. CANDURA, S.M., LA PAGLIA, G., MANZO, L.. Metabolismo e meccanismi di tossicità del benzene. In: MINOIA, C., APOSTOLI, P., BARTOLUCCI, G.B.. **Il benzene: tossicologia, ambienti di vita e di lavoro**. Milano: Morgan, 1995, p.3-15.
32. CARVALHO, A.B., ARCURI, A.S.A., BEDRIKOW, B., AUGUSTO, L.G.S., OLIVEIRA, L.C.C., BONCIANI, M., KATO, M., GRAMACHO, M.I.P., FREITAS, N.B.B., NOVAES, T.C.P. **Benzeno: subsídios técnicos a Secretaria de Segurança e Saúde do Trabalho (SSST/MTB)**. São Paulo: Fundacentro-Fundunesp, 1995, 2ª ed, 86p.

33. CASSITO, M.G., GIGLIOLI, R., CAMERINO, A., COLOMBINI, A. **Studio italiano di um progetto di indagine multicentrica su popolazioni esposte a miscele di solventi organici delle vernice**. Milano: Institute di Medicine del Lavoro- Università degli Studi di Milano, 1989.
34. CHASIN, A.A.M., CHASIN, M., SALVATORI, M. Validação de métodos cromatográficos em análises toxicológicas. **Rev. Farm. Bioq. Univ. São Paulo**, São Paulo, v.30, n.2, p.49-53, 1994.
35. CHASIN, A.A.M., NASCIMENTO, E.S., RIBEIRO-NETO, L.M., SIQUEIRA, M.P.B., ANDRAUS, M., SALVADORI, M.C., FERNÍCOLA, N.A.G., GORNI, R., SALCEDO, S. Validação de métodos em análises toxicológicas: uma abordagem geral. **Rev. Bras. Toxicol.**, São Paulo, v.11, n.1, p.1-6, 1998.
36. COCCEO, V. Evoluzione dell' esposizione ambientale a benzene. In: MINOIA, C., APOSTOLI, P., BARTOLUCCI, G.B.. **Il benzene: tossicologia, ambienti di vita e di lavoro**. Milano: Morgan, 1995, p.81-88.
37. CONOVER, W.J. **Practical nonparametric statistics**. New York: John Wiley & Sons, 1975.
38. COOPER, K.R. & SNYDER, R. Benzene Metabolism. In: Aksoy, M. **Benzene Carcinogenicity**. Flórida: CRC Press, 1988. p. 33-58.
39. COPERSUCAR. **Instruções de Segurança para manuseio do benzeno (C₆H₆)**. Divisão de segurança Agroindustrial do Centro de Tecnologia Copersucar., série de Segurança Agroindustrial, n.º 0002, Julho, 1993 (folheto).
40. COTICA, D. Metodi di campionamento ed analisi del benzene aerodisperso. In: MINOIA, C., APOSTOLI, P., BARTOLUCCI, G.B.. **Il benzene: tossicologia, ambienti di vita e di lavoro**. Milano: Morgan, 1995, p.273-282.

41. CRONKITE, E.P., DREW, R.T., INOUE, T., BULLIS, J.E. Benzene hematotoxicity and leukemogenesis. **Am. J. Ind. Med.**, New York, v.7, p.447-456, 1985.
42. DAIKER, D.H., MOSLEN, M.T., CARR, J.B., WARD Jr., J.B. Repeated oral benzene exposure alters enzymes involved in benzene metabolism. **J. Toxicol. Environ. Health**, Washington, v.78, p.439-451, 1996.
43. DUCOS, P., GAUDIN, R., BEL, J., MAIRE, C., FRANCIN, J.M., ROBERT, A., WILD, P. trans, trans-muconic acid, a reliable biological indicator for the detection of individual benzene exposure down to the ppm level. **Int. Arch. Occup. Environm. Health**, Berlin, v.64, p.309-313, 1992.
44. DUCOS, P., GAUDIN, R., ROBERT, A., FRANCIN, J.M., MAIRE, C. Improvement in HPLC analysis of urinary trans, trans-muconic acid, a promising substitute for phenol in the assessment of benzene exposure. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlin, v.62, p.529-534, 1990.
45. FOLKINS, O.H. Benzene. in: **ULLMANN'S Encyclopedia of industrial chemistry**. Weinheim: VCM, 1985, 5^a ed. v.A3, p.475-505.
46. GAD-EL-KARIM, M.M., SADAGOPA RAMANUJAM, V.M., AHMED, A.E., LEGATOR, M.S. Benzene myeloclastogenicity: a function of its metabolism. **Am. J. Ind. Med**, New York, v.7, p.475-484, 1985.
47. GHITTORI, S., FIORENTINO, M.L., MAESTRI, L., ZADRA, P., IMBRIANI, M. Indicatori biologici Urinari dell'esposizione a benzene: benzene urinario, acido S-fenilmercapturico, acido trans, trans-muconico. In: MINOIA, C., APOSTOLI, P., BARTOLUCCI, G.B.. **Il benzene: tossicologia, ambienti di vita e di lavoro**. Milano: Morgan, 1995, p.347-357.

48. GHITTORI, S., MAESTRI, L., FIORENTINO, M.L., IMBRIANI, M. Evaluation of occupational exposure to benzene by urinalysis. *Int. Arch. Occup. Environm. Health*, Berlin, v.67, p.195-200, 1995.
49. GHITTORI, S., MAESTRI, L., ROLANDI, L. LODOLA, L., FIORENTINO, M.L., IMBRIANI, M. The determination of trans, trans-muconic acid in urine as an indicator of occupational exposure to benzene. *Appl. Occup. Environ. Hyg.*, Cincinnati, v.11, n.3, p.187-191, 1996.
50. GIARIN, E., GORI, G., PERICO, A., BAVAZZANO, P., PASIN, P., BARTOLUCCI, G.B. **Metodo per la determinazione di basse concentrazioni dell'acido trans, trans-muconico urinario.** Atti del 16° Congresso Nazionale dell' A.I.D.I.I., Documento I, 14, 1997.
51. GOBBA, F. ROVESTI, S. P., BORELLA, R. VIVOLI, CASELGRANDI, E., VIVOLI, G. Inter individual variability of benzene metabolism to trans, trans-muconic acid and its implications in the biological monitoring of occupational exposure. *Sci. Total Environ.*, Amsterdam, v.199, p.41-48, 1997.
52. HAJIMIRAGHA, H., EWERS, U., BROCKHAUS, A., BOETTGER, A. Levels of benzene and other volatile aromatic compounds in the blood of non-smokers and smokers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v. 61, p.513-518, 1989
53. HOLMBERG, B. & LUNDBERG, P. Benzene: Standards, Occurrence, and exposure. *Am. J. Ind. Med.*, New York, v. 7, p. 375-383, 1985.
54. IARC – International Agency for Research in Cancer. **Benzene – Monographs on the valuation of carcinogenic risk of chemicals to humans.** Lyon: IARC, v. 29, 1982.
55. INOUE, O., SEIJI, K., NAKATSUKA, H., WATANABE, T., YIN, S-N., LI, G-L, CAI, S-X, JIN, C., IKEDA, M. Urinary t,t-muconic acid as an indicator of exposure to benzene. *Br. J. Ind. Med.*, London, v.46, p.122-127, 1989.

56. INOUE, T., TAKEUCHI, Y., HISANAGA, N., ONO, Y., IWATA, M., OGATA, M., SAITO, K., SAKURAI, H., HARA, I., MATSUSHITA, T., IKEDA, M. A Nationwide survey on organic solvent components in various solvent products: Part 1. Homogeneous products such as thinners, degreases and reagents. **Ind. Health**, Kawasaki, v.21, p.175-183, 1983.
57. JOHNSON, E.S. & LUCIER, G. Perspectives on risk assessment impact of recent reports on benzene. **Am. J. Ind. Med.**, New York, v.21, p.749-757, 1992.
58. JOHNSON, E.S. Biomarkers of exposure to low concentrations of benzene: a field assessment. **Occup. Environ. Med.**, London, v. 54, p.68, 1997.
59. JOHNSTON, J.J., DRAPER, W.M., STEPHENS, R.D. LC-MS Compatible HPLC Separation for xenobiotics and their phase I and phase II metabolites: simultaneous anion exchange and revised phase chromatography. **J. Chromat. Science**, Niles, v. 29, p.511-516, 1991.
60. KASAHARA, M., SUZUKI, H., TAKEUSHI, Y., HARA, I., IKEDA, M. n-Hexane, benzene and other aromatic components in petroleum distillate solvents in Japan. **Ind. Health**, Kawasaki, v.25, p.205-214, 1987.
61. KIRLEY, T.A., GOLDSTEIN, B.D., MANIARA, W.N., WITZ, G. Metabolism of trans, trans-muconaldehyde, a microsomal hematotoxic metabolite of benzene, by purified yeast aldehyde dehydrogenase and a mouse liver soluble fraction. **Toxicol. Applied Pharmacol.**, Canadá, v.100, p.360-367, 1989.
62. KIVISTO, H., PEKARI, K., PELTONEN, K., SVINHUFVUD, J., VEIDEBaum, T., SORSA, M., AITIO, A. Biological monitoring of exposure to benzene in the production of benzene and in a cokery. **Sci. Total Envir.**, Amsterdam, v.199, p.49-63, 1997.

63. KUMAI, M., KOIZUMI, A., SAITO, K., SAKURAI, H., INOUE, T., TAKEUCHI, Y., HARA, I., OGATA, M., MATSUSHITA, T., IKEDA, M. Nationwide survey on organic solvent components in various solvent products: Part 2. Heterogeneous products such as paints, inks and adhesives. **Ind. Health**, Kawasaki, v.21, p.185-197, 1983.
64. LARINI, L. Compostos voláteis. In: **Toxicologia**. São Paulo: Manole, 1987, 2ªed. p.69-108.
65. LAUWERYS, R.R. & HOET, P. **Industrial chemical exposure: Guidelines for biological monitoring**. Flórida: Levis Publishers, 1993, 2ªed. 318 p.
66. LAUWERYS, R.R. Benzene. In: ALESSIO, L., BERLIM, A. ROI, R., BONI, M. (Ed.) **Human biological monitoring of industrial chemicals series**. Comission of the European Communities, EUR 8476 EN, 1993.
67. LAUWERYS, R.R., BUCHET, J.P., ANDRIEN, F. Muconic acid in urine: a reliable indicator of occupational exposure to benzene. **Am. J. Ind. Med.**, New York, v.25, p.297-300, 1994.
68. LAUWERYS, R.R. Occupational Toxicology. In: KLAASEN, C.D. (Ed.) **Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poisons**. USA: Mc Graw Hill, 1996, 5ªed. p.987-1009.
69. LEE, B-L, NEW, A.L., KOK, P.W., ONG, H.Y., SHI, C.Y., ONG, C.N. Urinary trans, trans-muconic acid determined by liquid chromatography: application in biological monitoring of benzene exposure. **Clin Chem.**, Wiston-Salem, v.39, n.9, p.1788-1792, 1993.
70. LEITE, E.M.A. Solventes orgânicos. In: Seize, O. **Fundamentos de toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 1996. p.187-229.
71. LEITE, F. **Validação em análise química**. Campinas: Átomo, 1996. 124p.

72. LIU L., ZHANG, Q., FENJ, J. Urine level of trans, trans-muconic acid used as an index of internal dose of exposure to benzene. **Chung Hua Yu Fang I Hsueh Tsa Chih**, China, v.30, p.148-150, 1996. (em chinês, com resumo em inglês)
73. LIU, L., FENG, J., ZHANG, Q., DONG, L. The study of 8-OHdg as a biomarker for genotoxicity of workers to benzene, toluene, and xilene. **Zhonghua Lao dong Weisheng Zhiyebing Zazhi**, China, v.14, n.1, p.1-3, 1996. (em chinês, com resumo em inglês)
74. LOCATELLI, G., MACCARINI, D., BUTERA, R., VARANGO, C., MANZO, L. Tossicologia clínica del benzene negli incidenti chimici industriali e ambientali. In: MINOIA, C., APOSTOLI, P., BARTOLUCCI, G.B. **Il benzene: tossicologia, ambienti di vita e di lavoro**. Milano: Morgan, 1995, p.27-39.
75. MAESTRI, L., GHITTORI, S., FIORENTINO, M.L., IMBRIANI, L. II dosaggio dell'acido trans, trans-muconico urinario a basse concentrazioni. **Med. Lav.**, Milano, v.86, n.1, p.40-49, 1995.
76. MAESTRI, L., GHITTORI, S., GRIGNANI, E., FIORENTINO, M.L., IMBRIANI, M. Dosaggio di un metabolito del benzene L'acido S-fenilmercapturico urinario (S-PMA), nell'uomo, mediante HPLC. **Med. Lav.**, Milano, v.84, n.1, p.55-65, 1993.
77. MAESTRI, L., GHITTORI, S., IMBRIANI, M. An improved HPLC method for the determination of urinary trans, trans-muconic acid humans. **Am. Clin. Lab.**, Shelton, v.15, n.3, p.22-23, 1996
78. MAESTRI, L., GHITTORI, S., IMBRIANI, M. Determination of specific mercapturic acids as an index of exposure to environmental benzene, toluene and stirene. **Ind. Health**, Kawasaki, v.35, n.4, p.489-501, 1997.

79. MAESTRI, L., GHITTORI, S., MARRACCINI, P., ZADRA, P., IMBRIANI, M. Nota técnica: proposta di un metodo routinario per il dosaggio accurato dell'acido t, t-muconico nelle urine. **G Ital. Med. Lav. Erg.**, Pavia, v.20, n.2, p.103-106, 1998.
80. MEDEIROS, A.M., BIRD, M.G., WITZ, G. Potencial biomarkers of benzene exposure. **Toxicol. Environm Health**, Washington, v.40, n.2-3, p.377-386, 1993.
81. MEDINSKY, M.A., SABOURIN, P.J., LUCIER, G., BIRNBAUM, L.S., HENDERSON, R.F. A toxicocinetic model for simulation of benzene metabolism. **Exp. Pathol.**, Jena, v.37, p.150-154, 1989.
82. MENDES, R. **Exposição Ocupacional ao benzeno e seus efeitos sobre a saúde dos trabalhadores; estado atual do problema e questões não resolvidas. I Seminário Nacional de Exposição Ocupacional ao benzeno e outros mielotóxicos.** Belo Horizonte, 11/12 de Março de 1993.
83. NELSON, E. Determination of mercapturic acids excretions in exposure controls to toxicants. **CRC Crit. Rev. Toxicol.**, Cleveland, v.22, n.5/6, p.371-389, 1992.
84. NORPOTH, K., STÜCKER, W., KREWET, E., MÜLLER, G. Biomonitoring of benzene exposure by traces analyses of phenylguanine. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlin, v.60, p.163-168, 1988.
85. NOVAES, T.C.P. Bases metodológicas para abordagem da exposição ocupacional ao benzeno. Instituto de Química da Universidade de São Paulo, USP, 1992. (Dissertação de mestrado)
86. ONG, C.N., LEE, B.L., SHI, C.Y., ONG, H.Y., LEE, H.P. Elevated levels of benzene-related compounds in the urine of cigarette smokers. **Int. J. Cancer**, Geneva, v.59, p.177-180, 1994.

87. ONG, C.N., LEE, B.L.. Determination of benzene and its metabolites: application in biological monitoring of environmental and occupational exposure to benzene. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.660, p.1-22, 1994.
88. ONG., C.N., KOK, P.W., ONG, H.Y., SHI, C.Y., LEE, B.L., PHOON, W.H., TAN, K.T. Biomarkers of exposure to low concentrations of benzene: a field assesment. **Occup. Environ. Med.**, London, v.53, p.328-333, 1996.
89. ONG., C.N., KOK., P.W., LEE, B.L., SHI, C.Y., ONG, H.Y., CHIA, K.S., LEE, C.S., LUO, X.W. Evaluation of biomarkers for occupational exposure to benzene. **Occup. Environ. Med.**, London, v.52, p.528-533, 1995.
90. PAOLETTI, P. Application of biomarkers in populations studies for respiratory non- malignant diseases. **Toxicology**, Limerick, v.101, n.1-2, p.99-105, 1995.
91. PARKE, D.V. & WILLIAMS, R.T., Studies in detoxification. The metabolism of benzene containing ^{14}C benzene. **Biochem J.**, Grait Britain, v.54, p.231, 1953.
92. PERBELLINI, L., CERPELLONI, M. CECCO, A., FRIGNANI, S., BRUGNONE, F. L' acido trans- trans muconico urinario nel controllo biologici dell' esposizione a benzene. **Atti del 16° Congresso Nazionali dell' A.I.D.I.I.**, I Documenti 14, 1997.
93. PEZZAGNO, G. Monitoraggio biologico delle popolazioni esposte a benzene. In: MINOIA, C. APOSTOLI, B., BARTOLUCCI, G.B.. **Il benzene : tossicologia, ambienti di vita e di lavoro**. Milano: Morgan, 1995. p.125-145.

94. POPP, W., RAUSCHER, D., MÜLLER, G., ANGERER, J., NORPOTH, K. Concentrations of benzene in blood and S-phenylmercapturic and t, t-muconic acid in urine in car mechanics. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlin, v.66, p.1-6, 1994.
95. PRIANTE, E., SCHIAVON, I., BOSCHI, G., GORI, G., BARTOLUCCI, G.B., SOAVE, C., BRUGNONE, F., CLONFERO, E. Exposizione agli inquinati dell'aria urbana dei vigili municipali. **Med. Lav.**, Milano, v.87, n.40, p.314-322, 1996.
96. RAUSCHER, D., LEHNERT, G., ANGERER, J. Biomonitoring of occupational and environmental exposure to benzene by measuring trans, trans-muconic acid in urine. **Clin. Chem.**, Winston-Salem, v.40, n.7, p.1464-70, 1994.
97. REVOL, L.M.M.P. & GERARD, R. La fréquence des expositions benzéniques méconnues au cours des hemopathies graves. **J. Med Lyon**, Lyon, 5 May, p.791-797, 1969.
98. RUPPERT, T., SCHERER, G., TRICKER, A.R., ADLKOFER, F. *trans, trans*-muconic acid as a biomarker of non-occupational environmental exposure to benzene. **Int. Arch. Occup. Environ. Health**, Berlin, v.69, p.247-251, 1997.
99. RUPPERT, T., SCHERER, G., TRICKER, A.R., RAUSCHER, D., ADLKOFER, F. Determination of urinary trans, trans-muconic acid by gas chromatography-mass spectrometry. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.666, p.71-76, 1995.
100. SALGADO, P.E.T., PEZZANO, G. Indicadores biológicos da exposição ao benzeno. **Rev. Bras. Saúde Ocup.**, São Paulo, v.19, n.74, p.25-31, 1991.

101. SCHAD, H., SCHAFFER, F., WEBER, L., SEIDEL, H.J. Determination of benzene metabolites in urine of mice by solid phase extraction and high performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, Amsterdam, v.593, p.147-151, 1992.
102. SCHERER, G., RENNER, T., MEGER, N. Analysis and evaluation of trans-trans-muconic acid as a biomarker for benzene exposure. **J. Chromatogr. B**, Amsterdam, v.717, p.179-199, 1998.
103. SCHEURER, J. & MOORE, C.M. Solid-phase extraction of drugs from biological tissues: a review. **J. Anal. Toxicol.**, Niles, v.16, p.264-9, 1992.
104. SNYDER, R & ANDREWS, L.S. Toxic effects of solvents and vapors. In: KLAASEN, C.D. (Ed.) **Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poisons**. USA: Mc Graw Hill, 1996, 5 ed. p.737-771.
105. SNYDER, R., WITZ G., GOLDSTEIN, B.D. The toxicology of benzene. **Environ. Health Perspect.**, Washington, v.100, p.293-306, 1993.
106. STOMMEL, P., MÜLLER, G., STÜCKER, W., VERKOYEN, C., SCHÖBEL, S. NORPOTH, K. Determination of S-phenylmercapturic acid in the urine an improvement in the biological monitoring of benzene exposure. **Carcinogenesis**, Oxford, v.10, n.2, p.279-282, 1989.
107. TSANACLIS, L.M. Comunicação pessoal: anotação em aula. São Paulo, março, 1997.
108. VALLÉE, P. Evaluation par le dosage de l'acido muconique urinaire de l'imprégnation par le benzine, chez les mécaniciens en réparation automobile et monoculture. **Arch. Mal. Prof.**, Paris, v.56, n.8, p.620-623, 1995.

109. VAN SITTEERT, N.J., BOOGAARD, P.J., BEULINK, G.D.J. Application of the urinary S-phenylmercapturic acid test as a biomarkers for low levels of exposure to benzene in industry. **Brit. J. Ind. Med.**, London, v.50, p.460-469, 1993.
110. VIVOLI, G., ROVESTI, S., BERGOMI, M., VIVOLI, R., FERRARI, A. Monitoraggio dell'exposizione a benzene in ambiente urbano. In.: **Il benzene: toxicologia, ambienti di vita e di lavoro**. Milano: Morgan, 1995, p.303-309.
111. WEAVER, V.M., DAVOLI, C.T., HELLER, P.J., FITZWILLIAM, A., PETERS, H.L., SUNYER, J., MURPHY, S.E., GOLDSTEIN, G.W., GROOPMAN, J.D. Benzene exposure, assessed by urinary trans, trans-muconic acid, in urban children with elevated blood lead levels. **Environ. Health Perspect.**, Washington, v.104, n.3, p.318-323, 1996.
112. WHITE, M.C., INFANTE, P.F., WALKER Jr., B. Occupational exposure to benzene: a review of carcinogenic and related health effects following the U.S. Supreme Court Decision. **Am. J. Ind. Med**, New York, v.1, p.233-243, 1980.
113. WITZ, G., KIRLEY, T.A., MANIARA, W.M., MYLAVARAPU, V.J., GOLSDTEIN, B.D. The metabolism of benzene to muconic acid, a potential biological marker of benzene exposure. **Ad. Exp. Med. Biol.**, New York, p.613-618, 1990.
114. YU, R. & WEISEL, C.P. Measurement of the urinary benzene metaboliti trans, trans-muconic acid from benzene exposure in humans. **J. Toxicol. Environ. Health**, Washington, v.48, p.453-477, 1996.

9 ANEXOS

ANEXO 1

QUESTIONÁRIO

DADOS SOBRE A AMOSTRAGEM

Nº DA AMOSTRA:

Data da coleta:

Hora da coleta:

Volume de urina coletada:

Densidade da urina:

INFORMAÇÕES PESSOAIS

Nome:

Data de nascimento:

Sexo:

Peso:

Altura:

Endereço:

Mora em zona urbana ou rural?

O lugar onde mora é poluído?

Tem fábrica(s), indústria(s), próximas ao local onde você mora?

Qual(is)?

INFORMAÇÕES SOBRE O TRABALHO

Quantas horas trabalha por dia?

Em que setor trabalha?

Tem outro emprego ou bico? Qual?

Tem contato com outra(s) substância(s) química(s), além do benzeno?

Qual(is)?

Há quanto tempo trabalha com benzeno?

Qual a profissão anterior?

Usa equipamento de proteção individual?

Qual(is)?

HÁBITOS PESSOAIS E DIETA

Você é fumante?

Quantos cigarros fuma por dia?

Há quantos anos fuma?

Fuma no local de trabalho?

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

Você costuma beber:

Refrigerante?

Quanto/dia?

Café?

Quanto/dia?

Chá? Quanto/dia?
 Cerveja? Quanto/dia?
 Pinga? Quanto/dia?
 Vinho? Quanto/dia?
 Suco de fruta concentrado (em lata ou em vidro) ? Quanto/dia?
 Qual o tempo decorrido entre a ingestão de alguma(s) dessa(s) bebida(s) e a hora da coleta da amostra?

O que você costuma comer?

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

Qual o tempo decorrido entre a última refeição e a coleta da amostra?

Você costuma comer:

Queijo? Qual? Quanto?
 Margarina? Quanto?
 Molho de tomate, de pimenta? Quanto?
 Conservas em lata ou em vidro? Qual(is)?
 Você usa adoçante? Qual? Quanto?
 Você tem o hábito de mexer com tintas, vernizes, solventes em sua casa?
 Com que frequência?

INFORMAÇÕES SOBRE SUA SAÚDE

Você tem problema de pressão?
 Tem alguma doença no coração? Qual?
 Tem ou já teve alguma disfunção renal? Qual?
 Você já teve hepatite, cirrose ou alguma outra disfunção hepática?
 Qual?
 Tem dor-de cabeça? Com que frequência?
 Você é diabético?
 Você já desmaiou? Por quê?
 Toma algum medicamento? Qual(is)?
 Você dorme bem? Quantas horas por dia?
 Tem algum outro problema de saúde? O que sente?

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____,
estou ciente de estar participando de um projeto de pesquisa.

Para a realização deste projeto, concordo em responder um questionário, bem como permitir as coletas de urina, em frascos apropriados, para a realização das análises pertinentes ao projeto.

Todo este procedimento será acompanhado pelos profissionais responsáveis.

Data: ____/____/____

Local:

Assinatura: _____