

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Farmácia

Vanessa Gonçalves Milagres

**Estudo de técnicas de preparo de amostra para determinação do
Ácido Fenilmercaptúrico urinário por Cromatografia Gasosa Acoplada à
Espectrometria de Massas para avaliação da exposição ao benzeno.**

BELO HORIZONTE – MG

2018

Universidade Federal de Minas Gerais
Faculdade de Farmácia
Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas

Vanessa Gonçalves Milagres

Estudo de técnicas de preparo de amostra para determinação do Ácido Fenilmercaptúrico urinário por Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas para avaliação da exposição ao benzeno.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestra em Análises Clínicas e Toxicológicas.

.

Orientadora: Professora Leiliane Coelho André
Coorientadora: Professora Maria José Nunes de Paiva

M637e Milagres, Vanessa Gonçalves.
Estudo de técnicas de preparo de amostra para determinação do ácido fenilmercaptúrico urinário por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas para avaliação da exposição ao benzeno / Vanessa Gonçalves Milagres. – 2018.
115 f. : il.

Orientadora: Leiliane Coelho André.
Coorientadora: Maria José Nunes de Paiva.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas.

1. Benzeno - Teses. 2. Cromatografia gasosa - Teses. 3. Espectrometria de massas - Teses. 4. Urina - Análise - Teses. 5. Ácidos - Teses. I. André, Leiliane Coelho. II. Paiva, Maria José Nunes de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. IV. Título.

CDD: 616.07566



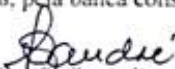
FOLHA DE APROVAÇÃO

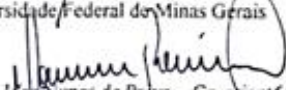
Estudo de Técnicas de Preparo de Amostras para Determinação do AFM-urinário por GCMS para Avaliação da Exposição ao Benzeno.

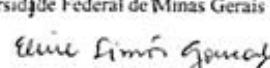
VANESSA GONÇALVES MILAGRES

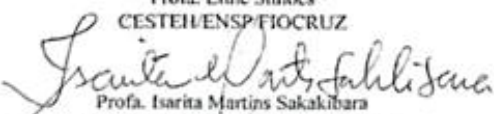
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS, área de concentração ANÁLISES CLÍNICAS E TOXICOLÓGICAS.

Aprovada em 12 de novembro de 2018, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Leiliane Cabelho Andre - Orientadora
Universidade Federal de Minas Gerais


Prof. Maria José Nunes de Paiva – Co-orientadora
Universidade Federal de Minas Gerais


Prof. Eliné Simões
CESTE/ENSP/FIOCRUZ


Prof. Isarita Martins Sakakibara
Universidade Federal de Alfenas - Unifal

Belo Horizonte, 12 de novembro de 2018.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por me dar força, sabedoria e paciência nos momentos difíceis; pela vida e por todas as bênçãos, incluindo a existência de tantas pessoas importantes que sempre estiveram do meu lado.

À minha orientadora Professora Leiliane Coelho André, por ter me dado a oportunidade de seguir com a minha área de escolha, a toxicologia, pela excelente didática, pela paciência, pelo conhecimento adquirido e por sempre ter me recebido com portas abertas para todos os tipos de ajuda durante minha formação acadêmica.

À minha Coorientadora Professora Maria José Nunes de Paiva, pela disponibilidade, pelos ensinamentos, pelo estímulo aos estudos e pelas novas ideias.

Aos integrantes do Laboratório de Toxicologia, em especial à Mirna, que, além de uma excelente profissional, a qual todos do Lato temos a sorte de ter por perto, é uma incrível amiga, que ajuda, motiva, dá ótimos conselhos e que inspira.

Aos meus queridos amigos, Livinha, Isadora, Michele, Camila, Nath, Laise, Juliano, Victor e Laís, que me apoiaram e fizeram com que essa etapa fosse mais fácil e mais feliz.

Aos meus familiares, pai, mãe, irmã e Lola, por estarem sempre ao meu lado, pelo amor, pela paciência e pelo apoio.

RESUMO

A monitorização biológica ou biomonitorização compreende a medida de substâncias químicas, ou seus respectivos metabólitos, que são quantificados em fluidos biológicos, como urina e sangue. Dessa forma, é permitida uma estimativa da exposição humana a tais substâncias. O benzeno, que é um poluente ubíquo, é um dos alvos de amplo interesse toxicológico e da monitorização biológica em locais onde ocorre a exposição ocupacional ou ambiental ao mesmo. Tal interesse está relacionado aos seus efeitos adversos à saúde, como os efeitos hematotóxicos e carcinogenicidade, os quais estão associados à exposição prolongada a esse solvente. Uma vez que o benzeno causa hematotoxicidade a níveis abaixo de 1 ppm, a identificação de marcadores biológicos sensíveis e específicos, então, é crucial para definição da exposição a baixos níveis de concentração do benzeno e para avaliação do risco à saúde que essa exposição pode proporcionar. O Ácido Fenilmercaptúrico é um metabólito do benzeno que tem sido considerado um biomarcador específico e sensível, já que não está presente na urina de não expostos e apresenta uma correlação com o benzeno no ar a baixas concentrações. No entanto, o benzeno apresenta um desafio como biomarcador devido à metodologia analítica, uma vez que o mesmo é excretado na urina numa proporção muito baixa, exigindo dessa forma, técnicas de alto custo e procedimentos complexos para garantir a adequada sensibilidade analítica. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e padronizar o procedimento analítico para determinação do Ácido Fenilmercaptúrico urinário utilizando Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas, com posterior validação da metodologia e aplicação em amostras reais de trabalhadores de postos de revenda de combustíveis, que são indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno. O método utilizado no estudo foi linear, numa faixa de concentração de 5 a 60 µg/L, com limites de detecção e quantificação de 0,95 µg/L e 3,18 µg/L, respectivamente. O método apresentou uma precisão intra e inter-ensaio com coeficientes de variação de 3,63 e 8,67%, respectivamente, e valor médio de exatidão de 98,72%, cujos parâmetros se apresentaram adequados e satisfatórios para a quantificação do Ácido Fenilmercaptúrico na urina. Com relação às análises das amostras de urina, foi observado que os valores de AFM variaram de 0,61 a 14,60 µg/g de creatinina e que a média foi 4,58 µg/g de creatinina.

Palavras-Chave: Benzeno, Ácido Fenilmercaptúrico, Cromatografia Gasosa, Espectrometria de Massas, Toxicologia Ocupacional.

ABSTRACT

Biological monitoring or biomonitoring involves the measurement of chemical substances, or their respective metabolites, which are quantified in biological fluids such as urine and blood. Thus, an estimation of human exposure to such substances is allowed. Benzene, which is a ubiquitous pollutant, is one of the targets of widespread toxicological concern and biological monitoring in places where occupational or environmental exposure occurs. Such interest is related to its adverse health effects, such as hematotoxic effects and carcinogenicity, which are associated with prolonged exposure to this solvent. Since benzene causes hematotoxicity at levels below 1 ppm, the identification of sensitive and specific biological markers is crucial for defining the exposure to low levels of benzene concentration and for assessing the health risk that such exposure may provide. Phenylmercapturic acid is a benzene metabolite that has been considered a specific and sensitive biomarker since it is not present in the urine of non-exposed and has a correlation with benzene in the air at low concentrations. However, benzene presents a challenge as a biomarker because of the analytical methodology, since it is excreted in the urine in a very low proportion, thus requiring high cost techniques and complex procedures to ensure adequate analytical sensitivity. Thus, the present study aimed to develop and standardize the analytical procedure for determination of Urinary Phenylmercapturic Acid using Gas Chromatography Coupled to Mass Spectrometry, with subsequent validation of the methodology and application in real samples of workers of resellers of fuels, who are occupationally exposed to benzene. The method used in the study was linear in a concentration range of 5 to 60 $\mu\text{g} / \text{L}$, with detection and quantification limits of 0.95 $\mu\text{g} / \text{L}$ and 3.18 $\mu\text{g} / \text{L}$, respectively. The method presented intra and inter-assay precision with coefficients of variation of 3.63 and 8.67%, respectively, and an average accuracy of 98.72%, whose parameters were adequate and satisfactory for quantification of phenylmercuric acid in urine. Regarding the analyzes of the urine samples, it was observed that AFM values ranged from 0.61 to 14.60 $\mu\text{g} / \text{g}$ creatinine and that the mean was 4.58 $\mu\text{g} / \text{g}$ creatinine.

Keywords: Benzene, Phenylmercapturic Acid, Gas Chromatography, Mass Spectrometry, Occupational Toxicology.

Lista de Figuras

Figura 1: Linha do tempo sobre o período de incorporação dos PRCs na legislação sobre exposição ocupacional ao benzeno.....	22
Figura 2: Resumo esquemático da biotransformação do benzeno.	28
Figura 3: Alguns eventos envolvidos na ocorrência de toxicidade do benzeno.	31
Figura 4: Algumas propriedades físico-químicas do Ácido Fenilmercaptúrico.	35
Figura 5: Representação geral de um planejamento fatorial.	37
Figura 6: Representação esquemática da variação de níveis e de fatores em um Planejamento Fatorial.	38
Figura 7: Esquema simplificado de extração do tipo líquido-líquido.....	41
Figura 8: Esquema simplificado da extração do tipo LPME.	42
Figura 9: Etapas realizadas na extração em fase sólida.	43
Figura 10: Representação esquemática de formação do Íon Molecular pelo Impacto de Elétrons durante a passagem do analito pela Fonte de Ionização.	49
Figura 11: Fluxograma sobre a análise de AFM utilizando a técnica de extração do tipo líquido-líquido.	61
Figura 12: Esquematização da metodologia utilizada para as análises de AFM utilizando a técnica de LPME.	62
Figura 13: Representação esquemática do método utilizado para a determinação do AFM na urina.	63
Figura 14: Etapas da extração de Ácido Fenilmercaptúrico utilizando a extração em fase sólida (SPE).....	63
Figura 15: Passos para a realização da LTPE para avaliação de Ácido fenilmercaptúrico urinário em GC-MS.	65
Figura 16: Representação esquemática da divisão setorial da cidade do Rio de Janeiro.	68
Figura 17: Áreas de Planejamento e suas respectivas áreas.	69
Figura 18: Representação Esquemática dos Postos de Revenda de Combustíveis utilizados no estudo.	70
Figura 19: Gráfico sobre o número total de trabalhadores participantes do estudo.	71

Figura 20: Amostras utilizadas na análise de AFM em trabalhadores expostos ambientalmente ao benzeno.	72
Figura 21: Cromatograma referente à análise de AFM na Condição 1	73
Figura 22: Cromatograma referente à análise de AFM na Condição 2.	74
Figura 23: Gráficos de Cromatografia e Espectrometria referentes à análise de AFM derivatizado com MSTFA nas condições 1(a) e 2(b).	75
Figura 24: Gráficos de Cromatografia e Espectrometria referentes à análise de AFM derivatizado com BSTFA nas condições 1(a) e 2(b).	76
Figura 25: Gráfico de papel de probabilidade Half-normal (Daniel Plot).	78
Figura 26: Gráfico dos efeitos testados pelo método de Lenth.	79
Figura 27: Gráficos de Cromatografia e Espectrometria para a Análise de AFM por ELL.	81
Figura 28: Gráficos de Cromatografia e Espectrometria para a Análise de AFM por LPME em Alta Concentração.	82
Figura 29: Gráficos de Cromatografia e Espectrometria para a Análise de AFM por LPME.	83
Figura 30: Gráficos de Cromatografia e Espectrometria para a Análise de AFM por SPE.	84
Figura 31: Gráficos de Cromatografia e Espectrometria para a Análise de AFM por LTPE.	85
Figura 32: Avaliação da Linearidade do AFM urinário utilizando LTPE.	86
Figura 33: Gráfico QQ-Plot para a verificação da normalidade dos dados.	87
Figura 34: Gráfico dos resíduos versus a ordem de coleta dos dados para avaliação da hipótese de independência dos dados.	88
Figura 35: Gráfico dos resíduos versus valores ajustados, para verificação da homocedasticidade do modelo.	89
Figura 36: Gráfico de Dispersão para comparação entre as curvas relativas ao AFM em urina e AFM em água.	91
Figura 37: Gráfico para o teste de normalidade utilizando o teste de Ryan-Joiner.	92
Figura 38: Gráfico de Resíduos x Valores Ajustados para a análise de homocedasticidade.	93
Figura 39: Gráfico de Resíduos x Ordem de Coleta para avaliação da Independência entre os resíduos.	94

Figura 40: Histograma com a distribuição das frequências dos valores de AFM para os indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno.	98
Figura 41: Gráficos relacionados ao teste de <i>Anderson-Darling</i>	99
Figura 42: Boxplot para comparação entre as medianas dos valores de AFM entre os sexos.	100
Figura 43: Padrão de fragmentação do Ácido Fenilmercaptúrico analisado por Espectrometria de Massas.	101
Figura 44: Conversão do Ácido Pré-Mercaptúrico em Ácido Fenilmercaptúrico.	103
Figura 45: Correlação entre propriedades físico-químicas de analitos e as técnicas de Cromatografia Líquida e Gasosa.	106
Figura 46: Vantagens e Desvantagens das técnicas de extração estudadas.	107

Lista de Tabelas

Tabela 1: Orientações internacionais a respeito do Limite de Exposição ao benzeno.	23
Tabela 2: Vantagens e Desvantagens da aplicabilidade do ATTM como biomarcador de exposição do benzeno.....	34
Tabela 3: Matriz de Planejamento de um planejamento fatorial 2^3 sem réplica.	39
Tabela 4: Coeficientes de contraste para um fatorial 2^3	39
Tabela 5: Processos envolvidos na técnica de derivatização.....	44
Tabela 6: Descrição dos processos de derivatização para Cromatografia Gasosa.....	45
Tabela 7: Alguns reagentes mais utilizados nas reações de sililação.	46
Tabela 8: (Condição 1) Condições cromatográficas para a avaliação do Ácido Fenilmercaptúrico urinário.	57
Tabela 9: (Condição 2): Condições cromatográficas para a avaliação do Ácido Fenilmercaptúrico urinário.	58
Tabela 10: Planejamento Fatorial sem replicatas para a realização dos testes de derivatização em microondas utilizando BSTFA como agente derivatizante. ..	59
Tabela 11: Comparação entre as áreas e tempos de retenção do AFM entre as duas Condições estudadas.	75
Tabela 12: Comparação entre a análise de AFM derivatizado com MSTFA e com BSTFA.....	76
Tabela 13: Resultado da aAnálise de Experimentos sem Réplicas.	77
Tabela 14: Resultados dos Valores de Half normal.	78
Tabela 15: Valores de Referência para a Análise do Gráfico dos Efeitos pelo Método de Lenth.	79
Tabela 16: Experimento de escolha para os testes de derivatização com a área do pico correspondente.....	80
Tabela 17: Resultado do teste de Normalidade de Resíduos através do modelo Ryan-Joiner.	86
Tabela 18: Resultado do Teste de Independência utilizando o método Durbin-Watson	88
Tabela 19: Resultado da Avaliação da Homocedasticidade pelo teste de Brown-Forsythe.	89
Tabela 20: Resultado do Teste de Falta de Ajuste (Lack of Fit).....	89

Tabela 21: Resultado dos Valores das precisões Intra-ensaio e Inter-ensaio..	90
Tabela 22: Resultados dos Valores Relacionados à Exatidão do Método.	90
Tabela 23: Resultado dos Testes de Comparação Entre as Curvas.	90
Tabela 24: Resultado do Teste de Normalidade para o efeito de matriz.	92
Tabela 25: Resultados para o teste de Homocedasticidade.	92
Tabela 26: Resultado do Teste de Durbin Watson para a realização do Diagnóstico de Independência.	93
Tabela 27: Concentração de AFM em Amostras de Urina de Frentistas de Postos de Gasolina da Cidade do Rio de Janeiro.	95
Tabela 28: Concentração de AFM em Amostras de Urina dos Indivíduos Expostos Ambientalmente ao Benzeno.	96
Tabela 29: Resultados da Estatística Descritiva Para os Valores de AFM.	97
Tabela 30: Resultado do Teste de normalidade de <i>Anderson-Darling</i>	98
Tabela 31: Resultados do Teste de Mann-Whitney para a avaliação da relação entre quantidade de AFM na urina e sexo dos indivíduos.	99
Tabela 34: Estudos sobre determinação de AFM urinário.	104

Lista de Equações

(Equação 1).....	66
(Equação 2).....	66
(Equação 3).....	67
(Equação 4).....	67
(Equação 5).....	67
(Equação 7).....	86

Lista de Abreviaturas

ABNT: Associação brasileira de Normas Técnicas

AFM: Ácido Fenilmercaptúrico

ANLL: Leucemia Não Linfocítica Aguda

ANOVA: Análise de Variância

ANP: Agência Nacional do Petróleo

Anvisa: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AP: Áreas de Planejamento

ATTM: Ácido Trans, Trans Mucônico

BEI: Biological Exposure Indice

BSTFA: N-O-Bis-(trimetilsilil)-trifloracetamida

CCD: Cromatografia em Camada Delgada

CG: Cromatografia Gasosa

CG-EM: Cromatografia Gasosa Acoplada ao Espectrômetro de Massas

CONAMA: Conselho Nacional do Meio Ambiente

CV: Coeficiente de Variação

DPa: Desvio Padrão

EC: European comission

EIA: Estudo de Impacto Ambiental

ELL: Extração Líquido-Líquido

EPA: Environmental protection Agency

FAPAS: Food Analysis Perfrmance Assessment Scheme

HPLC/CLAE: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

IARC: International Agency for Research on Cancer

IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

ICH: International Conference Harmonization

INMETRO: Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial

ISO: International Organization for Standadization

IUPAC: Internarional Union of Pure and Applied Chemistry

LD: Limite de Detecção

LI: Licença de Instalação

LO: licença de Operação
LP: Licença Prévia
LPME: Microextração em fase líquida
LQ: Limite de Quantificação
LTPE: Extração com partição em baixa temperatura
MB: Monitorização Biológica
ME: margem de erro
MPO: Mieloperoxidase
MSTFA: N-Methyl-N-(trimethylsilyl) trifluoroacetamide
MTE: Ministério do Trabalho e Emprego
NHL: linfoma de não-hodgkin
NIST: National Institute of Standards and Technology
NQO1: NADPH:Quinina Oxidoreductase 1
PRC: Postos de Revenda de Combustíveis
PSE: Pseudo Erro Padrão
RA: Regiões Administrativas
RIA: Relatório de Impacto Ambiental
ROS: Espécies Reativas de Oxigênio
SI: Sistema Imunológico
SME: margem de erro simultânea
SNC: Sistema Nervoso Central
SPE: Extração em fase sólida
TC: Temperatura da Coluna
TCLE: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TEM: Ministério do Trabalho e Emprego
VRT: Valor de Referência Tecnológico

Sumário

1. INTRODUÇÃO	19
2. EXPOSIÇÃO AO BENZENO	20
3. LEGISLAÇÃO.....	21
4. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DO BENZENO	25
4.1. TOXICOCINÉTICA	25
4.2. TOXICODINÂMICA.....	29
4.3. EFEITOS TÓXICOS	31
5. MONITORIZAÇÃO BIOLÓGICA DO BENZENO	32
5.1. ÁCIDO TRANS, TRANS, MUCÔNICO (ATTM).....	33
5.2. ÁCIDO FENILMERCAPTÚRICO (AFM)	34
6. METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DO AFM NA URINA	36
6.1. PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTO ANALÍTICO	36
6.2. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO.....	40
6.3. DERIVATIZAÇÃO.....	44
6.4. CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG- EM)	47
6.5. PARÂMETROS PARA VALIDAÇÃO – FIGURAS DE MÉRITO	49
6.5.1. LINEARIDADE	51
6.5.2. PRECISÃO	51
6.5.3. EXATIDÃO.....	52
6.5.4. EFEITO MATRIZ.....	53
6.5.5. LIMITE DE DETECÇÃO (LD)	54
6.5.6. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	54
7. OBJETIVOS	55
7.1. OBJETIVO GERAL	55

7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	55
8. MATERIAL E MÉTODOS	55
8.1. PADRÃO ANALÍTICO	55
8.2. VIDRARIAS, EQUIPAMENTOS, ACESSÓRIOS E REAGENTES.....	55
8.3. CONDIÇÕES DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO	56
8.4. DERIVATIZAÇÃO.....	58
8.5. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO.....	60
8.5.1. EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (ELL).....	60
8.5.2. MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA (LPME).....	61
8.5.3. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE).....	62
8.5.4. EXTRAÇÃO COM PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA (LTPE)	64
8.6. FIGURAS DE MÉRITO.....	65
8.6.1. LINEARIDADE	65
8.6.2. PRECISÃO	66
8.6.3. EXATIDÃO.....	66
8.6.4. EFEITO MATRIZ.....	67
8.6.5. LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)	67
8.7. AMOSTRAGEM	68
8.7.1. ÁREAS DE ESTUDO.....	68
8.7.2. POPULAÇÃO OCUPACIONALMENTE EXPOSTA AO BENZENO	69
8.7.3. POPULAÇÃO AMBIENTALMENTE EXPOSTA AO BENZENO.....	71
8.7.4. ANÁLISE DO AFM NAS AMOSTRAS DE URINA	72
8.7.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DO AFM URINÁRIO.....	72
9. RESULTADOS	73
9.1. OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO	73
9.2. DERIVATIZAÇÃO.....	75
9.3. TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO.....	80
9.3.1. EXTRAÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO (ELL).....	80
9.3.2. MICROEXTRAÇÃO EM FASE LÍQUIDA (LPME).....	81
9.3.3. EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA (SPE).....	83

9.3.4. EXTRAÇÃO COM PARTIÇÃO EM BAIXA TEMPERATURA (LTPE)	84
9.4. FIGURAS DE MÉRITO	85
9.4.1. LINEARIDADE	85
9.4.2. PRECISÃO	90
9.4.3. EXATIDÃO	90
9.4.4. EFEITO MATRIZ	90
9.4.5. LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)	94
9.5. AMOSTRAGEM	94
9.5.1. ANÁLISE DO AFM EM AMOSTRAS DE URINA	94
9.5.2. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS DO AFM URINÁRIO	97
10. DISCUSSÃO	100
11. CONSIDERAÇÕES FINAIS	110
<u>12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>111</u>

1. INTRODUÇÃO

Apesar de uma progressiva redução das concentrações de benzeno, tanto no ambiente ocupacional quanto em outros ambientes, esse hidrocarboneto aromático ainda é um poluente presente no ar e em ambientes de trabalho, o que desperta uma grande preocupação toxicológica, devido as suas propriedades carcinogênicas (Lovreglio et al, 2011). Com relação a essas propriedades, as medidas legais foram definidas com o Anexo 13, acrescentado pela Portaria nº14 de 20/12/95 à Norma Reguladora 15 (NR-15), a qual estabeleceu o valor de referência tecnológico (VRT) para o benzeno (BRASIL, 1978). Uma vez que esse valor não certifica exposição sem risco à saúde, não foi, então, estabelecido o Limite Biológico de Exposição ao benzeno na Legislação Brasileira. Em contrapartida, para detecção de possível exposição ocupacional a esse composto, é estabelecida, pela Portaria 34 de 20/12/2001 do Ministério do Trabalho e Emprego (MTE), a análise de ácido trans, trans Mucônico (ATTM), que é um biomarcador do benzeno, em amostras de urina. Isso foi definido, uma vez que esse biomarcador apresenta "características de aplicabilidade, especificidade e sensibilidade para exposição a baixas concentrações de benzeno em ambiente de trabalho, compatíveis com VRT" (BRASIL, 2001). Contudo, o ATTM apresenta como desvantagem sofrer influência de fatores de confusão, como o ácido ascórbico, que está presente em vários alimentos, e o cigarro, por exemplo. Esses fatores podem modificar as concentrações desse biomarcador na urina, o que explica a presença do mesmo em indivíduos não expostos ocupacionalmente ao benzeno.

O Ácido Fenilmercaptúrico urinário, por sua vez, sofre interferência apenas do cigarro. Dessa forma, tem sido considerado um biomarcador específico e sensível, já que apresenta uma correlação com o benzeno no ar a baixas concentrações. No entanto, ele apresenta um desafio como biomarcador. Isso acontece porque a metodologia para análise de ácido S-fenilmercaptúrico está associada a técnicas de alto custo, como procedimentos analíticos complexos, envolvendo um gasto elevado de reagentes.

Nesse sentido, o presente estudo visa desenvolver e padronizar uma metodologia analítica para determinação do Ácido Fenilmercaptúrico urinário utilizando cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, com

posterior validação analítica em amostras reais, através de figuras de mérito, como linearidade, precisão, exatidão e limites de detecção e quantificação. A finalidade do trabalho é a aplicação desse biomarcador nos estudos de avaliação da exposição ocupacional e ambiental ao benzeno. Tal metodologia será aplicada para análise de Ácido Fenilmercaptúrico urinário em trabalhadores de postos de revenda de combustíveis, os quais são expostos ocupacionalmente ao benzeno.

2. EXPOSIÇÃO AO BENZENO

As principais fontes de exposição ocupacional ao benzeno são a indústria petroquímica, siderurgias, meios de transporte e manuseio da gasolina (MENDES et al., 2017; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014; PROTANO et al., 2012). As exposições ocupacionais são características de diversos tipos de atividades em que o trabalhador entra em contato com o benzeno por meio dessas fontes. Contudo, em grandes cidades, onde o tráfego é intenso, ocorre a exposição ambiental devido aos processos de combustão de veículos automotores pela presença do benzeno na gasolina. É importante ressaltar que isso pode caracterizar, também, a exposição ocupacional, caso determinada atividade exija que o indivíduo passe muitas horas exposto à estas circunstâncias, como guardas de trânsito, motoristas, mecânicos, funcionários de estacionamento entre outros.

Além das grandes cidades, em que existe alto fluxo de veículos automotores, as exposições ambientais ao benzeno também são características de regiões que estão próximas a parques metalúrgicos, refinarias de petróleo e postos de combustíveis. Sabe-se ainda que o benzeno está presente na fumaça proveniente de cigarros. Dessa forma, indivíduos da população geral que possuem o hábito de fumar e até os que são fumantes passivos correm um risco maior de exposição a esse composto do que os indivíduos que não estão em contato com a fumaça de cigarros (GOMES, 2016).

3. LEGISLAÇÃO

Para cada substância química que está presente no ambiente de trabalho, existe um valor de concentração permitido, o qual é estabelecido pelo Limite de Tolerância no Brasil. Tal valor é estabelecido de acordo com a concentração em que a maioria dos trabalhadores possa ficar exposta sem haver prejuízo à saúde. Contudo, existe uma diferença para o benzeno, uma vez que o mesmo é uma substância comprovadamente cancerígena. Dessa forma, não existe uma concentração específica abaixo da qual não existiriam efeitos tóxicos para os trabalhadores e, então, o Limite de Tolerância deveria ser zero. Porém, ainda é inviável que nenhuma concentração de benzeno seja permitida no ar, tanto do ponto de vista ocupacional, quanto econômico (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

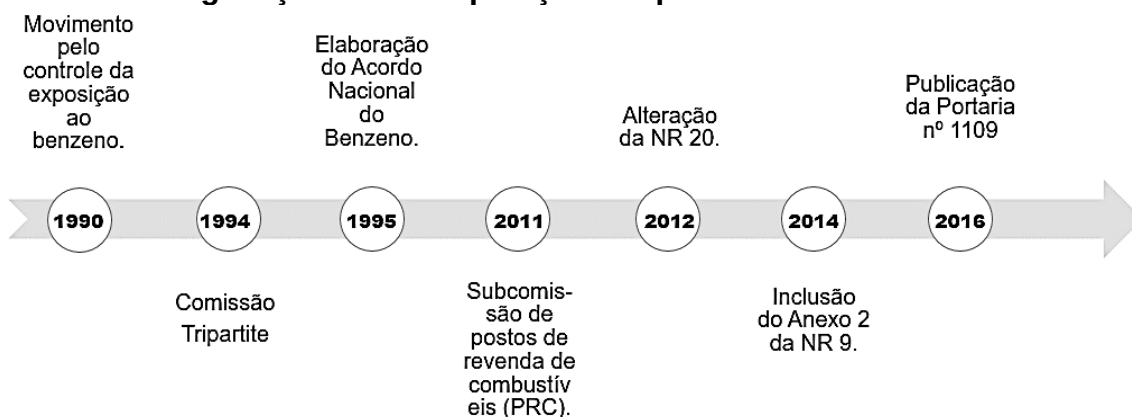
Ao longo dos anos, com o desenvolvimento de novas tecnologias e consequente surgimentos de estudos a respeito da exposição ao benzeno, ocorreram mudanças nas legislações de vários países com o objetivo de reduzir os limites dessa exposição. Especificamente no Brasil, o movimento pelo controle da exposição ao benzeno teve início na década de 1990. Com a participação de representantes dos Ministérios do Trabalho e da Saúde e da Previdência Social, foi instituída uma Comissão Tripartite, em 1994, a qual elaborou importantes documentos. Dentre tais documentos, foi elaborado o Acordo Nacional do Benzeno, em 20 de dezembro de 1995, o qual tinha como objetivo a implementação de medidas de restrição da exposição e uso do benzeno em processos produtivos diversos. Nesse acordo, foi instituída a Comissão Nacional Permanente do Benzeno (CNPBz) e os Grupos de Representação dos Trabalhadores do benzeno (GTB) (MENDES et al., 2017).

Na CNPBz, mais especificamente, existe uma discussão contínua a respeito da normatização da exposição ao benzeno. Em substituição ao Limite de Tolerância (LT), tem-se como referência a adoção do Valor de Referência Tecnológico (VRT) estabelecido em 1994, o qual é definido na Norma Regulamentadora 15 (NR 15) como “a concentração de benzeno no ar considerada exequível do ponto de vista técnico, definido em processo de negociação tripartite. VRT deve ser considerado como referência para os programas de melhoria contínua das condições dos ambientes de trabalho. O

cumprimento do VRT é obrigatório e não exclui risco à saúde”. Ficou definido, dessa forma, que o VRT para indústrias siderúrgicas é de 2,5 ppm e para as indústrias químicas e petroquímicas de 1,0 ppm (MENDES et al., 2017).

Essas normas estabelecidas no Acordo Nacional do Benzeno, as quais eram referentes ao controle da exposição ao benzeno em ambiente ocupacionais, não incluíam as atividades de armazenamento, transporte, distribuição, venda e uso de combustíveis. Esta inclusão só ocorreu no ano de 2011 com a instalação da subcomissão de postos de revenda de combustíveis (PRC) da CNPBz, com alteração da Norma Regulamentadora 20 (NR 20), em 2012, em que foram instituídos procedimentos e controles operacionais para esses tipos de atividades. Posteriormente, em 2014, houve a proposta da inclusão do anexo 2 da Norma Regulamentadora 9 (NR 9). Nesta norma, são estabelecidos os requisitos mínimos de segurança e saúde no trabalho para as atividades que envolvem exposição ao benzeno em postos de combustíveis. Contudo, apenas em 2016, foi alcançado o consenso sobre essa norma através da publicação da Portaria nº 1109, que aprova o anexo 2 – Exposição Ocupacional ao Benzeno em Postos Revendedores de Combustíveis – PRC – da Norma Regulamentadora nº 9 – Programa de Prevenção de Riscos Ambientais – PPRA, estabelecendo, assim, os requisitos mínimos de segurança e saúde no trabalho para as atividades com exposição ao benzeno em postos de combustíveis (**Figura 1**) (MENDES et al., 2017).

Figura 1 - Linha do tempo sobre o período de incorporação dos PRCs na legislação sobre exposição ocupacional ao benzeno.



Fonte: Do Autor.

As diferentes normas regulamentadoras para a exposição ocupacional do benzeno em diferentes países e agências internacionais são mostradas na **Tabela 1** (MENDES et al., 2017).

Tabela 1 - Orientações internacionais a respeito do Limite de Exposição ao benzeno.

País		Recomendação
Brasil		1 ppm (VRT 8h) Petroquímicas
		205 ppm (VRT 8h) Siderúrgicas
China		2 ppm (TWA 8h)
		3ppm (STEL)
		0,5 ppm (TWA 8h)
		2,5 ppm (STEL)
EUA	ACGIH	0,1 ppm (TWA 10h)
		1 ppm (STEL)
	NIOSH	1 ppm (TWA 8h)
		5 ppm (STEL)
	OSHA	Risco para leucemia a 1 ppm de exposição de
		7,1×10 ³ a 2,5×10 ⁻²
França	ANSES	1 ppm (TWA 8h)
		0,038 µg.m ⁻³ – risco de 10 ⁻⁶ (risco de leucemia aguda)
		0,38 µg.m ⁻³ – risco de 10 ⁻⁵ (risco de leucemia aguda)
		3,8 µg.m ⁻³ – risco de 10 ⁻⁴ (risco de leucemia aguda)
Holanda		0,2 ppm (TWA 8h)
Hong-Kong		0,5 ppm (TWA 8h)
		2,5 ppm (STEL)
Itália		3200 µg/m ³ (1 ppm) ambiente de trabalho
Japão		0,1 ppm para risco de câncer de 1 x 10 ⁻⁴
		1 ppm para risco de câncer de 1 x 10 ⁻³
		17 µg/m ³ (5,27 ppb) para risco de leucemia de 1/10.000
WHO		1,7 µg/m ³ (0,527 ppb) para risco de leucemia de 1/100.000
		0,17 µg/m ³ (0,053 ppb) para risco de leucemia de 1/1.000.000

Fonte: Adaptado de MENDES et al., 2017

Por ser uma importante fonte de exposição tanto ocupacional como não ocupacional ao benzeno, a Agência Nacional do Petróleo (ANP) estabeleceu algumas especificações a respeito das gasolinas comercializadas e do controle de qualidade do produto através da Resolução nº 40, de 25 de outubro de 2013. A partir desta, houve determinação, também, do valor máximo de 1% (v/v) da concentração de benzeno na gasolina tipo C ou Premium do tipo C. É importante ressaltar que o benzeno é um dos componentes da gasolina e está presente numa concentração de até um 1% da composição total. Ela é um derivado do petróleo, que, além do benzeno, possui também em sua composição outros tipos de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos. No Brasil, são comercializados dois tipos de gasolina: Tipo A, em que é incluída a *Premium*, e a tipo C, em que estão inclusas as gasolinas comum e a aditivada. Esta última possui maior octanagem, o que aumenta a quantidade de benzeno presente em relação aos outros tipos de gasolina.

A contaminação ambiental é um crime federal, segundo o Decreto nº 6514, de 2008, que regulamenta a Lei Federal 9.605/1.998. Uma vez que diversas atividades estão envolvidas nos postos de gasolina, em que existe risco de vazamentos e emissões de vapores de solvente e que, além disso, possui uma população entrando em contato não só com esse ambiente, mas também no entorno, é imprescindível a regulamentação para o controle das contaminações ambientais com abrangência sobre a população geral. Muitas das legislações têm relação com medidas de prevenção a acidentes durante o processo produtivo sobre o meio ambiente.

A legislação brasileira exige o licenciamento por órgão ambiental estadual competente ou pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) em caráter supletivo, por meio de um Estudo de Impacto Ambiental (EIA) e um Relatório de Impacto Ambiental (RIA) bem detalhados. O estabelecimento deverá, posteriormente, obter documentos os de Licença Prévia (LP), Licença de Instalação (LI) e da licença de Operação (LO), as quais são obrigatórias para o funcionamento do mesmo. Além disso, de acordo com a Resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) nº319, publicada em 2002, deve haver avaliação quanto a conformidade de equipamentos e sistemas de armazenamento e distribuição de combustíveis. Isso deve ocorrer no âmbito do Sistema Brasileiro de Avaliação da Conformidade

com periodicidade não superior a cinco anos. A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), na sua NBR 13.786:2014, por sua vez, estabelece que devem ser instalados no mínimo 3 poços de monitoramento em locais estratégicos. A finalidade disso é verificar se existe contaminantes em fase livre ou dissolvida na água subterrânea. Além dessas regulamentações, a CONAMA nº 273 determina que os PRCs estejam a uma distância mínima de 100m das residências, o que ajuda na prevenção de acidente ambiental (MENDES et al., 2017).

4. ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DO BENZENO

4.1. Toxicocinética

O benzeno, cuja fórmula molecular é C_6H_6 , é um hidrocarboneto aromático cíclico de peso molecular igual a 78,11. À temperatura ambiente, ele possui como características ser um líquido incolor, volátil e altamente inflamável. Além disso, ele possui um odor semelhante ao do petróleo. A lipossolubilidade é mais uma de suas características, o que permite que o mesmo seja solúvel em solventes, como acetona, álcool, disulfato de carbono, clorofórmio, ácido acético glacial e óleos (LUTTRELL; CONLEY, 2011; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

A relação entre a exposição e a concentração de benzeno e seus respectivos metabólitos no organismo é entendida através da toxicocinética (ARNOLD et al., 2013).

Dentre as vias de absorção, a via cutânea, pulmonar são as que estão relacionadas à exposição ao benzeno. Contudo, a maioria dos dados referentes a estudos sobre a exposição a esse composto foca, principalmente, na inalação como forma de exposição ocupacional e ambiental (LUTTRELL; CONLEY, 2011; MCNALLY et al., 2017; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014; SOLEIMANI et al., 2017; TRANFO et al., 2018).

De forma geral, a porcentagem de benzeno absorvido varia de 40% a 70% da quantidade que é inalada. O benzeno é rapidamente absorvido pela via pulmonar, sendo que essa absorção é maior nos primeiros minutos após a exposição (70% a 80% da concentração inalada) e diminui gradativamente, uma vez que a concentração de benzeno estará aumentada. Dessa forma, aproximadamente uma hora após a exposição, essa quantidade decai para

cerca de 50% (ARNOLD et al., 2013; OGA; et al., 2014). Vale ressaltar que, a quantidade do benzeno que será absorvido pelo sistema respiratório é dependente da sua concentração no ar, da taxa de respiração de cada indivíduo e do tempo de exposição (LUTTRELL; CONLEY, 2011).

A absorção cutânea é a menos relevante, uma vez que a quantidade de benzeno absorvido é pequena, devido à sua volatilidade, mas significativa quando em contato com a sua forma líquida (OGA et al., 2014). Em um estudo, no qual envolveu voluntários humanos, houve aplicação direta de benzeno no antebraço e palma da mão desses indivíduos. Observou-se que houve absorção de 0,07% e 0,13%, respectivamente, da dose aplicada (MODJTAHEDI; MAIBACH, 2008). Isso acontece, uma vez que mais de 95% do benzeno que entra em contato com a pele pode ser volatilizado. A quantidade de benzeno que será absorvido através da pele depende da área de pele que é exposta, da concentração de benzeno e do tempo de contato do toxicante com a pele (LUTTRELL; CONLEY, 2011).

Uma vez absorvido, o benzeno é, então, distribuído para vários órgãos principalmente aqueles ricos em gordura, como o cérebro, os rins, o tecido adiposo, a placenta (ARNOLD et al., 2013; DOWTY; STORER; LASETER, 1972; LUTTRELL; CONLEY, 2011). O tempo de meia vida do benzeno no sangue é estimado em 8 horas (MCNALLY et al., 2017).

A biotransformação do benzeno pode ocorrer em diferentes órgãos, embora o fígado seja o local principal, metabolizando cerca de 84 a 89% da concentração absorvida de benzeno (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014). O outro órgão responsável pela biotransformação é a medula óssea, contudo em menor proporção (ARNOLD et al., 2013; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

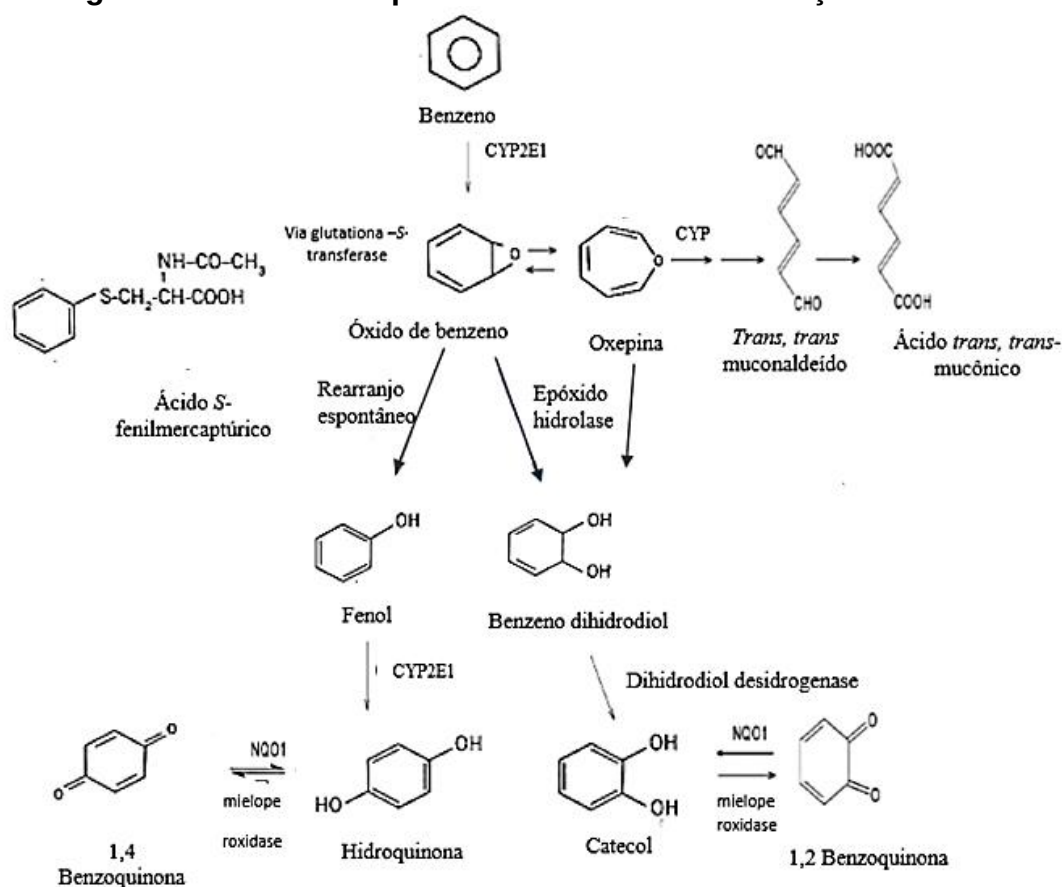
Embora o processo de biotransformação do benzeno seja bastante complexo, o mesmo possui grande importância, já que é conhecido que os efeitos tóxicos do benzeno são provenientes dos seus metabólitos. Um dos estudos que demonstraram esse fato foi realizado por Ross (2000). Neste estudo foi observado que, em cultura de medula óssea, o benzeno foi menos tóxico do que os seus próprios metabólitos. Já em outro estudo, realizado por Sheets & Carlson (2004), observou-se que quando a atividade da CYP2E1 era baixa, ocorria redução da hematotoxicidade. Em um estudo posterior foi demonstrado

que, quando ocorre exposição simultânea entre benzeno e tolueno, ocorre redução da hematotoxicidade, uma vez que o tolueno é um inibidor competitivo da biotransformação do benzeno (SCHNATTER et al., 2010).

O primeiro passo no metabolismo do benzeno é a oxidação para a formação do intermediário óxido de benzeno, o qual é denominado benzeno epóxido. Tal reação acontece no fígado e é catalisada pelo Citocromo P450 (CYP) 2E1, embora o CYP2B4 também tenha participação, contudo com menor eficiência. Este metabólito se encontra em equilíbrio com outra forma instável do composto, o benzeno oxepina. O rearranjo não enzimático de algum desses metabólitos é responsável pela formação do fenol. O fenol poderá ser oxidado por enzimas do Citocromo P450 a hidroquinona e, também, a 1,4-benzoquinona. O fenol pode, ainda, ser excretado na urina na sua forma livre ou conjugada com ácido glicurônico ou sulfato. O fenol e seus conjugados são os principais produtos de biotransformação do benzeno.

Outra via de biotransformação do benzeno é a hidrólise do óxido de benzeno a catecol e 1,2-benzoquinona, além da reação do óxido de benzeno com a glutatona, levando à formação do Ácido S- fenilmercaptúrico (AFM). A oxepina, por sua vez, pode ser hidrolisada enzimaticamente pela epóxido hidrolase, com posterior desidrogenação para a formação de catecol. A oxepina pode, ainda, ter seu anel aromático clivado e, dessa forma, são originados o muconaldeído reativo e Ácido Trans, Trans Mucônico (ATTM) (**Figura 2**) (ARNOLD et al., 2013; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

Figura 2 - Resumo esquemático da biotransformação do benzeno.



Fonte: Adaptado de RAPPAPORT et al., 2010.

Alguns estudos demonstraram que os níveis dos metabólitos urinários do benzeno são afetados por fatores, como sexo, idade, tabagismo e polimorfismos em genes relacionados à biotransformação e concentração do benzeno no ar. Com relação a este último fator, há alguns anos, tem-se discutido a respeito da biotransformação do benzeno em exposições a baixas concentrações desse composto. Existe uma contradição em que, por um lado, acredita-se que o metabolismo é linear em exposições a baixas concentrações de benzeno. Por outro lado, contudo, acredita-se que o metabolismo não é linear nessa mesma condição. Isso porque foi demonstrado que existe uma saturação do metabolismo do benzeno, já que foi observada uma redução da taxa de biotransformação em concentrações de benzeno no ar acima de 0,1 ppm (KIM et al., 2014, 2006, 2007). Rappaport et. al. (2010) procuraram explicar o metabolismo não linear demonstrando que existem dois caminhos metabólicos para o benzeno. Um deles é considerado de alta afinidade e se mostra mais ativo em exposições a concentrações de benzeno mais baixas; e o outro considerado

de baixa afinidade, que é relacionado à concentração de benzeno no ar superior a 1ppm. Para a averiguação da relação entre baixos níveis de exposição ao benzeno e o aumento da concentração de seus metabólitos, COX et al (2017) realizaram uma análise estatística não-paramétrica em trabalhadores expostos a baixos níveis de benzeno, em Tianjin/China, cuja população foi a mesma do estudo do Kim et al (2014, 2006, 2007). Apesar de apresentarem resultados distintos em relação à biotransformação do benzeno a baixas concentrações, os autores concluíram que os dois achados são corretos, cuja explicação se refere a uma proporção de variáveis aleatórias, as quais podem ser correlacionadas negativamente com a concentração de benzeno no ar.

O benzeno pode ser excretado na sua forma inalterada pela via pulmonar e na urina ou através de seus metabólitos urinários. A excreção pela via pulmonar do benzeno, após exposição única, ocorre em três fases. A primeira, representa a saída do solvente presente nos pulmões e no sangue. Já a segunda fase é caracterizada pela eliminação do benzeno que está presente nos tecidos moles num período de 3 a 7 horas após a exposição. A terceira fase corresponde à saída do solvente presente no tecido adiposo (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

De forma geral, o fenol é o metabólito principal, do ponto de vista quantitativo. O fenol e seus conjugados representam em torno de 80% do total de metabólitos que são excretados na urina. A hidroquinona e o catecol também são metabólitos significativos que correspondem de 5 a 10% entre os metabólitos presentes na urina. Dentre os metabólitos de menor valor quantitativo, o Ácido Trans, Trans Mucônico representa em torno de 3% do total de metabólitos, enquanto que o Ácido Fenilmercaptúrico representa em torno de 1% do total de metabólitos (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014; RAPPAPORT et al., 2010).

4.2. Toxicodinâmica

Em exposições agudas, a ação tóxica do benzeno é resultante da ação de seus metabólitos que apresentam potencial para gerar oxigênio livre, o que é responsável por causar irritação das mucosas e pele. Já nas exposições crônicas, a ação mielotóxica é destacada e o tecido hematopoético é o tecido-alvo mais criticamente afetado pelo benzeno e alguns de seus metabólitos. Dessa forma, a exposição contínua ao benzeno pode causar diminuição na

contagem dos três principais tipos de células circulantes: as plaquetas, eritrócitos e glóbulos brancos. A diminuição da contagem das mesmas pode provocar trombocitopenia, anemia e leucopenia, respectivamente. Além disso, há aumento no volume médio corpuscular das células sanguíneas (LI et al., 2014; MCHALE; ZHANG; SMITH, 2012; MENDES et al., 2017; RAPPAPORT et al., 2010; SUN et al., 2014; WEISEL*, 2010).

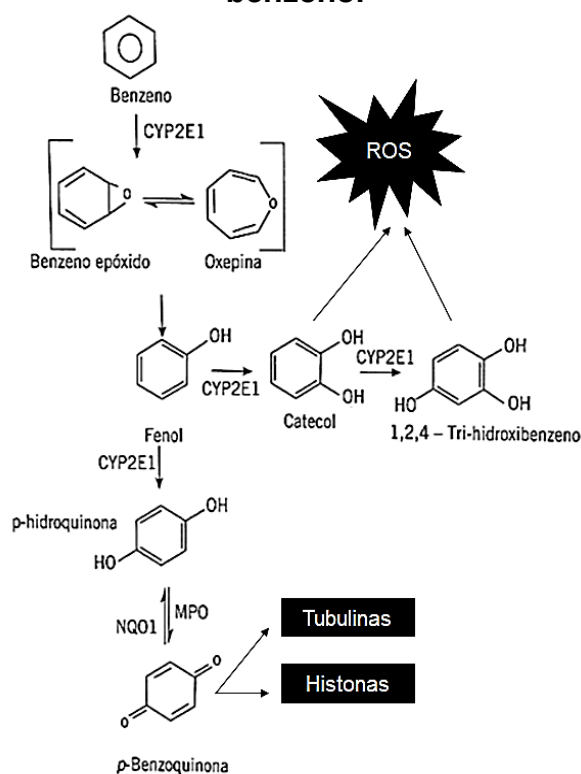
Desde os anos 1970, tem sido reconhecido que a exposição ocupacional ao benzeno pode aumentar o risco de Leucemia Mieloide Aguda (COX et al., 2017). Segundo a International Agency for Research on Cancer (IARC), o benzeno está classificado no grupo I (IARC, 2008), devido ser uma substância carcinogênica para humanos. A leucemia associada ao benzeno é a mielogênica aguda, que tem como característica o aumento de células semelhantes aos mieloblastos, morfológicamente (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

O mecanismo de intoxicação ainda não é completamente entendido, mas é amplamente aceito que o metabolismo possui um papel fundamental na toxicidade relacionada ao benzeno (HAN et al., 2018). Sabe-se que os eventos para a ocorrência de toxicidade do benzeno envolvem algumas etapas. A biotransformação do benzeno gera metabólitos eletrofílicos e espécies reativas de oxigênio (ROS), que podem ser continuamente produzidos e podem interagir com células da medula óssea (HAN et al., 2017). Isso ocorre através de ligação covalente à algumas moléculas de DNA, RNA e proteínas, com comprometimento das mesmas. Dessa forma, pode haver proliferação clonal dessas células alteradas e, posteriormente, pode haver até o desenvolvimento de leucemia (ARNOLD et al., 2013; DE PALMA; MANNO, 2014). Além disso pode ocorrer, também, peroxidação lipídica, dano em membranas e citotoxicidade (HAN et al., 2018).

De forma mais específica, quando a hidroquinona é oxidada a benzoquinona, pode haver a reação da mesma com macromoléculas celulares, como tubulinas ou histonas. Os metabólitos catecol e tridroxibenzeno, por sua vez, podem contribuir para a formação de espécies reativas de oxigênio (**Figura 3**) (ARNOLD et al., 2013). É atualmente aceita, ainda, uma possibilidade de que a ação carcinogênica do benzeno seria mediada pelo benzeno epóxido, que é reativo e que teria estabilidade para ser distribuído pelo organismo. Outros estudos mostram que o aldeído mucônico também pode ter papel significativo

na carcinogênese, por possuir ação genotóxica. É aceito, ainda, que a CYP2E1, a NADPH:Quinina Oxidoredutase 1 (NQO1) e a Mieloperoxidase (MPO), as quais estão envolvidas na biotransformação, também podem desempenhar papel na toxicidade relacionada à exposição ao benzeno. Estudos experimentais demonstram que a ausência da CYP reduz a ação citotóxica e genotóxica do benzeno, enquanto que a de NQO1 aumenta a suscetibilidade a ação tóxica do solvente (HAN et al., 2017, 2018; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

Figura 3 - Alguns eventos envolvidos na ocorrência de toxicidade do benzeno.



Fonte: Adaptado de OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014.

4.3. Efeitos Tóxicos

Segundo o Ministério da Saúde, recebe o nome de benzenismo o conjunto de sinais e sintomas provenientes da exposição aguda ou crônica ao benzeno (BRASIL, 2006).

Na exposição aguda, geralmente em elevada concentração, os efeitos tóxicos do benzeno poderão provocar depressão do SNC. Com isso, há o aparecimento de sonolência, tontura, dor de cabeça, tremores, delírios,

convulsões, perda de consciência, parada respiratória e morte (ARNOLD et al., 2013; LUTTRELL; CONLEY, 2011).

Já nas exposições crônicas, os sintomas iniciais de intoxicação são fadiga, palidez, cefaleia, perda de apetite e irritabilidade. Em estados mais avançados de intoxicação, contudo, são observados agravos maiores à saúde, como hematotoxicidade e carcinogênese. Associa-se a exposição ao benzeno por um período longo a efeitos mielotóxicos, como hipoplasia medular. Consequentemente, são acarretadas as citopenias, como leucopenia, eritropenia e trombocitopenia. O desenvolvimento desta última pode ocasionar hemorragias diversas e a presença de leucopenia ajuda a aumentar a frequência de infecções bacterianas e lesões das mucosas. A exposição crônica pode resultar, ainda, em lesões graves, com progressiva degeneração da medula óssea e aplasia medular. Essa última está presente em casos graves em que se instala a pancitopenia, podendo ocorrer, também, infiltração gordurosa e necrose da medula. Observa-se que todas essas alterações podem ser influenciadas por fatores individuais, além da intensidade e duração da exposição (MENDES et al., 2017; OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

Tem sido reconhecido desde os anos 1970 que a exposição ocupacional ao benzeno por um período longo de tempo pode aumentar o risco de desenvolvimento de leucemia (COX et al., 2017). Em 1987, a IARC classificou o benzeno como carcinogênico do grupo I, citando evidências de aumento na incidência de leucemia não linfocítica aguda (ANLL). Desde então, têm surgido vários relatos de populações expostas ao benzeno, incluindo atualizações de relatórios anteriores e novos estudos de controle de casos de leucemia ou seus subtipos, Linfoma de Não-Hodgkin (NHL), Mieloma Múltiplo e outros tumores de menor grau em adultos (IARC, 2008).

5. MONITORIZAÇÃO BIOLÓGICA DO BENZENO

A Monitorização Biológica da exposição ocupacional é uma ferramenta eficaz realizada por meio da determinação das substâncias químicas e seus respectivos metabólitos em fluidos biológicos, como urina e sangue, possibilitando, dessa forma, a obtenção de uma estimativa da absorção de tais substâncias em indivíduos expostos (TRANFO et al., 2018). A biomonitorização é utilizada para avaliação da eficácia das medidas de controle em ambientes

ocupacionais e a efetividade dos esforços de remediação ambiental. Para isso, há quantificação da própria substância ou os seus metabólitos em amostras biológicas através de biomarcadores (CALAFAT et al., 2006; CHEN; SHIH; WU, 2010).

Biomarcadores são definidos como substâncias, ou mesmo produto de biotransformação das mesmas, cuja determinação em amostras biológicas tenha relação com os níveis de exposição e, conseqüentemente, com o risco a que tal substância oferece à saúde (WHO, 1996, 2015). Os biomarcadores são classificados como (a) Biomarcador de exposição ou de dose interna; (b) Biomarcador de efeito; e (c) Biomarcador de suscetibilidade. Os Biomarcadores de exposição correspondem a própria substância ou seus os metabólitos, ou o produto de interação entre a substância e moléculas-alvo presente no organismo. Os biomarcadores de efeito, por sua vez, consistem em mudanças bioquímicas, estruturais e funcionais que, ao serem medidas, podem ser correlacionadas à algum dano à saúde. Os biomarcadores de suscetibilidade representam indicadores que medem a capacidade que o organismo tem de responder a uma determinada exposição (AMORIM, 2003; MANNO et al., 2010; ROUX et al., 2011).

Os principais Biomarcadores do Benzeno são o Ácido Trans, Trans Mucônico e o Ácido Fenilmercaptúrico, os quais classificados como biomarcadores de exposição.

5.1. Ácido Trans, Trans, Mucônico (ATTM)

É estabelecida pela Portaria 34 de 20/12/2001 do Ministério do Trabalho e Emprego (MTE) a análise de ATTM urinário, que é um biomarcador do benzeno. Isso foi definido, uma vez que esse biomarcador apresenta "características de aplicabilidade, especificidade e sensibilidade para exposição a baixas concentrações de benzeno em ambiente de trabalho, compatíveis com VRT". A ACGIH, em 2013, propôs que esse metabólito fosse biomarcador de exposição, quando determinado na urina coletada no final da jornada de trabalho.

O ATTM apresenta algumas vantagens e desvantagens como biomarcador de exposição ao benzeno, as quais estão descritas na **Tabela 2**.

Tabela 2 - Vantagens e Desvantagens da aplicabilidade do ATTM como biomarcador de exposição do benzeno.

Vantagens	Desvantagens
Sensibilidade; Análise simples Boa correlação com a concentração de benzeno no ar.	Também está presente na urina de não expostos; Concentração urinária pode ser influenciada por características individuais, como dieta e hábito de fumar; Se ocorrer exposição concomitante com o tolueno, os níveis de ATTM podem estar diminuídos.

Fonte: OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014

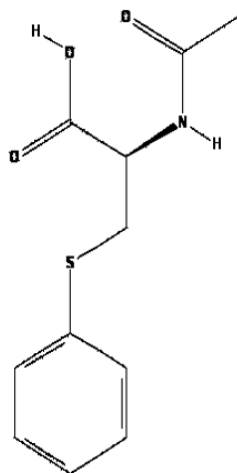
É importante ressaltar que esse biomarcador apresenta boa correlação com a concentração de benzeno no ar quando essa concentração é igual ou inferior a 1 ppm. Uma vez que o VRT do benzeno no ar varia de 1,0 a 2,5 ppm, o ATTM, então, possui boa sensibilidade para ser utilizado como biomarcador. Contudo, com relação às suas desvantagens, sabe-se que o hábito de fumar influencia nos níveis sanguíneos de ATTM. Isso porque indivíduos fumantes, expostos ao benzeno, excretam maior concentração desse metabólito, comparado com indivíduos não fumantes. A dieta também pode interferir nos níveis urinários desse metabólito, uma vez que o sorbitol, que é utilizado como aditivo em vários alimentos com o objetivo de conservação da umidade ou mesmo para a substituição de açúcar, também produz ATTM na sua metabolização (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014).

5.2. Ácido Fenilmercaptúrico (AFM)

O AFM, o qual está caracterizado na **Figura 4**, é um biomarcador sensível e específico.

Figura 4 - Algumas propriedades físico-químicas do Ácido Fenilmercaptúrico.

Características do AFM	
Nome alternativo	N-Acetyl-S-Phenyl-L-Cysteine
Fórmula química	C ₁₁ H ₁₃ NO ₃ S
Massa Molecular	239,291g/mol
Ponto de Ebulição	494,5 °C a 760 mmHg
pKa (Ácido forte)	3,85
pKa (Base Forte)	1,03
Solubilidade em Água	0,3 g/L



Fonte: GUIDECEM, 2018

Este biomarcador tem como fator de interferência apenas o cigarro. Além disso, apresenta uma correlação com o benzeno no ar a baixas concentrações (TUAKUILA, 2013). Esse metabólito possui tempo de meia vida de 9 a 13 horas, o que permite sua correlação com a quantidade de solvente no ar durante jornadas de trabalho de 12 horas. Alguns estudos têm demonstrado que o AFM é excretado em uma única fase, sendo que as concentrações mais elevadas foram detectadas em amostras colhidas no final da jornada de trabalho. Outros estudos demonstram que existe uma segunda fase de eliminação e que essa, que é mais lenta, tem meia vida estimada de 45h. Sabe-se, ainda, que não é provável a acumulação do AFM. Dessa forma, o mesmo deveria ser considerado um biomarcador de exposição recente e as melhores amostras a serem utilizadas são as de urina de 24 horas. Isso é essencial para a avaliação de exposição individual (ARNOLD et al., 2013). No entanto, tal metabólito apresenta um desafio como biomarcador, já que a metodologia para análise do AFM, que inclui a Cromatografia Gasosa e Líquida, associadas aos mais diversos tipos de detectores, está associada a técnicas de alto custo, como procedimentos analíticos complexos, envolvendo um gasto elevado de reagentes (AGGIO et al., 2014; ARNOLD et al., 2013; LIU et al., 2016; NICOARA et al., 2009). Isso porque o AFM tem um problema potencial para as análises de baixos níveis de

exposição, uma vez que torna-se necessário o uso de técnicas muito sensíveis para que seja possível a detecção de níveis do analito abaixo do limite de detecção (TUAKUILA, 2013). Isso eleva o custo da análise como um todo e pode inviabilizar a determinação desse marcador em alguns países (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2014). É importante destacar que a quantidade de AFM presente na urina depende do grau de hidrólise do seu precursor, que muda em função do pH, das condições de armazenamento e da hora da coleta das amostras de urina (TUAKUILA, 2013).

Embora o AFM tenha vantagens em relação ao ATTM, ele ainda não é adotado pela legislação brasileira. Dessa forma, o valor de IBMP para o mesmo ainda não foi estabelecido. Contudo, a ACGIH estabeleceu como 25 µg/g de creatinina o valor de BEI (*Biological Exposure Indice*) para o AFM (ACGIH, 2018).

6. METODOLOGIA ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DO AFM NA URINA

Várias técnicas analíticas foram utilizadas ao decorrer dos anos para a determinação de AFM em amostras de urina, principalmente a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e a Cromatografia Gasosa com diferentes detectores. Com relação às técnicas de extração, as mais utilizadas são a Extração Líquido-Líquido (LLE) e a Extração em Fase Sólida (SPE) (ANGERER; SCHILDBACH; KRÄMER, 1998; BURATTI et al., 2001; CIARROCCA et al., 2012a; EINIG; DEHNEN, 1995; MAESTRII; GHITTORI; IMBRIANI, 1997; MARRUBINI et al., 2005a; MENDES; SILVEIRA; ANDRE, 2017; POPP et al., 1994; VAN SITTEERT; BOOGAARD; BEULINK, 1993; WAIDYANATHA et al., 2004). Contudo, outros tipos de extração também podem ser utilizados, como a Extração com Partição em Baixa Temperatura (LTPE) (GOMES et al., 2017).

6.1. Planejamento de Experimento Analítico

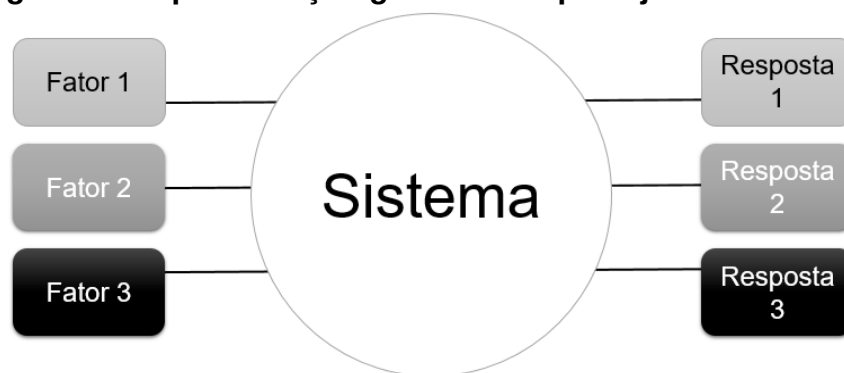
No desenvolvimento de um método analítico o uso de planejamentos experimentais, os quais são baseados em princípios estatísticos, fornece várias informações úteis que podem ser aplicadas com a utilização do mínimo possível de experimentos (MARINHO; CASTRO, 2005).

Ao iniciar algum tipo de experimento, o analista tem que enfrentar um problema relacionado à influência que algumas variáveis específicas têm sobre

outras. Isso quer dizer o analista necessita saber como variáveis específicas podem influenciar no rendimento da reação estudada, que seria a resposta (TEÓFILO; FERREIRA, 2006).

Um número específico de variáveis, que são denominadas também como fatores, atuando sobre o sistema estudado, produz suas respectivas respostas. Isso quer dizer que o sistema em estudo atua como uma função que opera sobre os fatores e produz uma resposta específica para cada um deles (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007), como esquematizado na **Figura 5**.

Figura 5 - Representação geral de um planejamento fatorial.



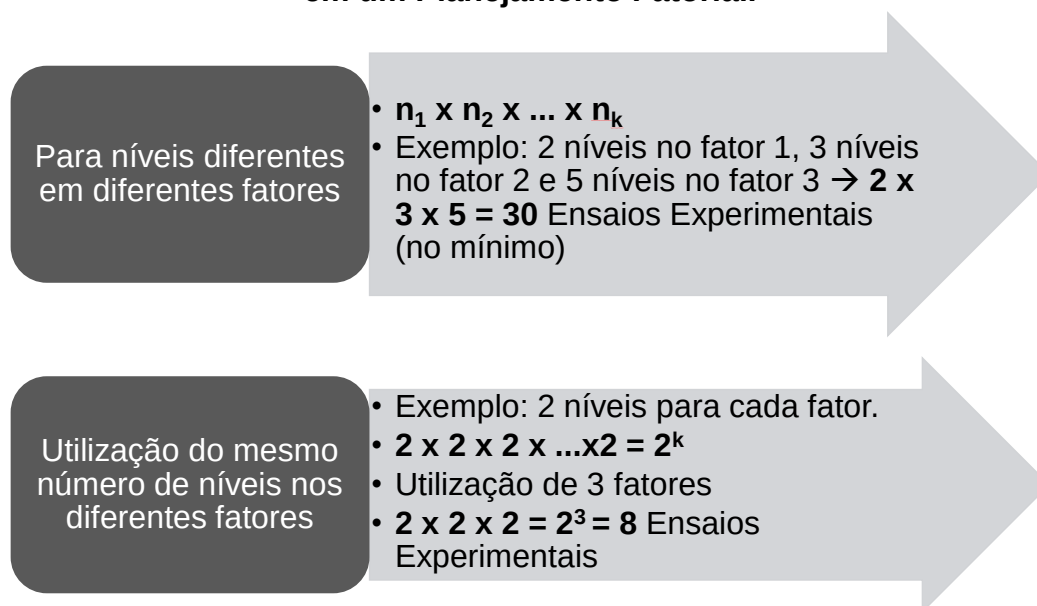
Fonte: Adaptado de NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007[□]

Ao descobrir essa função, o analista terá maior entendimento sobre a reação estudada. Dessa forma, as melhores condições para a reação em questão poderão ser definidas.

Ao fazer um planejamento fatorial completo, devem ser realizados experimentos, que são chamados ensaios experimentais, para todas as possíveis combinações entre os fatores escolhidos.

Se houver n_1 níveis do fator 1, n_2 níveis do fator 2, ..., e n_k níveis do fator k , o planejamento será um fatorial $n_1 \times n_2 \times \dots \times n_k$. Contudo, para a estimação do erro experimental, existe a necessidade da ocorrência de replicatas, o que faz aumentar o número de experimentos. Dessa forma, definido o número de fatores e de níveis utilizados no planejamento experimental, sabe-se que, para k fatores, se for definida a utilização de dois níveis para cada fator, serão realizados $2 \times 2 \times 2 \times \dots \times 2 = 2^k$ ensaios diferentes. Este tipo de planejamento é definido, então, como planejamento fatorial 2^k (**Figura 6**) (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007).

Figura 6 - Representação esquemática da variação de níveis e de fatores em um Planejamento Fatorial.



Fonte: Do autor.

Existem situações específicas em que o número de experimentos realizados é muito grande e não existe a possibilidade da realização do experimento fatorial com réplicas. Dessa forma, é possível a realização de um experimento fatorial sem réplicas, mas existem riscos relacionados a não estimativa interna de erro.

Para a disposição dos dados iniciais do experimento, é utilizada uma tabela, chamada matriz de planejamento (**Tabela 3**). Para dados quantitativos, os dados são representados com o sinal de (-) para o valor mais baixo e sinal de (+) para o valor mais alto. Todas as colunas referentes aos fatores vão começar pelo menor valor, ou seja, pelo sinal de (-) e esses sinais vão se alternando de forma definida em cada coluna. Dessa forma, na primeira coluna, os sinais vão se alternando de um a um, na segunda, eles se alternam de dois a dois e, na terceira, os quatro primeiros sinais são negativos e os últimos quatro são positivos.

Tabela 3 - Matriz de Planejamento de um planejamento fatorial 2^3 sem réplica.

Ensaio Experimental	Fatores			Média das Respostas (μ)
	1	2	3	
1	-	-	-	μ_1
2	+	-	-	μ_2
3	-	+	-	μ_3
4	+	+	-	μ_4
5	-	-	+	μ_5
6	+	-	+	μ_6
7	-	+	+	μ_7
8	+	+	+	μ_8

Fonte: Adaptada de NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007

Depois de feita a matriz de planejamento, deve ser formada a tabela de coeficientes de contraste do planejamento (**Tabela 4**). Para isso, são multiplicados os sinais das colunas referentes às interações que serão analisadas. Para esse tipo de planejamento, existem 4 efeitos diferentes: **12**, **13**, **23** e **123**. Nota-se que a última coluna desta tabela contém os valores médios das respostas obtidas no ensaio (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007).

Tabela 4 - Coeficientes de contraste para um fatorial 2^3 .

Média	Efeitos Principais			Efeitos de Interação				Resposta (y)
	1	2	3	12	13	23	123	
+	-	-	-	+	+	+	-	y_1
+	+	-	-	-	-	+	+	y_2
+	-	+	-	-	+	-	+	y_3
+	+	+	-	+	-	-	-	y_4
+	-	-	+	+	-	-	+	y_5
+	+	-	+	-	+	-	-	y_6
+	-	+	+	-	-	+	-	y_7
+	+	+	+	+	+	+	+	y_8

Fonte: Adaptada de NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2007

Uma das formas de tratamento deste tipo de experimento é através do método de Lenth e Daniel. Estes são métodos utilizados na decisão de quais

efeitos tem significância quando não há presença de réplicas. Como, nesse caso, não há graus de liberdade para estimar a variância do erro, um método para estimar uma quantidade semelhante ao erro padrão é proposto. Este método é chamado Pseudo Erro Padrão (PSE) (PORTAL-ACTION, 2018).

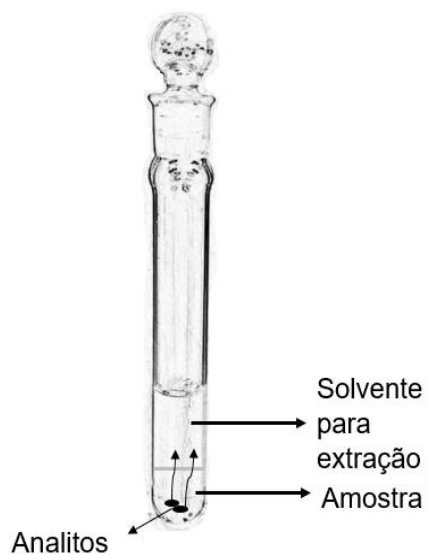
O Gráfico de Probabilidade Normal e Half-Normal é utilizado para a identificação de efeitos que, provavelmente, não são nulos, do ponto de vista estatístico. Esses efeitos são chamados, também, de ativos e os pontos correspondentes a esses efeitos ativos são os que estiverem afastados de uma reta imaginária, a qual é formada por uma nuvem de pontos. Espera-se que uma pequena fração dos contrastes seja de efeitos ativos dentre todos os analisados no trabalho (PORTAL-ACTION, 2018). O Método de Lenth, assim como o de Daniel, tem como princípio a presença de poucos efeitos esparsos (ativos). Para esse método é calculado o Pseudo Erro Padrão (PSE). A partir desse, é definida uma margem de erro (ME). Os contrastes que excederem o valor de ME, em valor absoluto, são considerados significativos. É definida ainda uma margem de erro simultânea (SME), uma vez que, caso haja um nível grande de contrastes, é esperado que algumas estimativas de contrastes não significativos excedam o valor de ME, o que pode conduzir a uma falsa conclusão.

6.2. Técnicas de Extração

A etapa de extração de um método consiste na transferência do analito presente na matriz, de acordo com as suas características físico-químicas, entre duas fases: a própria matriz e o meio extrator.

A técnica de ELL se baseia na transferência de solutos, de acordo com a solubilidade, entre duas fases: uma orgânica e uma aquosa. A seletividade da extração é alcançada pela escolha de propriedades do solvente, como polaridade, ponto de ebulição, capacidade de ligação de hidrogênio, disponibilidade, acessibilidade, custo, etc. Posteriormente, o extrato obtido frequentemente passa por processos de limpeza e concentração. Essa técnica, contudo, pode apresentar problemas técnicos, como formação de emulsão, alto custo, longo tempo de extração, contato com solventes tóxicos, etc. (**Figura 7**) (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2014).

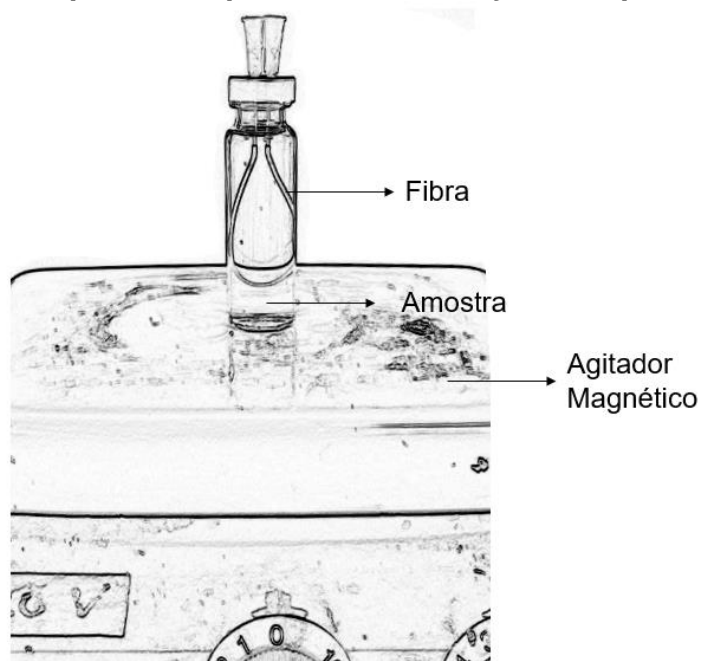
Figura 7 - Esquema simplificado de extração do tipo líquido-líquido.



Fonte: Do Autor.

Já a LPME ocorre pela transferência de massa dos analitos da amostra para o revestimento de polímero de uma fibra de sílica fundida. Essa transferência continua até que o potencial químico de cada substância em todas as fases seja o mesmo (**Figura 8**). O conteúdo líquido presente no interior da fibra é transferido para um *vial*, em que um volume específico será retirado para a realização da derivatização e posterior injeção no cromatógrafo (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2014).

Figura 8 - Esquema simplificado da extração do tipo LPME.



Fonte: Do Autor.

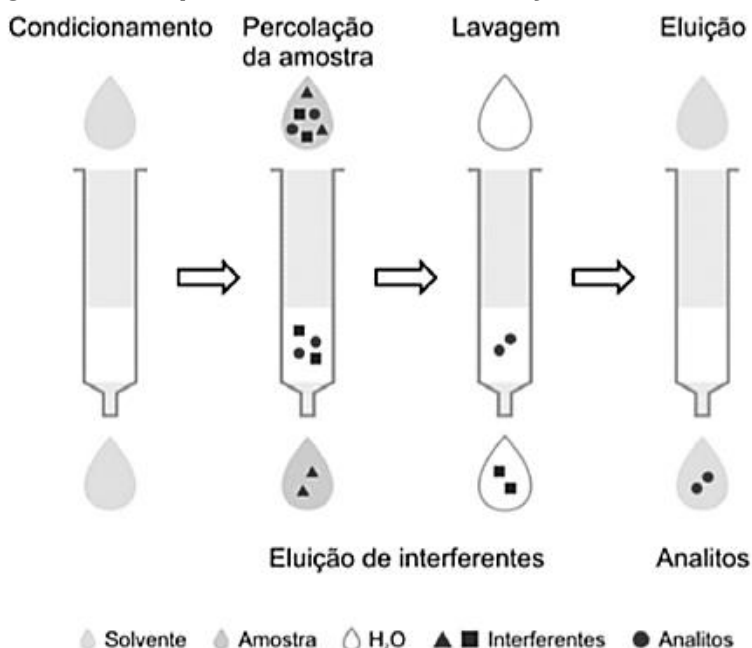
A LTPE, por sua vez, consiste na adição de pequena quantidade de solvente orgânico miscível a uma amostra líquida e resfriamento da mistura resultante a -20°C por algumas horas. Sob estas condições, a fase aquosa solidifica, enquanto o sobrenadante orgânico permanece líquido, o qual é constituído, principalmente, pelo solvente orgânico e os analitos solúveis. Essa fração pode ser isolada e, subsequentemente, analisada.

Esse método tem um número reduzido de passos, fazendo com que o mesmo seja simples e com alta taxa analítica. Além disso, é um método menos prejudicial ao meio ambiente, uma vez que o volume de amostra e solvente orgânico requerido para obtenção de um extrato limpo é pequeno (GOMES et al., 2017).

A SPE é uma técnica de separação do tipo líquido-sólido e tem como base os mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão.

A instrumentação empregada nesta técnica é bem simples e as etapas relacionadas a extração podem ser resumidas em ativação do solvente, percolação da amostra, lavagem e, por fim, eluição dos analitos. Tais etapas estão ilustradas na **Figura 9**.

Figura 9 - Etapas realizadas na extração em fase sólida.



Fonte: CALDAS et al., 2011.

A primeira etapa, denominada condicionamento, tem como objetivo a ativação do adsorvente. Essa etapa pode ser útil, ainda, para a eliminação de alguma impureza que possa estar presente no cartucho. A ideia principal dessa etapa é preparar o cartucho para que, em uma etapa posterior, o analito fique retido no adsorvente através da passagem de grande volume de amostra, deixando ainda que interferentes não fiquem retidos.

Com relação a etapa de aplicação da amostra, é importante ressaltar que o pH da mesma deve ser cuidadosamente acertado, uma vez que pode ser um fator crítico para a retenção adequada do analito no cartucho. Além disso, deve-se ter cuidado na velocidade de aplicação da amostra. Para isso, a pressão aplicada no processo deve ser bem controlada.

Já a terceira etapa, que é a responsável pela lavagem da coluna, tem importância no sentido de eliminação de interferentes presentes na matriz. Para isso, devem ser utilizados solventes de lavagem que não possuam capacidade de remover o analito de interesse do cartucho.

No último passo, por sua vez, os analitos devem ser eluídos e a eluição de interferentes deve ser minimizada. Para isso, é de extrema importância a escolha do solvente que será utilizado (CALDAS et al., 2011).

6.3. Derivatização

A derivatização é uma etapa do preparo de amostras que permite que uma variedade de compostos pouco voláteis ou instáveis seja analisada por GC-MS, por exemplo, uma vez que, com essas características, esses compostos costumam não serem detectados por essas técnicas. Ela é, dessa forma, comumente utilizada para aprimorar as análises cromatográficas. Para isso, há a necessidade de reagentes eficientes que podem modificar o comportamento da substância e permitir sua detecção nessas análises.

O uso primário da derivatização é para a modificação química de um composto por derivatização de um grupo funcional, o qual pode ser $-OH$, $-COOH$, $-NH$ e $-SH$. Isso vai permitir que o mesmo seja analisado por cromatografia, seja aumentando sua volatilidade, sua seletividade ou mesmo a estabilidade do composto. A **Tabela 5** descreve estes três processos.

Tabela 5 - Processos envolvidos na técnica de derivatização.

Aumento da Volatilidade	da	Importante para compostos polares, os quais podem possuir os grupos funcionais $-O$, $-S$, $-N$ e $-P$. Compostos com múltiplos grupos polares possuem baixa volatilidade devido a interações intermoleculares causadas por ligações de hidrogênio. Para compostos voláteis e de baixo peso molecular: a derivatização aumenta o peso molecular de compostos que já são voláteis, o que permite a diminuição de perdas.
Aumento da Estabilidade	da	Alguns compostos são voláteis, mas sofrem decomposição térmica parcial, a qual é caracterizada pela reação em que um único composto se quebra em um ou mais compostos, quando submetido a aquecimento. Isso faz com que ele necessite ser mais estável.
Aumento da Seletividade	da	Melhora da performance cromatográfica, uma vez que a derivatização permite que haja uma acentuação nas diferenças entre os compostos de uma amostra, o que facilita a separação cromatográfica e posterior detecção. Melhora no formato dos picos, já que os grupos funcionais polares tendem a adsorverem nas superfícies ativas da coluna. Dessa forma, o aparecimento de picos com cauda é evitado.

Fonte: SIGMA-ALDRICH; SUPELCO, 2011

No sentido de ajustar os parâmetros apresentados acima para melhora na qualidade da análise cromatográfica, várias técnicas de derivatização foram desenvolvidas para a realização da modificação das propriedades da amostra. Contudo, existem diferenças entre os processos para os diferentes tipos de cromatografia.

Para análises que utilizam cromatografia gasosa, que é uma técnica de separação de compostos voláteis, quando são utilizadas amostras que possuem os grupos funcionais -COOH , -OH , -NH e -SH , os quais são difíceis de serem analisados, existe a necessidade de utilização de alguns tipos de técnicas de derivatização específicas. Entre estas, estão a sililação, acilação, esterificação e alquilação, as quais estão descritas na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Descrição dos processos de derivatização para Cromatografia Gasosa.

Processo	Descrição
Sililação	Pode acontecer aumento da volatilidade do analito e diminuição da absorção do mesmo na superfície da coluna. Com a sililação, há o deslocamento de um hidrogênio ativo em grupos -OH , -SH e -NH .
Acilação	Para compostos que possuem grupamento amina e/ou grupos hidroxila em sua composição. É a conversão de compostos com hidrogênio ativo em ésteres, tio ésteres e amidas.
Alquilação	Proporciona diminuição da polaridade do composto através da substituição de um hidrogênio ativo por um grupo alquila.
Esterificação	Derivatização de ácidos. Envolve a condensação de grupos carboxila de um ácido e de um grupo carboxila de um álcool, com eliminação de água.

Fonte: SIGMA-ALDRICH; SUPELCO, 2011

Embora existam os diferentes tipos de reações de derivatização, a sililação tem sido uma escolha para a análise de AFM (WAIDYANATHA et al., 2004).

Existem diversos tipos de reagentes utilizados para as reações de sililação. A **Tabela 7** tem a descrição dos principais. A escolha de um desses reagentes deve levar como base a sua reatividade e seletividade em relação ao

composto, a estabilidade do derivado e abundância dos produtos de reação (SIGMA-ALDRICH; SUPELCO, 2011).

Tabela 7 - Alguns reagentes mais utilizados nas reações de silição.

Reagente	Características	Estrutura
BSTFA (N,O-Bis(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide)	Reage com vários compostos orgânicos polares por substituição de um hidrogênio ativo por um grupo TMS; Os derivados com TMS são estáveis termicamente, mas também são mais susceptíveis à hidrólise; São mais voláteis que outros reagentes siliil; Altamente solúvel em vários solvente comumente utilizados, além de ter boa propriedade como solvente, o que faz com que ele possa ser utilizado sem adição de outros solventes durante a reação.	
BSTFA+TMCS N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide and (Trimethylchlorosilane)	TMCS aumenta a reatividade do BSTFA; Também é altamente solúvel em vários solventes comumente utilizados, além de ter boa propriedade como solvente, o que faz com que ele possa ser utilizado sem adição de outros solventes durante a reação.	TMCS
MSTFA N-Methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide	É mais volátil que o BSTFA, mas possui mesma força de reação; Muito usado em análises a nível de traços; Usado na preparação de derivados voláteis e termicamente estáveis para análises em CG-EM.	

Fonte: SIGMA-ALDRICH; SUPELCO, 2011

É importante ressaltar, ainda, que as reações de derivatização ocorrem, geralmente, em aquecimento por período de tempo muito longo, considerando as análises de rotina realizadas em estufa (BLAU & HALKET, 1993). O uso do forno de micro-ondas doméstico tem sido proposto, então, como um instrumento eficaz para diminuição desse tempo de reação, como descrito por DE PAIVA et al., 2013.

6.4. Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

A Cromatografia Gasosa (CG) é uma técnica amplamente aplicada em vários ramos da ciência. Por um tempo, ela teve um papel fundamental na determinação da quantificação de compostos específicos na mistura analisada. Entretanto, a capacidade em estabelecer a natureza e estrutura química desses compostos separados e quantificados é reduzida. Dessa forma, há a necessidade da utilização de um sistema de detecção. Dentre estes sistemas, o mais utilizado é o espectrômetro de massas, uma vez que o espectro de massas fornece informações, como peso molecular, composição elementar, grupos funcionais presentes (se um espectrômetro de massas de alta resolução for utilizado), etc. (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2014).

Por ser uma técnica de alta sensibilidade, especificidade, habilidade em separar metabólitos de matrizes complexas e alta eficiência, a técnica de CG-EM tem sido a mais amplamente utilizada na separação, identificação e quantificação de AFM (AGGIO et al., 2014; LIU et al., 2016; NICOARA et al., 2009).

Substâncias muito polares, termolábeis, iônicas e compostos de alto peso molecular não são compatíveis com análises regulares de CG. Dependendo da estrutura molecular do analito e o grupo funcional disponível, é possível, em alguns casos, a obtenção de um derivado químico que tem uma pressão de vapor maior e é, também, mais acessível para análise em CG (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2014).

Durante a transferência da amostra para dentro do CG, a amostra é volatilizada por uma rápida exposição a uma zona de alta temperatura (200-300°C) e misturada a um gás de arraste (Ar, He, N₂ ou H₂).

Essa é uma etapa crítica na cromatografia gasosa e que precisa cumprir condições, como:

- a. A amostra deve entrar na coluna em uma faixa cromatográfica tão fina quanto possível para redução do alargamento do pico;
- b. A relação entre os componentes da mistura analisada deve ser a mesma antes e depois da injeção e não deve haver discriminação por peso molecular ou volatilidade na porta de injeção;

c. Durante a transferência para a coluna, os componentes não podem reagir entre si ou sofrerem alterações químicas (isomerização, hidrólise, polimerização) ou serem absorvidos dentro do injetor.

Quando a técnica de injeção é escolhida, algumas variáveis seguintes serão seguidas e otimizadas, como modo de injeção (Split, splitless, on-column), volume de amostra a ser injetada, temperatura do injetor, tipo de revestimento, temperatura inicial da coluna e a forma de injeção (manual ou automática) (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2014).

A mistura resultante da etapa anterior entra coluna cromatográfica, que é um capilar tubular de sílica fundida revestida internamente com um filme de polímero fino e que será responsável pela separação dos analitos. À medida que a amostra vai passando pela coluna, as moléculas do analito são repartidas entre o gás de arraste, que é a fase móvel, e o revestimento de polímero, que é a fase estacionária. Essa repartição ocorre de acordo com a estrutura química dos compostos.

Uma das características mais importantes da coluna cromatográfica é sua resolução, que é definida como habilidade em separar componentes com constantes de distribuição bem similar entre as fases móvel e estacionária.

Quanto maior o número de componentes na mistura e quanto maior similaridade estrutural entre os componentes, mais compridas deverão ser as colunas para separação completa dos compostos. Contudo, quanto maior o comprimento da coluna, maior será o tempo de análise (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2014).

Ao final da separação, as moléculas passam por um sistema de detecção que dá origem a um sinal elétrico baseado ou em uma propriedade física específica (condutividade térmica) ou um processo físico-químico (ionização em chama, captura de elétrons). Este sinal é proporcional a quantidade de moléculas de mesma identidade.

O detector de massas é bastante utilizado acoplado ao cromatógrafo a gás, uma vez que ele confirma a identidade de um composto numa mistura complexa (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2014).

O espectrômetro de massas é composto por uma câmara de ionização que, na maioria das vezes, utiliza a ionização por elétrons (EI) para fornecer energia aos analitos que serão fragmentados e, dessa forma, gerados os íons

que serão detectados. Além disso, existe a ionização química (CI), que é um método alternativo utilizado quando nenhum íon molecular é registrado no espectro de massas obtido.

Faz parte do equipamento, ainda, o analisador de massas, o qual separa os íons de acordo com a razão m/z . Quadrupolo, Ion Trap e TOF são alguns tipos de analisadores frequentemente utilizados.

Nas análises realizadas por GC-MS, o analito de interesse passa por um processo de ionização após sua saída do cromatógrafo gasoso e entrada na fonte de ionização, a qual está presente no espectrômetro de massas. Na maioria dos casos e, principalmente, neste estudo, a forma de ionização usada é a denominada impacto de elétrons. Nela, as moléculas que entram na fonte de íons são bombardeadas por um feixe de elétrons a 70 ev. Isso faz com que um elétron seja removido da molécula, o que resulta em um íon carregado. A **Figura 10** exemplifica este processo para o Íon Molecular (AGILENT-TECHNOLOGIES, 2016).

Figura 10 - Representação esquemática de formação do Íon Molecular pelo Impacto de Elétrons durante a passagem do analito pela Fonte de Ionização.



Fonte: AGILENT-TECHNOLOGIES, 2016

Além disso, no método por impacto de elétrons, há a produção de partes menores da molécula original, que são denominados fragmentos, a partir do Íon Molecular carregado (AGILENT-TECHNOLOGIES, 2016).

6.5. Parâmetros para Validação – Figuras de Mérito

Uma vez que a produção de dados analíticos não confiáveis pode levar a equívocos legais, tratamentos incorretos e prejuízos financeiros, torna-se necessário ter a garantia de que um método que será desenvolvido gere informações confiáveis sobre a amostra. Dessa forma, o mesmo deve passar por um processo denominado validação analítica (MOREAU; SIQUEIRA, 2016; RIBANI et al., 2004).

De forma geral, o objetivo da validação é ajudar a demonstrar que um determinado método analítico é adequado para seu propósito e gera resultados com a confiabilidade exigida. Deve-se levar em consideração a validação nas situações em que há desenvolvimento de um método, ou mesmo em que são feitas adaptações em metodologias que já foram validadas, em que há inclusão de novas etapas ou em que há uso de equipamentos diferentes (BRITO et al., 2003; MOREAU; SIQUEIRA, 2016).

Segundo a Anvisa, em sua Resolução RDC nº166, de 24 de julho de 2017, a validação analítica é definida como “Avaliação sistemática de um método por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências objetivas de que os requisitos específicos para seu uso são atendidos. A validação deve demonstrar que o método analítico produz resultados confiáveis e é adequado à finalidade a que se destina, de forma documentada e mediante critérios objetivos”.

Uma outra definição, publicada em 2014 no guia “The fitness of purpose of analytical methods” pelo grupo Eurachem Working Group, é “Validação é o processo de definir uma exigência analítica e confirmar que o método sob investigação tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer”.

Já a *Internacional Organization for Standardization* (ISO), define validação como a “confirmação por testes e apresentação de evidências objetivas de que determinados requisitos são preenchidos para um dado uso internacional”.

Existem alguns parâmetros para validação, os quais também são referenciados como parâmetros de desempenho ou figuras analíticas de mérito, que são utilizados para definir a confiabilidade analítica dos resultados, suas limitações e, dessa forma, verificar se os métodos estão de acordo com o que se pretende analisar (MOREAU; SIQUEIRA, 2016; PASSAGLI, 2013). Esses parâmetros devem se basear no objetivo do método (RIBANI et al., 2004). Dessa forma, órgãos, como ICH, IUPAC, Anvisa e Inmetro publicam guias ou resoluções, com algumas similaridades e diferenças, que possuem definições sobre quais parâmetros devem ser avaliados, além de seus critérios de aceitação, de acordo com a intenção do uso do método (MOREAU; SIQUEIRA, 2016). Vale ressaltar, ainda, que tais parâmetros devem ser realizados com equipamentos calibrados e com bom funcionamento. Além disso, é fundamental

que o responsável pelos estudos deve ter conhecimento suficiente sobre o trabalho, uma vez que deve ser capaz de tomar as decisões apropriadas durante a realização das etapas referentes à validação de métodos (ANVISA, 2011; INMETRO, 2011). Os principais parâmetros são (a) Linearidade; (b) Precisão; (c) Exatidão; (d) Efeito Matriz; (e) Limite de Detecção e (f) Limite de Quantificação.

6.5.1. Linearidade

Os diversos guias e normas têm suas definições a respeito da linearidade. De forma geral, esse parâmetro corresponde à habilidade da metodologia analítica em fornecer resultados, dentro de uma faixa analítica estabelecida para tal método, que são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra biológica utilizada (ANVISA, 2017; PASSAGLI, 2013; RIBANI et al., 2004).

É fato que a massa ou concentração do analito que será quantificado normalmente não é conhecido a princípio. Dessa forma, uma relação matemática, que pode ser expressa como uma equação de reta conhecida como curva analítica, entre o sinal e a concentração ou massa do analito de interesse deve ser determinada experimentalmente. Essa determinação ocorre a partir de sinais que já foram medidos posteriormente para concentrações conhecidas da espécie de interesse (RIBANI et al., 2004). Com relação à curva de calibração, sabe-se que apenas dois pontos são suficientes para a definição de uma reta. Contudo, a fim de reduzir os possíveis erros associados, na prática, as linhas devem ser definidas por no mínimo cinco pontos da curva, sem incluir o ponto zero (ANVISA, 2017; INMETRO, 2011; PEREZ, 2010; RIBANI et al., 2004). Tal determinação do número mínimo de pontos da curva também tem diferenças entre os diversos guias e normas.

6.5.2. Precisão

Segundo a Anvisa, “a precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado”.

Esse parâmetro é considerado em três níveis. Ele pode ser expresso por meio da repetibilidade, da precisão intermediária ou da reprodutibilidade (ANVISA, 2003).

A repetibilidade, também denominada precisão intra-corrida, define a concordância entre os resultados dentro um período de tempo curto, mas utilizando o mesmo analista e mesmo instrumento. Segundo a Anvisa e o ICH, para a determinação da mesma, são utilizadas 9 amostragens, em que são utilizadas 3 concentrações diferentes. Além disso, cada concentração deverá ser feita em triplicata. O INMETRO, por sua vez, recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão. Já a precisão intermediária, a qual é também chamada de precisão inter-corridas, avalia a concordância entre resultados obtidos no mesmo laboratório. Contudo, os mesmos são obtidos em dias diferentes (no mínimo dois dias), com analistas diferentes ou equipamentos diferentes. Com relação a reprodutibilidade, também chamada precisão inter-laboratorial, é avaliada a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes (ANVISA, 2003).

Em métodos em que são analisados analitos a nível de traços, são aceitos DPR de até 20%. Caso haja necessidade de melhora na precisão, uma boa solução é aumentar o número de replicatas (RIBANI et al., 2004).

6.5.3. Exatidão

Representa a proximidade dos resultados obtidos pelo em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Tal valor é obtido por uma medição perfeita e é indeterminado por natureza (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004).

O número de ensaios referentes a esse parâmetro varia entre os diversos guias e normas. Tanto a Anvisa quanto o ICH estabelecem um mínimo de nove determinações, sendo que deve ser utilizado, no mínimo, três níveis de concentração diferentes e três réplicas para cada concentração.

Para avaliar a exatidão, são utilizados, principalmente quatro processos, que são denominados materiais de referência, comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição padrão.

A comparação de métodos, como o nome já sugere, consiste na comparação dos resultados obtidos nas análises e os resultados obtidos através de um método de referência.

Os materiais de referência certificados possuem valores das concentrações de substâncias específicas e uma incerteza associada. Para verificar a exatidão, os valores que serão obtidos nas análises devem ser comparados com os valores certificados. Tais materiais são fornecidos por organismos reconhecidos, como NIST (National Institute of Standards and Technology) e FAPAS (Food Analysis Performance Assessment Scheme) (RIBANI et al., 2004).

Quando um material de referência certificado, em que a quantidade da substância é previamente conhecida, não está disponível, os ensaios de recuperação são utilizados para estimar a exatidão. Com tais ensaios, é possível conhecer sobre a eficiência do método de extração, uma vez que a proporção da quantidade da substância que é extraída e que pode ser quantificada é definida (MOREAU; SIQUEIRA, 2016; RIBANI et al., 2004). Para essas análises são adicionados às amostras compostos denominados substitutos, que é um composto puro e que tem um comportamento químico semelhante ao da substância de interesse na forma nativa. Existem diferentes tipos de compostos substitutos, como o padrão da substância, o analito modificado isotopicamente ou padrão interno, que é um composto diferente do analito de interesse, mas que tem um comportamento químico semelhante (RIBANI et al., 2004).

6.5.4. Efeito Matriz

O efeito matriz avalia se os compostos presentes na matriz interferem no sinal do analito de interesse (PASSAGLI, 2013). Isso acontece devido ao fato de a matriz pode conter interferentes que afetam o desempenho da medição, aumentando ou reduzindo o sinal e a magnitude dos picos gerados (INMETRO, 2011). Além disso, algumas amostras podem sofrer degradação. Com isso, são gerados compostos que podem coeluir com o analito de interesse (RIBANI et al., 2004).

Segundo a Anvisa, na RDC nº166 de 2017, “a seletividade deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de identificar ou quantificar o analito de interesse, inequivocamente, na presença de componentes que podem estar

presentes na amostra, como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz”. Esse parâmetro garante que o pico gerado seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI et al., 2004).

6.5.5. Limite de Detecção (LD)

Quando análises são realizadas em amostras com analitos em concentrações muito baixas, é de extrema importância ter o conhecimento da menor concentração do analito que pode ser detectado por um método específico (INMETRO, 2011). Dessa forma, o limite de detecção é referente a menor concentração do analito que pode ser detectada. Contudo, essa concentração não é quantificada (PASSAGLI, 2013; RIBANI et al., 2004).

“O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável” (Anvisa, 2003). Para métodos instrumentais, a estimativa do limite de detecção pode ser feita com base na reação sinal/ruído ou pelo método baseado em parâmetros da curva analítica (RDC 302, 2014; RIBANI et al., 2004). Dessa forma, a menor concentração em que a substância pode ser detectada é estabelecida a partir da comparação dos sinais medidos dos brancos, que é a matriz sem a presença do composto de interesse, e de amostras que possuem pequenas quantidades conhecidas do analito (BRITO et al., 2003; RIBANI et al., 2004). Para métodos instrumentais, essa estimativa pode ser feita com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base (ANVISA, 2017).

6.5.6. Limite de Quantificação (LQ)

É a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser quantificada. Esse limite é estabelecido através da análise de amostras que contenham concentrações decrescentes do analito até o menor nível que pode ser quantificável (RIBANI et al., 2004).

Da mesma forma que o limite de detecção, o limite de quantificação também pode ser calculado utilizando os mesmos métodos. Contudo, no caso da relação sinal/ruído, determina-se o ruído da linha de base, e a concentração considerada como limite de quantificação é aquela que produz sinal/ruído superior a 10:1 (ANVISA, 2003).

Embora o método mais utilizado seja o sinal/ruído, o mesmo não é o mais adequado. Isso acontece, pois a curva analítica é construída com a área do pico e não apenas com o sinal do detector, além do fato de o LD e o LQ serem afetados pelas condições cromatográficas, já que picos maiores aumentam a relação sinal ruído, o que resulta em limites de detecção e quantificação mais baixos. Dessa forma, o método baseado nos parâmetros da curva analítica é o melhor a ser utilizado, já que é estatisticamente mais confiável (RIBANI et al., 2004).

7. OBJETIVOS

7.1. Objetivo Geral

Desenvolver uma metodologia analítica para determinação de Ácido Fenilmercaptúrico Urinário por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas.

7.2. Objetivos Específicos

- a. Otimização das condições cromatográficas;
- b. Estudo de técnicas de extração existentes;
- c. Estudo da reação de Derivatização utilizando forno de micro-ondas;
- d. Estabelecimento das figuras de mérito do método analítico;
- e. Análise do Ácido Fenilmercaptúrico em amostras reais de urina.

8. MATERIAL E MÉTODOS

8.1. Padrão Analítico

Para a preparação da solução estoque do Ácido Fenilmercaptúrico (AFM), foi utilizado Acetonitrila como solvente. A solução foi preparada na concentração de 500 mg/L. Para o preparo da solução de trabalho também foi preparada em Acetonitrila, porém na concentração de 1 mg/L.

8.2. Vidrarias, Equipamentos, Acessórios e Reagentes

- As vidrarias utilizadas nas diferentes técnicas de extração foram tubos de vidro, béqueres, balões volumétricos, provetas e vials;

- Micropipetas de volume variável 10 a 100 μL , 20 a 200 μL , 100 a 1000 μL , 1,0 a 5,0 mL e 1,0 a 10,0 mL;
- Tubos tipo *Eppendorf* 2 mL;
- Colunas SPE C18-500 mg com capacidade para 3 mL, Chromabond®;
- Manifold com 6 canais - Agilent Technologies®;
- Banho-maria HM 1003 - Hemoquímica®;
- Balança analítica modelo E02140 - Ohaus Explore®;
- Aparelho de ultrassom modelo Sonitop 404 A - Soni-Tech®;
- Potenciômetro DM 21 - Digimed®;
- Sistema de purificação de água Direct-Q3 - Millipore®;
- Seringa para injeção manual da marca SGE;
- Agitador de tubo MS 3 digital - Ika®;
- Forno microondas convencional, modelo Mabe®
- Cromatógrafo a Gás (Agilent 7890A), acoplado ao espectrômetro de massas com analisador Quadrupolo (5975C).
- O reagente utilizado na reação de derivatização foi o N-metil-N-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (MSTFA); N-O-Bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA) Sigma Aldrich.
- Nitrogênio comercial Air Products®.
- Centrífuga modelo Sigma 2k15

8.3. Condições do Sistema Cromatográfico

As análises foram realizadas em um cromatógrafo gasoso Agilent Technologies, modelo 7890A acoplado ao espectrômetro de massas simples quadrupolo, modelo 5975 Insert XI CI/EI MSD.

A partir da solução-padrão de trabalho de AFM, foram otimizadas as condições cromatográficas, e condições do espectrômetro de massas.

Foram testadas duas condições cromatográficas, (Condição 1 e Condição 2) e estão descritas nas **Tabelas 8 e 9**, respectivamente. A separação cromatográfica foi feita em coluna capilar DB-5 de 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme.

Tabela 8 - (Condição 1) Condições cromatográficas para a avaliação do Ácido Fenilmercaptúrico urinário.

Injetor	Temperatura		270°C	
	Modo		Splitless	
Coluna	Modelo		DB-5 (30m x 0,25mm i.d., 0,25µm)	
	Fluxo de Hélio		1 mL/min	
Rampa de temperatura do forno	°C/min		°C	Tempo total em minutos
	Inicial		75	4
	Rampa 1	10	245	10
	Pós corrida	290°C por 2 minutos		
Espectrômetro de Massas	Modo		SIM	
	Temperaturas		Quadrupolo	Fonte
			150	230
	Íons		AFM	
			311, 252, 237	

Fonte: Do autor.

Tabela 9 - (Condição 2): Condições cromatográficas para a avaliação do Ácido Fenilmercaptúrico urinário.

Injetor	Temperatura		270°C	
	Modo		Splitless	
Coluna	Modelo		DB-5 (30m x 0,25mm i.d., 0,25µm)	
	Fluxo de Hélio		1 mL/min	
Rampa de temperatura do forno	°C/min		°C	Tempo total em minutos
	Inicial		100	2
	Rampa 1	10	260	0
	Rampa 2	30	290	10
	Pós corrida	290°C por 2 minutos		
Espectrômetro de Massas	Modo		SIM	
	Temperaturas		Quadrupolo	Fonte
			150	230
	Íons		AFM	
			311, 252, 237	

Fonte: Do autor.

8.4. Derivatização

Para a otimização do procedimento de derivatização do AFM foram testados o BSTFA (N-O-Bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida) e o MSTFA (N-Metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida). Após a escolha do agente derivatizante, foi realizado um experimento fatorial (sem réplicas) para a avaliação das melhores condições relacionadas ao micro-ondas. Neste foram utilizadas 3 concentrações diferentes do padrão de AFM, 3 tempos diferentes e 3 proporções diferentes de volume BSTFA/Acetato de Etila (**Tabela 10**).

O experimento fatorial sem réplicas realizado para o teste de derivatização foi tratado por dois métodos, o de Lenth e Daniel.

Tabela 10 - Planejamento Fatorial sem replicatas para a realização dos testes de derivatização em microondas utilizando BSTFA como agente derivatizante.

Experimentos	Efeitos Principais			Efeitos de Interação			
	BSTFA/Acetato μL de Etila (1)	Tempo min (2)	Potência % (3)	12	13	23	123
1	- 20:40	-1	+70	+	-	-	+
2	- 20:40	+3	+70	-	-	+	-
3	+ 40:20	-1	+70	-	+	-	-
4	+ 40:20	+3	+70	+	-	-	-
5	-20:40	-1	-20	+	+	+	-
6	-20:40	+3	-20	-	+	-	+
7	+40:20	-1	-20	-	-	+	+
8	+40:20	+3	-20	+	-	-	-

Legenda:

Fatores/Níveis

Superior (+)

Inferior (-)

(1): Proporção de BSTFA e Acetato de Etila (60μL de solução)

20μL de Acetato de Etila e 40 μL de BSTFA

40μL de Acetato de Etila e 20 μL de BSTFA

(2): Tempo no Micro-ondas

3 minutos

1 minuto

(3): Potência do Micro-ondas

70%

20%

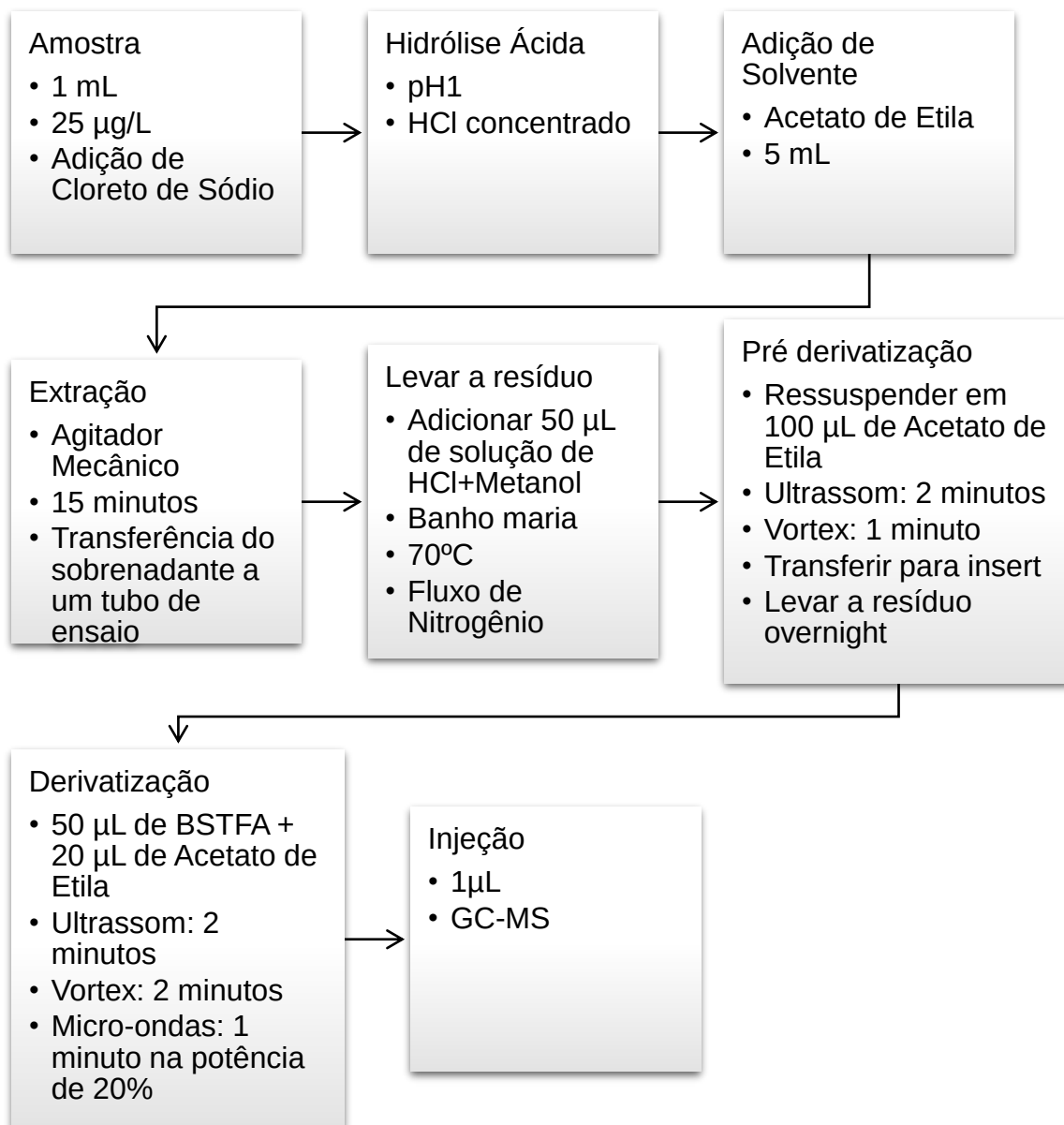
8.5. Técnicas de Extração

8.5.1. Extração Líquido-Líquido (ELL)

Dentre os testes realizados nesse estudo com esse tipo de extração, o que obteve mais sensibilidade para a detecção de AFM foi o que está descrito na **Figura 11** e que foi baseado em Waidyanatha et al., (2004) e no capítulo sobre extração líquido-líquido de Moreau & Siqueira (2016).

Para a extração do AFM, 1,0 mL da amostra de urina previamente fortificada com padrão de AFM (25 µg/L) foi acidificado com HCl concentrado para pH 1. Após a acidificação, 5,0 mL Acetato de Etila foram adicionados a amostra que foi submetida a agitação por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo de ensaio e colocado em banho de água a 70°C até a secura. O resíduo foi ressuspensionado em 100 µL de acetato de etila, sonificado por 2 minutos no ultrassom e *vortexado* por 1 minuto. O extrato foi colocado em *vial* com *insert* de vidro e levado a resíduo a temperatura ambiente por 12 horas. O resíduo foi ressuspensionado em 40 µL de BSTFA e 20 µL de Acetato de Etila. O extrato foi sonificado, agitado por 2 minutos e submetido a aquecimento por microondas convencional por 1 minuto na potência de 20%. Após a derivatização, 1 µL da amostra foi injetado no Cromatógrafo a Gás acoplado ao Espectrômetro de Massas para análise.

Figura 11 - Fluxograma sobre a análise de AFM utilizando a técnica de extração do tipo líquido-líquido.

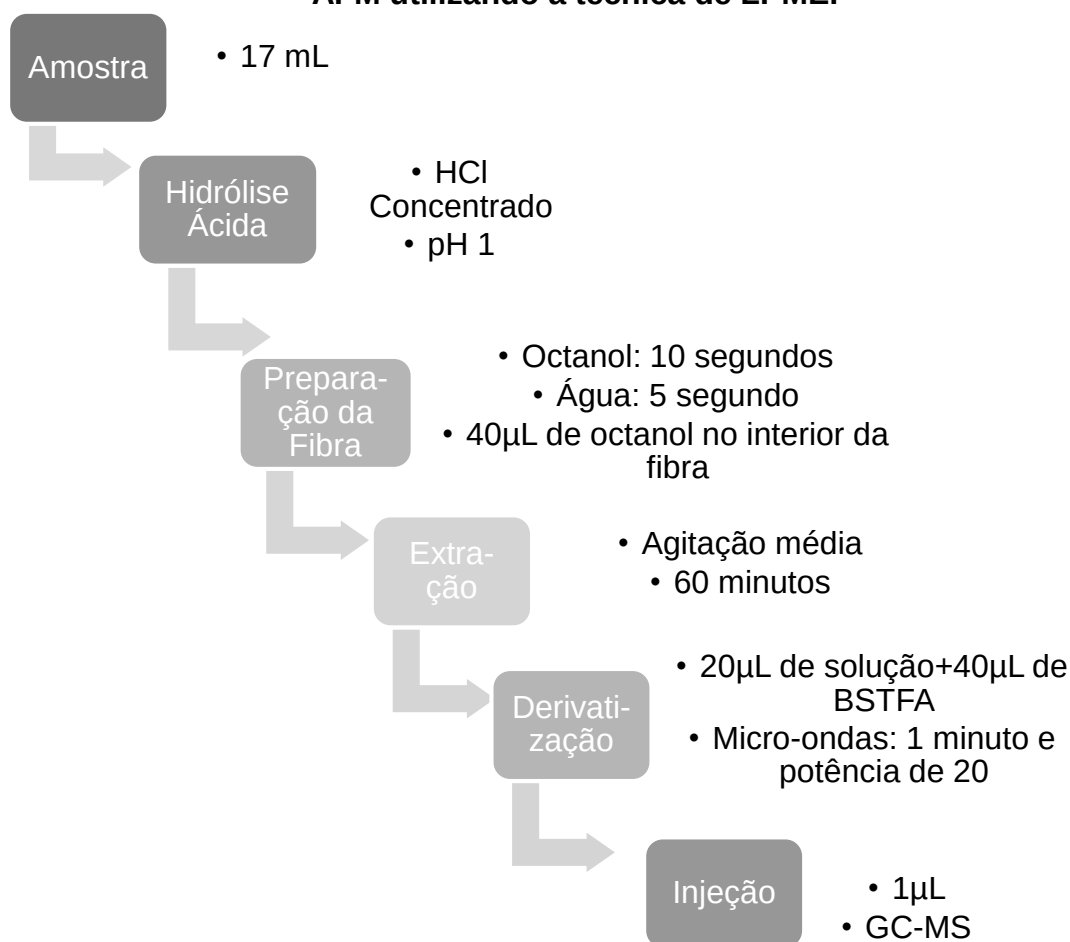


8.5.2. Microextração em Fase Líquida (LPME)

Em um *vial* com capacidade para 20 ml, foram adicionados 17 mL de urina e o meio foi acidificado (pH=1) com ácido clorídrico concentrado. A fibra oca foi inserida em uma proveta contendo octanol por 10 segundos em banho ultrassom. Após a impregnação dos poros, a fibra foi colocada em uma proveta com água por 5 segundos no ultrassom para limpeza da fibra. Foram adicionados, no interior da fibra, 40 µL de octanol. A fibra foi colocada em contato com a amostra e submetida a agitação por 60 minutos. Após a extração, 20 µL do extrato foram transferidos para um *insert*. Posteriormente, foram adicionados

40µL de BSTFA e a mistura foi agitada em *vortex* por 1 minuto e levada ao forno de micro-ondas convencional para aquecimento e derivatização por 1 minuto na potência de 20%. 1µL do derivatizado foi injetado no GC-MS (**Figura 12**).

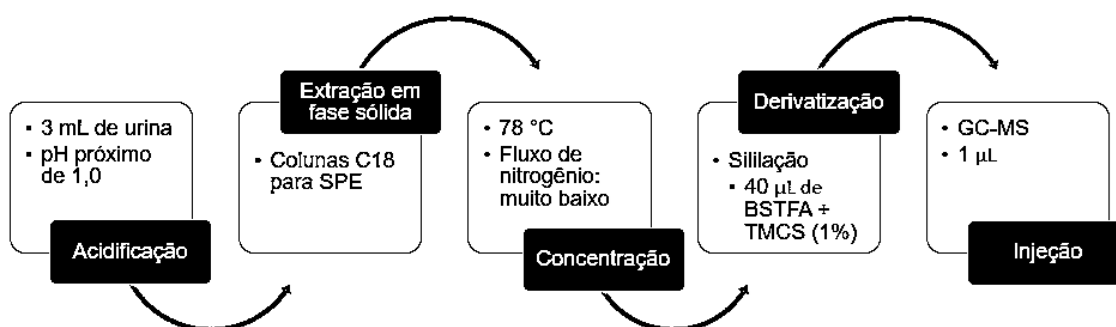
Figura 12 - Esquemática da metodologia utilizada para as análises de AFM utilizando a técnica de LPME.



8.5.3. Extração em Fase Sólida (SPE)

O método utilizado para a extração do AFM na urina por SPE foi baseado no trabalho desenvolvido e validado por MENDES et al., 2017. A **Figura 13** mostra o procedimento de extração em fase sólida.

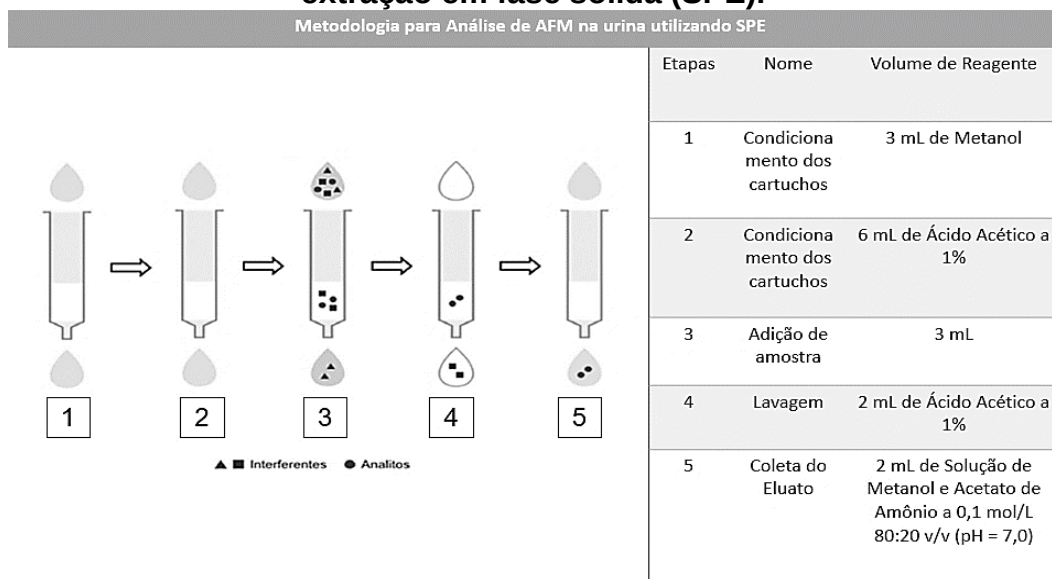
Figura 13 - Representação esquemática do método utilizado para a determinação do AFM na urina.



O método foi desenvolvido utilizando 3,0 mL de urina filtrada em papel filtro e acidificada para pH entre 1 e 2 com Ácido Clorídrico 25%.

Para o procedimento de extração por SPE, foram utilizados cartuchos C18 de 500 mg de fase sólida e capacidade para 3 mL. Os cartuchos foram inicialmente condicionados com 3,0 mL de metanol e 6,0 mL de Ácido Acético a 1%. Após essa etapa, 3,0 mL de urina, acidificados, foram adicionados ao cartucho. A etapa de lavagem foi realizada passando pela coluna 2,0 mL de Ácido Acético a 1%. A eluição dos analitos foi realizada com uma solução de Acetato de Amônio 0,1 mol.L⁻¹ e Metanol na proporção de 2:8 (v/v). A representação esquemática da extração está descrita na **Figura 14**.

Figura 14 - Etapas da extração de Ácido Fenilmercaptúrico utilizando a extração em fase sólida (SPE).



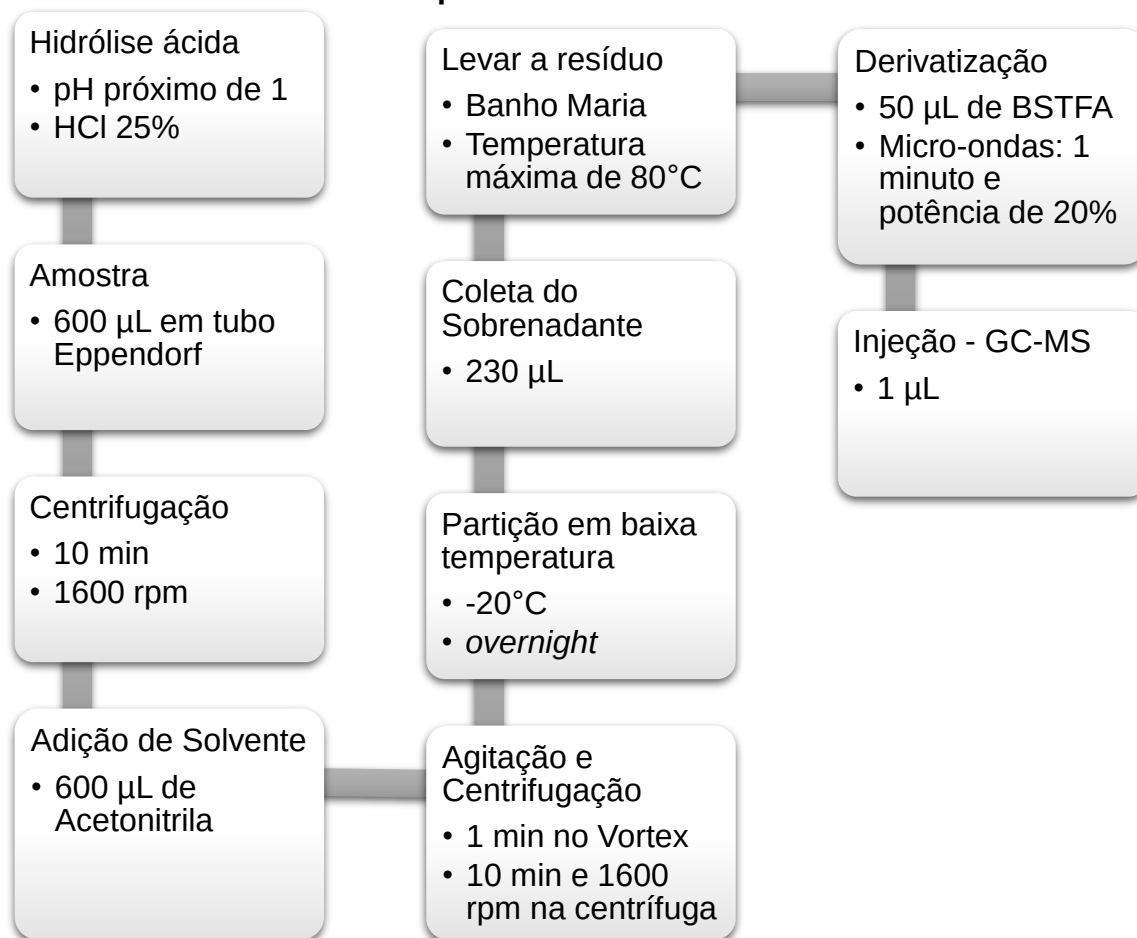
O Eluato foi levado a resíduo utilizando banho de água a 80°C sob baixo fluxo de nitrogênio.

8.5.4. Extração com Partição em Baixa Temperatura (LTPE)

O método utilizado para a extração do AFM por LTPE foi baseado no estudo desenvolvido por Gomes et al., 2017.

A amostra foi previamente filtrada em papel filtro e acidificada com ácido clorídrico a 25% até o pH=1. Em um tubo do tipo *Eppendorf* com capacidade de 2 ml, foram adicionados 600 µL de amostra acidificada e a mesma foi levada a centrifugação por 10 minutos a 1600 rpm. Após a centrifugação, foram adicionados 600 µL de Acetonitrila. A amostra foi submetida a agitação em *Vortex* por 1 minuto e novamente centrifugada nas mesmas condições anterior. As amostras foram deixadas *overnight* a -20°C para a partição. Após o congelamento da fase aquosa, foram coletados 230 µL do sobrenadante, que foi levado a resíduo em banho de água a temperatura e 80°C. Após essa etapa, o resíduo foi ressuspensionado em 50 µL de BSTFA e o extrato submetido a agitação em *Vortex* por 1 min, sonicada por 1 minuto e novamente agitada por 15 segundos. Para a realização da derivatização, a amostra foi transferida para um vial com insert de vidro, que foi aquecida em micro-ondas convencional por 1 minuto na potência de 20%. Após a derivatização, 1 µL dessa amostra foi injetada no GC-MS para análise. A **Figura 15** mostra o fluxograma da técnica de extração.

Figura 15 - Passos para a realização da LTPE para avaliação de Ácido fenilmercaptúrico urinário em GC-MS.



8.6. Figuras de Mérito

Após a padronização do método de extração a ser utilizado (Item 8.5.4), foi feita a validação do método, para garantir os resultados, utilizando o guia da EURACHEM, 2014. As seguintes figuras de mérito foram determinadas, para determinação de AFM por extração com partição em baixa temperatura (LTPE): (a) Linearidade; (b) Precisão; (c) Recuperação; (d) Exatidão; (e) Efeito Matriz; (f) Limite de Detecção e (g) Limite de Quantificação.

8.6.1. Linearidade

Foram feitas as análises de AFM em pool de urina nas concentrações de 5, 10, 20, 30, 40 e 60 µg/L. As análises foram realizadas em triplicata para o procedimento de extração otimizado.

A regressão linear foi calculada utilizando a média das três áreas encontradas para cada concentração. As áreas esperadas e os resíduos, que são a diferença entre a área obtida do experimento e a área calculada, são calculados a partir da equação de regressão gerada.

Para o diagnóstico dos resíduos do modelo, foi realizado o teste de *Ryan-Joiner* para o diagnóstico de normalidade, o teste de *Durbin-Watson* para a avaliação da independência dos resíduos, o teste de *Brown-Forsythe* para análise de Homocedasticidade dos resíduos, além do teste da falta de ajuste, que verifica se o modelo ajustado é realmente linear.

8.6.2. Precisão

Para o estudo da precisão, foram realizadas análises de AFM em pool de urina nas concentrações de 5, 20 e 40 µg/L. Para a determinação da precisão intra-ensaio foram preparadas 3 replicatas que foram analisadas no mesmo dia utilizando as mesmas condições analíticas. A precisão inter-ensaio foi realizada analisando 3 amostras nas concentrações estabelecidas em 3 dias consecutivos.

A formas de expressão da precisão é através do coeficiente de variação (CV%), como mostra a **Equação 1**:

$$\%CV = \frac{Dp \times 100}{CMD} \quad (1)$$

DP é o desvio padrão e CMD é a concentração média determinada.

8.6.3. Exatidão

Para a determinação da exatidão, três concentrações (baixa, intermediária e alta) foram escolhidas e foram analisadas em triplicata. Estas concentrações foram 5, 20 e 40 µg/L. A exatidão foi calculada como porcentagem de recuperação da quantidade de analito adicionado à amostra. A exatidão foi calculada utilizando a **Equação 3**:

$$Exatidão = \frac{Concentração\ Média\ Experimental}{Concentração\ Teórica} \times 100 \quad (2)$$

De acordo com a EURACHEM, 2014 a porcentagem de recuperação e exatidão pode ser determinada pelo cálculo do erro sistemático (**Equação 4**).

$$Erro = \frac{\text{Média das Concentrações Obtidas} - \text{Concentração Teórica}}{\text{Concentração Teórica}} \times 100 \quad (3)$$

8.6.4. Efeito Matriz

Para avaliação do efeito matriz, foi construída uma curva de calibração com amostras de água adicionadas de solução padrão de AFM nas concentrações de 5, 10, 20, 30, 40 e 60 µg/L, em triplicata. Após a realização desse experimento e estabelecimento da regressão linear, a avaliação foi feita comparando-se o paralelismo entre as curvas relativas ao analito extraído em água e ao analito extraído em urina. No teste de paralelismo, foi considerada como hipótese nula as retas possuírem o mesmo coeficiente angular. Por sua vez, foi considerada como hipótese alternativa as retas possuírem coeficientes angulares distintos.

Para o diagnóstico dos resíduos do modelo, foi realizado o teste de normalidade de *Ryan-Joiner*. Já para o teste independência dos resíduos, foi realizado o teste de *Durbin-Watson*. Para o teste de homocedasticidade, por sua vez, foi realizado o teste de *Goldfeld Quandt*.

8.6.5. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Para a determinação do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ), foram realizadas 10 replicatas de pool de urina acrescentado de solução padrão de AFM a 5 µg/L.

Os cálculos do LD e LQ foram realizados utilizando as **Equações 5 e 6**, respectivamente, que estão representadas a seguir.

$$LD = \frac{Dpa \times 3}{IC} \quad (4)$$

$$LQ = \frac{Dpa \times 10}{IC} \quad (5)$$

DPa = desvio padrão e IC = inclinação da curva de calibração de Amostras Biológicas.

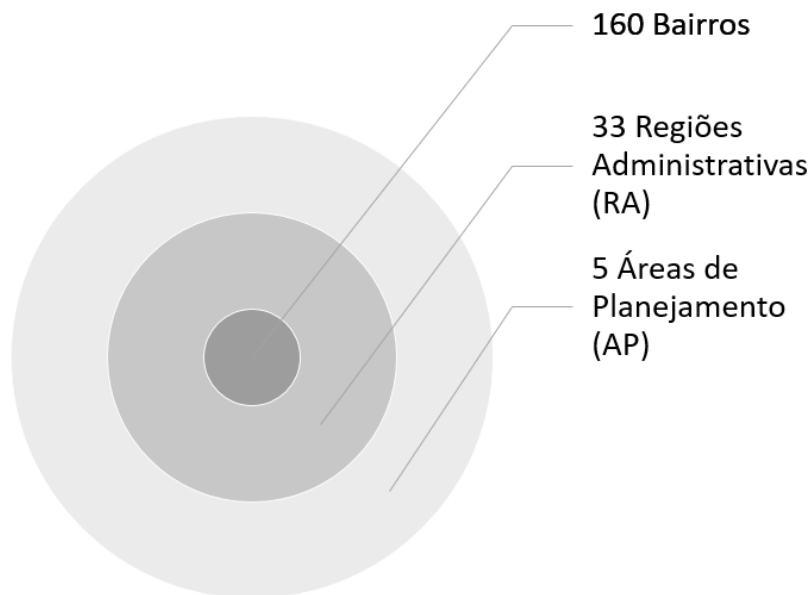
8.7. Amostragem

As amostras de urina foram provenientes de duas populações (a) de indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno trabalhadores de PRC e (b) indivíduos expostos ambientalmente.

8.7.1. Áreas de Estudo

Desde 1981, a cidade do Rio de Janeiro possui uma divisão setorial que, segundo a Secretaria Municipal de Urbanismo (2015), é constituída por cinco áreas de planejamento (AP) e subdivididas por 33 Regiões Administrativas (RA), que são delimitadas por bairros e regiões de favelas (**Figura 16**).

Figura 16 - Representação esquemática da divisão setorial da cidade do Rio de Janeiro.



Fonte: Do autor.

As APs, mais especificamente, são divididas em AP1, que corresponde ao centro e ao bairro Paquetá, AP2, que corresponde à Zona Sul e ao bairro da Tijuca, AP3, correspondente à Zona Norte, AP4, à Barra da Tijuca e Jacarépagua e, por último, AP5, que corresponde à Zona Oeste. A **Figura 17** mostra as áreas de planejamento da cidade do Rio de Janeiro.

Figura 17 - Áreas de Planejamento e suas respectivas áreas.



Fonte: COSTA-AMARAL, 2017

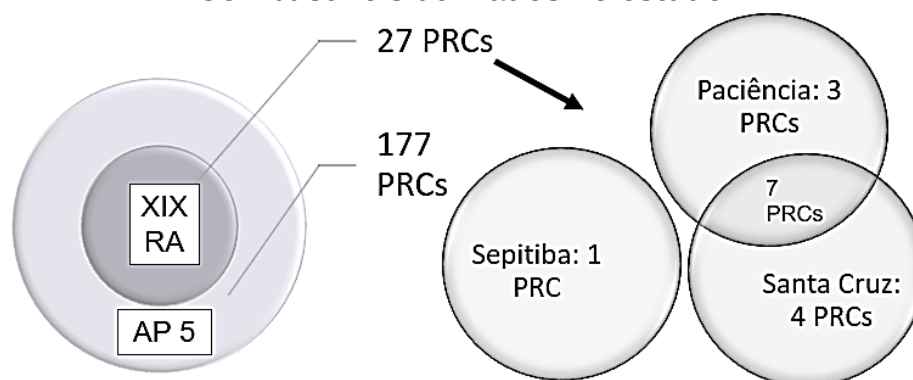
8.7.2. População Ocupacionalmente Exposta ao Benzeno

A Zona Oeste, a qual faz parte da AP5, é subdividida em 5 RAs. Dentre essas, a XIX RA, que corresponde aos bairros Santa Cruz, Paciência e Sepetiba, é a Região Administrativa em que estão localizados os postos de combustíveis em que os trabalhadores expostos foram objetos de estudo deste trabalho. O recrutamento dos trabalhadores foi realizado em parceria com o Sindicato dos Empregados em Postos de Serviço de Combustíveis e Derivados de Petróleo do Estado do Rio de Janeiro (SINPOSPETRO-RJ). Além disso, a seleção dos postos de combustíveis foi realizada juntamente com o recrutamento dos trabalhadores.

Na Área de Planejamento (AP5) e Região Administrativa (XIX RA) em estudo existem, respectivamente, 177 e 27 postos de gasolina. Embora todos estes 27 postos tenham sido convidados a participar do estudo, apenas 7 tiveram participação. Isso ocorreu, uma vez que 5 PRCs estavam desativados e 15 não tiveram o aceite dos proprietários em participar do estudo. De forma mais específica, 3 postos estão localizados no bairro Paciência, 4 no bairro Santa Cruz e 1 localizado em Sepetiba. Contudo, este último foi descartado do estudo, uma vez que o mesmo tem apenas 1 (um) trabalhador e este não usa uniforme de

acordo com as normas estabelecidas para esse tipo de trabalho. Todos esses dados estão esquematizados na **Figura 18**.

Figura 18 - Representação Esquemática dos Postos de Revenda de Combustíveis utilizados no estudo.

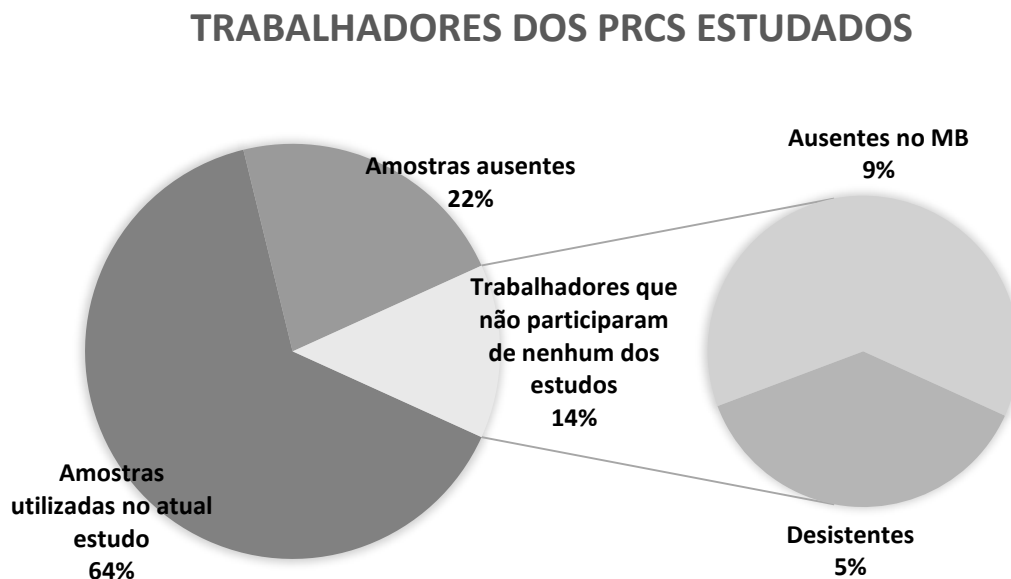


Fonte: Do autor.

Uma vez aceito o convite para participação do trabalho, os trabalhadores assinaram, de forma voluntária, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Como critérios de inclusão, foram utilizados os dados relativos à idade (superior a 18 anos), sexo (ambos), e aceitação ou não em participar do estudo.

Assim como explicado na **Figura 19**, dos 59 trabalhadores dos 7 PRCs utilizados no estudo, houve participação de 51 trabalhadores (86,4%). Isso porque 3 se recusaram a participar e 5 não estavam presentes durante o monitoramento biológico (MB). Uma vez que estas amostras foram usadas em um estudo realizado por Costa-Amaral (2017), o número das mesmas foi reduzido para 38 no atual trabalho. O provável motivo disso, seria a falta de volume para os testes posteriores.

Figura 19 - Gráfico sobre o número total de trabalhadores participantes do estudo.



Fonte: Do autor.

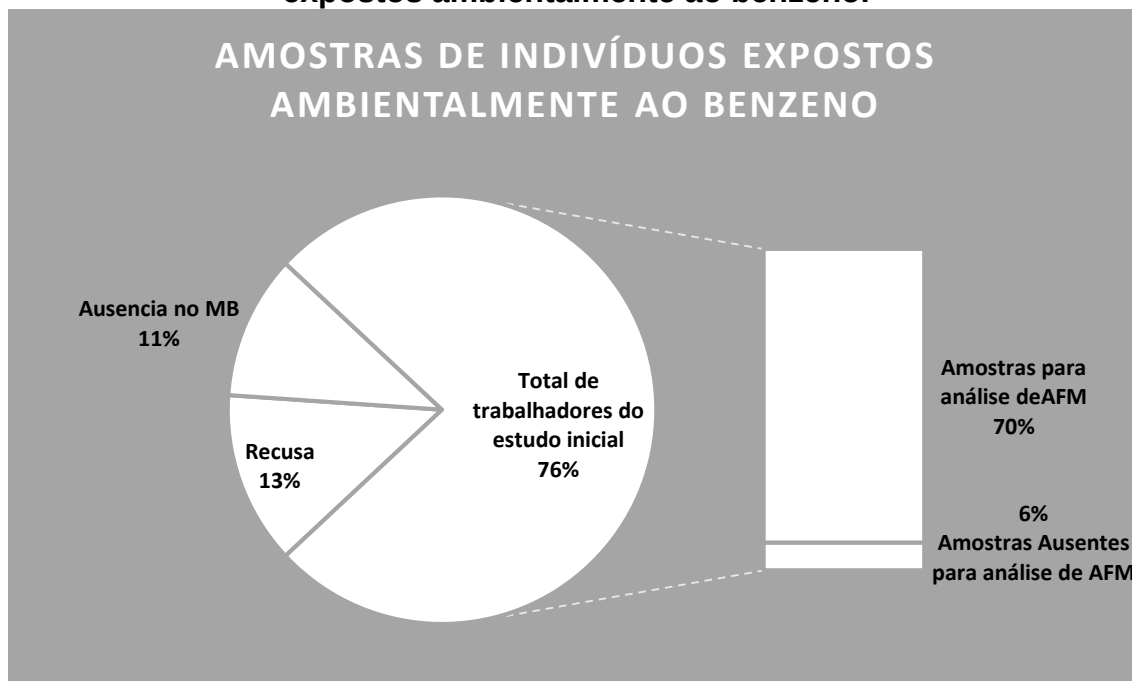
8.7.3. População Ambientalmente Exposta ao Benzeno

A composição dessa população foi de trabalhadores das portarias do Campus – Castelo Mourisco da Fiocruz no Rio de Janeiro, que e está localizada em uma avenida que possui um fluxo muito alto de veículos em geral. Somado a esse fato, o local é, ainda, próximo a uma refinaria de petróleo. Dessa forma, o Campus torna-se um local considerado de potencial exposição ambiental ao benzeno.

Segundo a DIRAC/Fiocruz, que terceiriza o serviço dos indivíduos em questão, são 46 trabalhadores nas 6 portarias do Campus. A jornada de trabalho dos mesmos foi caracterizada por turnos de 12h.

Todos esses trabalhadores foram convidados a participar do estudo, nas mesmas condições que os trabalhadores do estudo de exposição ocupacional (Item 8.7.2). Contudo, 6 se recusaram a participar do estudo e 5 não compareceram ao trabalho no dia da coleta de amostra para a monitorização biológica. Dessa forma, 35 trabalhadores participaram da pesquisa. Para o estudo foram feitas as análises de AFM na urina de 32 voluntários (**Figura 20**).

Figura 20 - Amostras utilizadas na análise de AFM em trabalhadores expostos ambientalmente ao benzeno.



Fonte: Do autor.

8.7.4. Análise do AFM nas Amostras de Urina

A análise do AFM foi realizada de acordo com o método de extração e identificação validado descrito no Item 8.8.4. Todas as amostras foram submetidas à correção pelos valores da creatinina de cada amostra, tendo em vista que a quantidade de metabólitos excretados pode ser alterada em amostras de urina que sejam muito concentradas ou muito diluídas. Considera-se que amostras com valores de creatinina abaixo de 3,0 g/L e acima de 0,5 g/L estão dentro da faixa aceitável (ACGIH, 2018). Dessa forma, para a análise do AFM foram consideradas somente as amostras nessa faixa de concentração da creatinina.

8.7.5. Análise Estatística dos resultados do AFM urinário

Os resultados das análises do AFM na urina foram submetidos a alguns testes estatísticos, somente referentes à população dos indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno.

Inicialmente, foi realizada uma análise estatística descritiva. Posteriormente, foi realizado o teste de normalidade de *Anderson-Darling*. Foram testadas, dessa forma, a hipótese nula, em que o AFM tem distribuição

normal na população e a hipótese alternativa, em que o AFM não tem distribuição normal na população.

Foi realizado, também, o teste de *Mann-Whitney*. Para isso, considerou-se a concentração de AFM na urina como variável resposta e o gênero como co-variável. Considerou-se, ainda, como hipótese nula que os valores de AFM eram iguais entre os sexos e como hipótese alternativa que esses valores não eram iguais entre os sexos.

9. RESULTADOS

9.1. Otimização das Condições do Sistema Cromatográfico

As **Figuras 21** e **22** mostram os tempos de retenção referentes ao AFM nas duas condições cromatográficas estudadas.

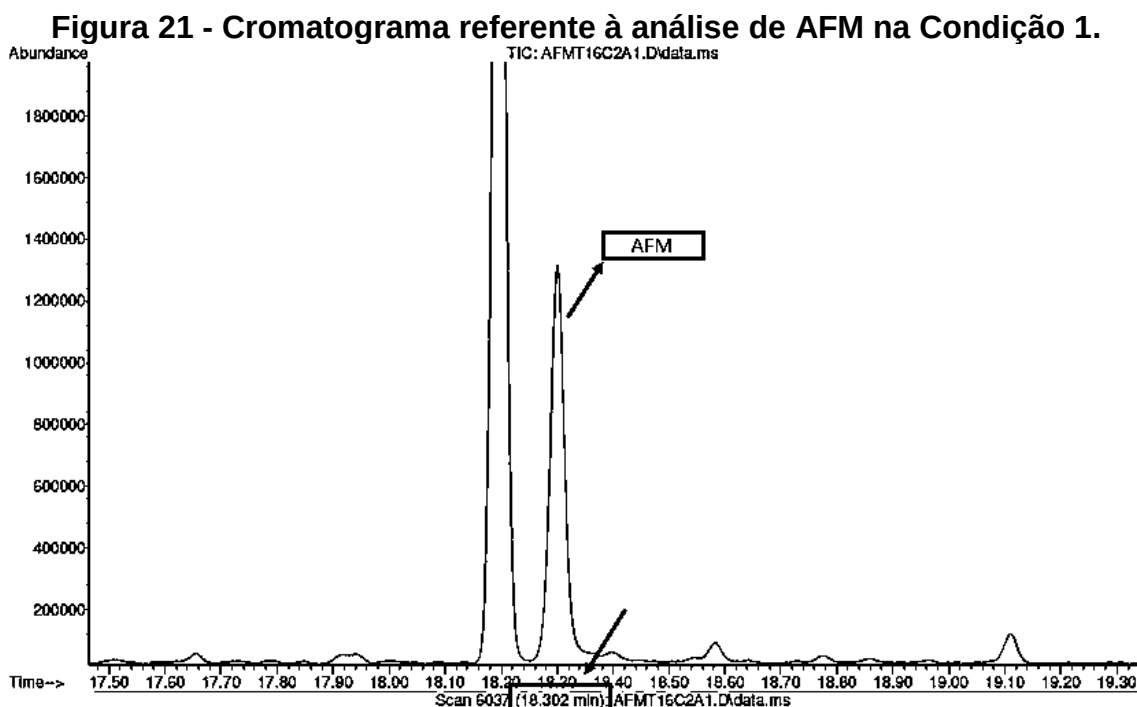
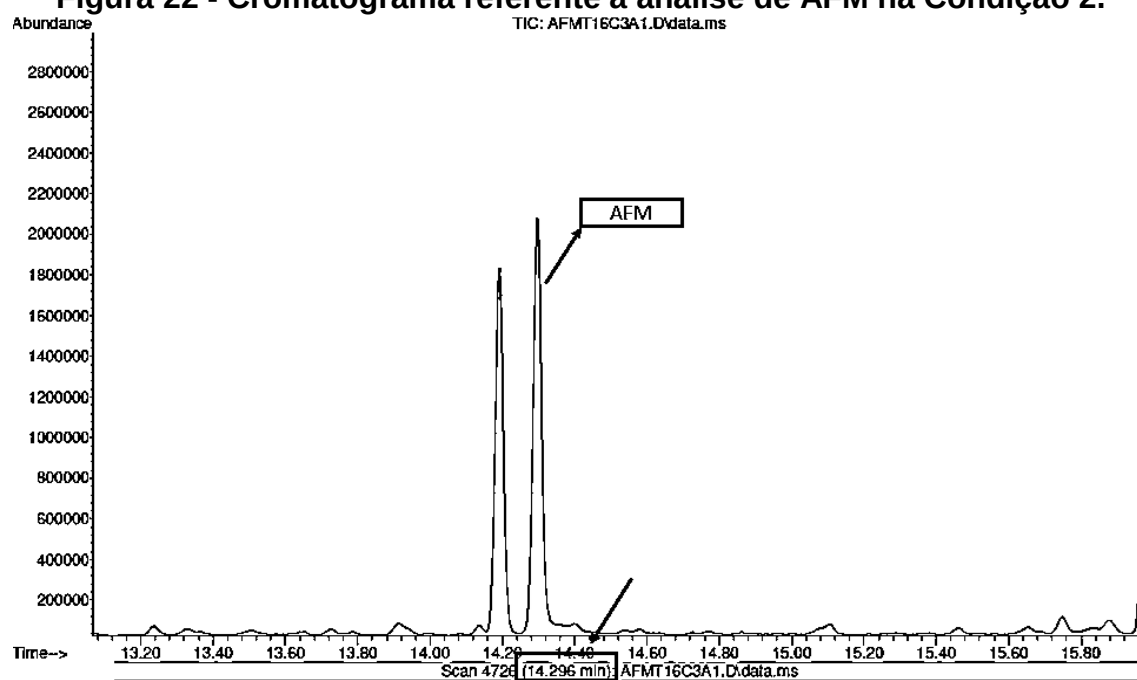


Figura 22 - Cromatograma referente à análise de AFM na Condição 2.

A **Tabela 11** faz a relação entre as áreas dos picos e tempo de retenção do AFM nas duas condições utilizadas.

Tabela 11 - Comparação entre as áreas e tempos de retenção do AFM entre as duas Condições estudadas.

AFM		
Condição 1	Área do Pico	Tempo de Retenção
	41.553.349	18,302
Condição 2	Área do Pico	Tempo de Retenção
	49.466.638	14,296

9.2. Derivatização

As **Figuras 23 e 24** são cromatogramas referentes ao AFM posterior à reação de derivatização com MSTFA e com BSTFA, respectivamente, nas duas Condições testadas.

Figura 23 - Gráficos de Cromatografia e Espectrometria referentes à análise de AFM derivatizado com MSTFA nas condições 1(a) e 2(b).

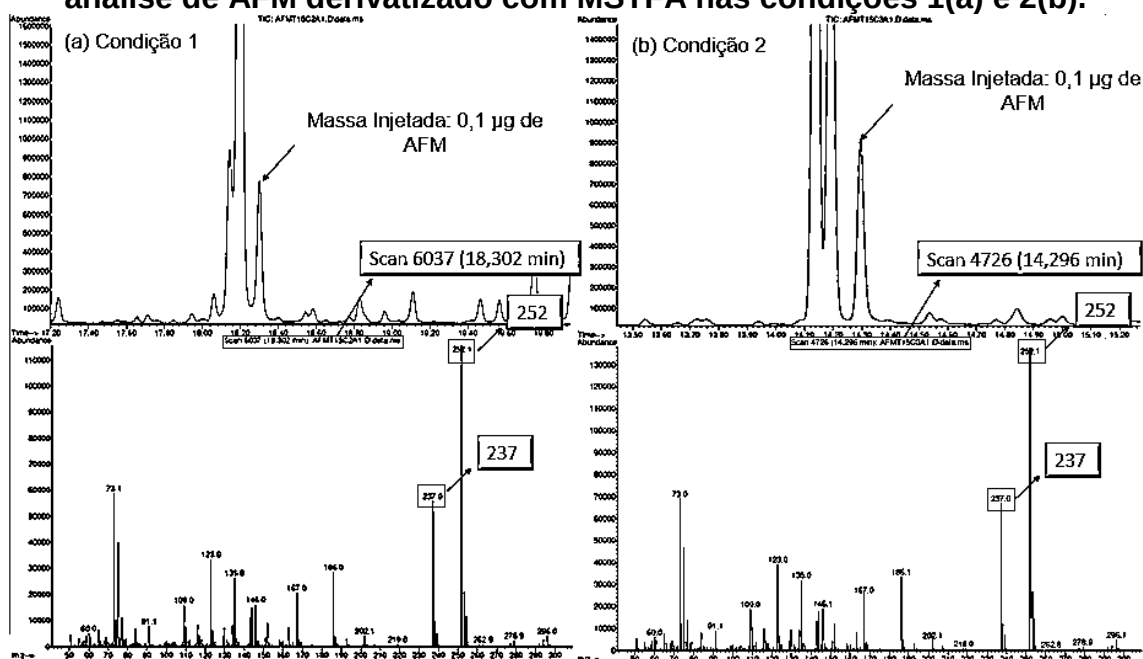
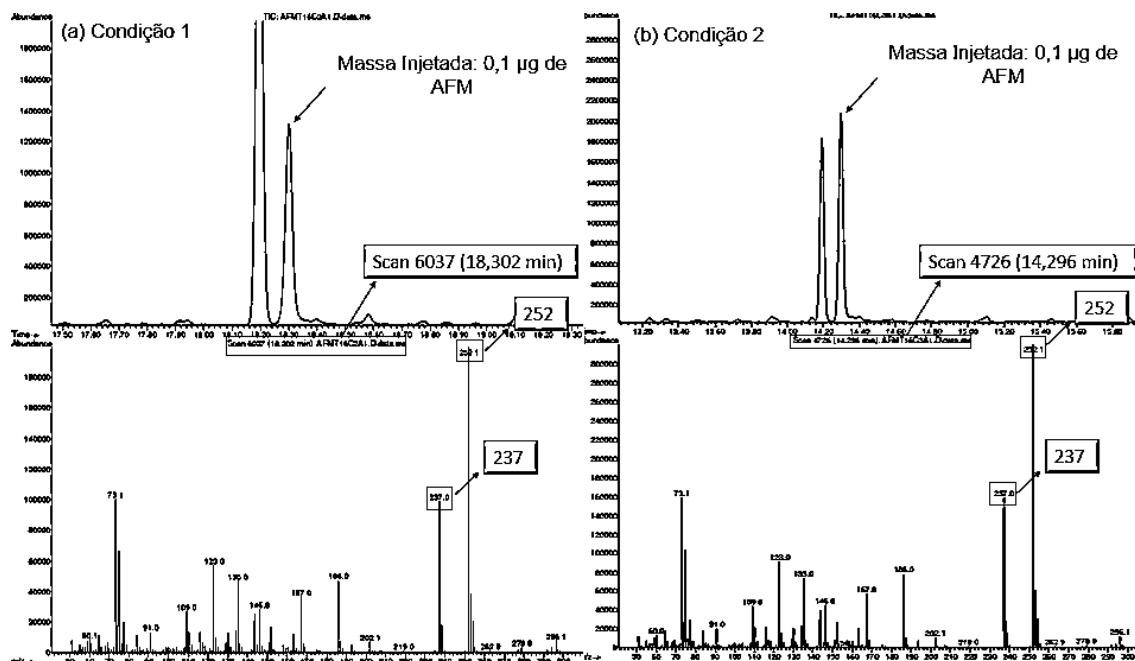


Figura 24 - Gráficos de Cromatografia e Espectrometria referentes à análise de AFM derivatizado com BSTFA nas condições 1(a) e 2(b).



A **Tabela 12** é uma comparação das áreas dos picos e tempos de retenção do AFM posterior à reação de derivatização com MSTFA e com BSTFA nas duas Condições testadas.

Tabela 12 - Comparação entre a análise de AFM derivatizado com MSTFA e com BSTFA.

	Condição 1		Condição 2	
MSTFA	Área do Pico	Tempo de Retenção	Área do Pico	Tempo de Retenção
	11.813.780	18,302	14.287.725	14,296
BSTFA	Área do Pico	Tempo de Retenção	Área do Pico	Tempo de Retenção
	22.390.335	18,302	32.250.808	14,296

A **Tabela 13** mostra os resultados referentes à análise geral do Experimento Fatorial sem réplica.

Tabela 13 - Resultado da aAálise de Experimentos sem Réplicas.

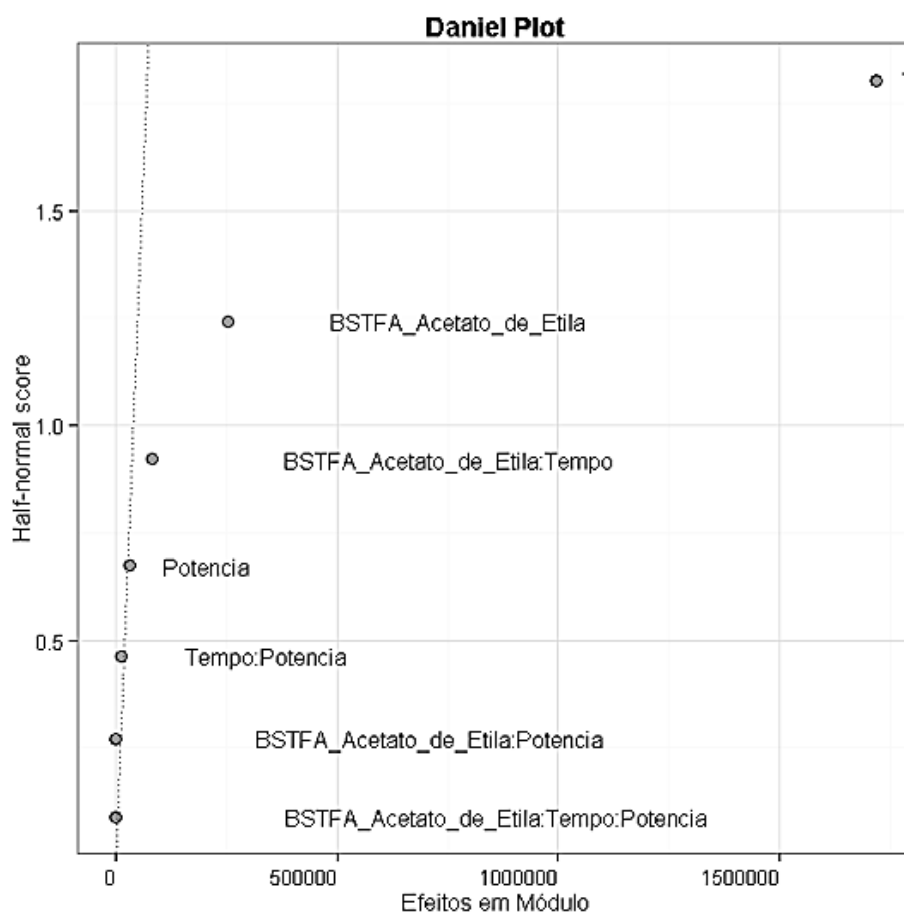
<i>Análise de Experimento sem Réplica</i>						
	<i>Efeitos</i>	<i>Estimativa</i>	<i>Limite Inferior</i>	<i>Limite Superior</i>	<i>Estatística t</i>	<i>P-valor</i>
Intercepto		-2585999				
BSTFA_Acetato_de_Etila	254260,18	127130,09	178564,61	329955,75	12,64	0,00
Tempo	1717560,00	858780,00	1641864,43	1793255,57	85,41	0,00
Potencia	30440,14	15220,07	-45255,43	106135,71	1,51	0,25
BSTFA_Acetato_de_Etila:Tempo	-82910,76	-41455,38	-158606,33	-7215,19	4,12	0,04
BSTFA_Acetato_de_Etila:Potencia	-1387,60	-693,80	-77083,17	74307,97	0,07	0,95
Tempo:Potencia	-13406,50	-6703,25	-89102,07	62289,07	0,67	0,56
BSTFA_Acetato_de_Etila:Tempo:Potencia	604,54	302,27	-75091,03	76300,12	0,03	0,98

Na **Tabela 14** e **Figura 25** estão presentes os valores de Half-Normal e o Gráfico de Daniel, respectivamente, com os dados referentes aos testes de derivatização.

Tabela 14 - Resultados dos Valores de Half normal.

<i>Análise de Experimento sem Réplica</i>		
	<i>Efeitos em Módulo</i>	<i>Half-normal score</i>
BSTFA_Acetato_de_Etila	254260,18	1,24
Tempo	1717560,00	1,80
Potencia	30440,14	0,67
BSTFA_Acetato_de_Etila:Tempo	82910,76	0,92
BSTFA_Acetato_de_Etila:Potencia	1387,60	0,27
Tempo:Potencia	13406,50	0,46
BSTFA_Acetato_de_Etila:Tempo:Potencia	604,54	0,09

Figura 25 - Gráfico de papel de probabilidade Half-normal (Daniel Plot).



A **Tabela 15** apresenta os valores de referência para a construção do Gráfico dos efeitos pelo método de Lenth (**Figura 26**).

Tabela 15 - Valores de Referência para a Análise do Gráfico dos Efeitos pelo Método de Lenth.

<i>Análise de Experimento sem Réplica</i>				
<i>alpha</i>	<i>PSE</i>	<i>ME</i>	<i>SME</i>	<i>t.crit</i>
0,05	20109,75	75695,57	181154,80	3,76

Legenda:

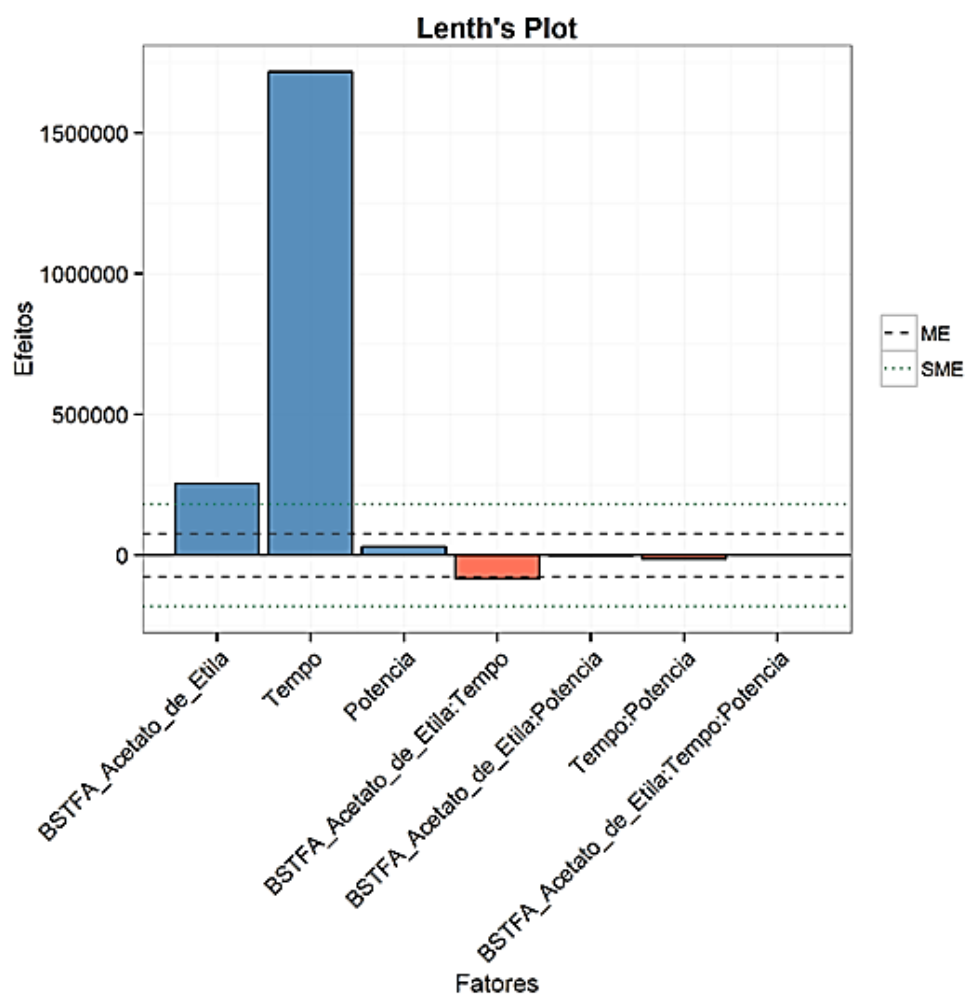
Alpha: Limite de significância dos experimentos

PSE: Pseudo Erro Padrão

ME: Margem de Erro dos contrastes

SME: Margem de Erro Simultânea

Figura 26 - Gráfico dos efeitos testados pelo método de Lenth.



A **Tabela 16** é a matriz do planejamento fatorial utilizado para os testes relativos à derivatização com a demonstração do teste escolhido.

Tabela 16 - Experimento de escolha para os testes de derivatização com a área do pico correspondente.

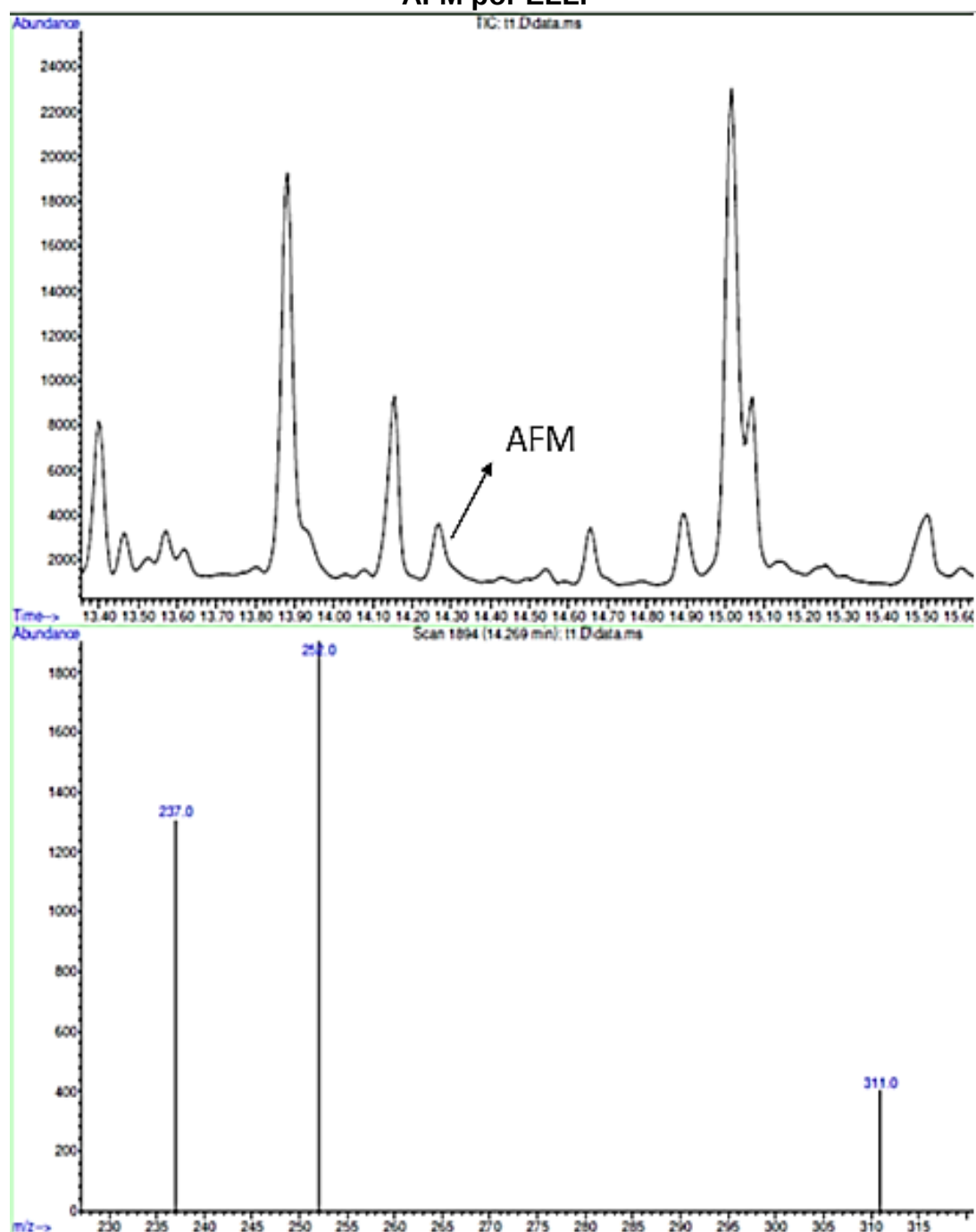
Experimentos	Efeitos Principais			Efeitos de Interação				Área dos Picos
	Fator 1: BSTFA/Acetato de Etila	Fator 2: Tempo	Fator 3: Potência	12	13	23	123	
1	-	-	+	+	-	-	+	34.313
2	-	+	+	-	-	+	-	1563
3	+	-	+	-	+	-	-	1.199.668
4	+	+	+	+	-	-	-	355.063
5	-	-	-	+	+	+	-	0
6	-	+	-	-	+	-	+	33.032
7	+	-	-	-	-	+	+	1.556.883
8	+	+	-	+	-	-	-	173.517

9.3. Técnicas de Extração

9.3.1. Extração Líquido-Líquido (ELL)

A **Figura 27** é um cromatograma da análise de AFM (25 µg/L) por GC-MS utilizando a extração líquido-líquido.

Figura 27 - Gráficos de Cromatografia e Espectrometria para a Análise de AFM por ELL.



9.3.2. Microextração em Fase Líquida (LPME)

As **Figuras 28 e 29** são cromatogramas da análise de AFM (50 µg/L e 500 µg/L) por GC-MS utilizando a LPME.

Figura 28 - Gráficos de Cromatografia e Espectrometria para a Análise de AFM por LPME em Alta Concentração.

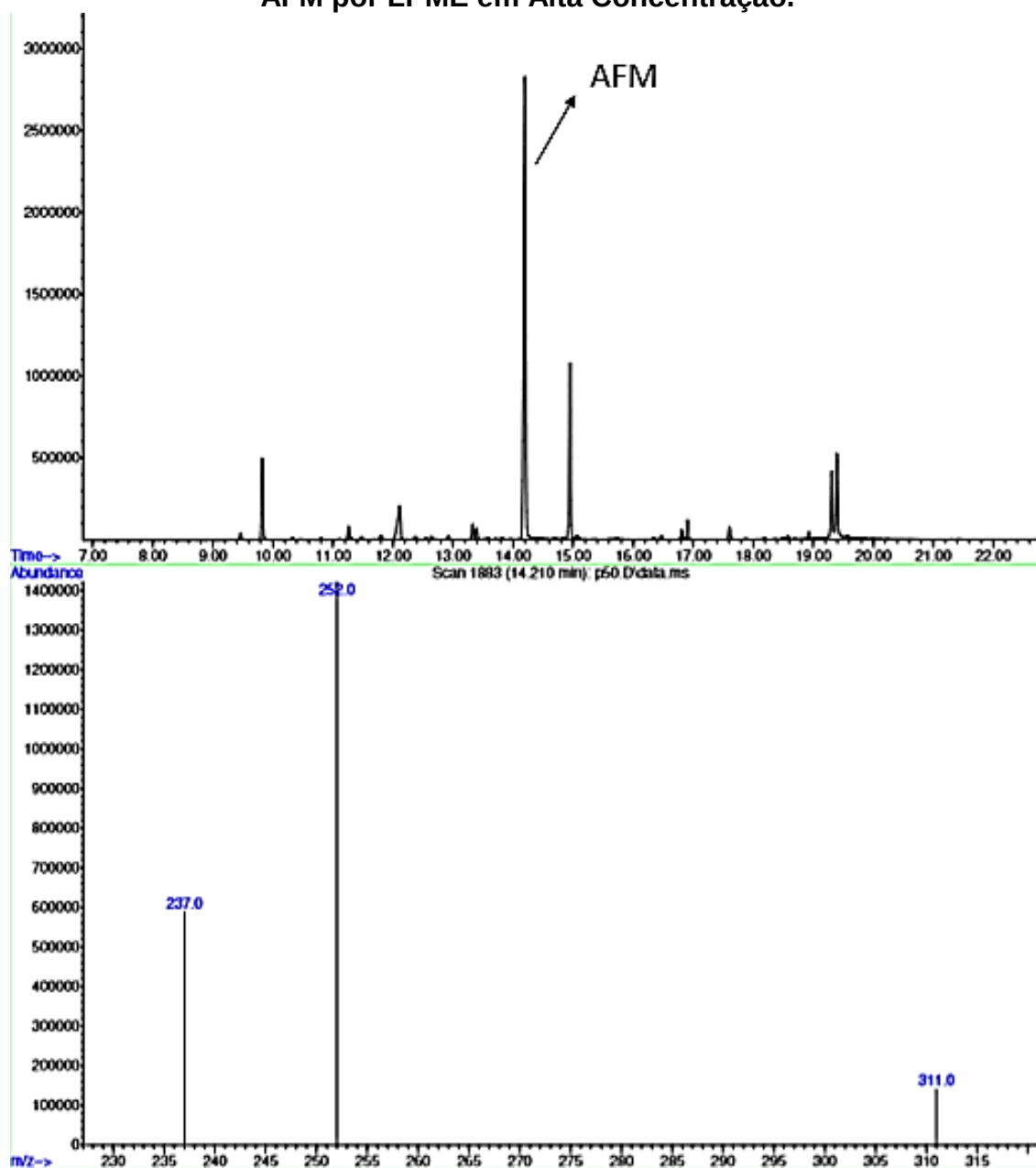
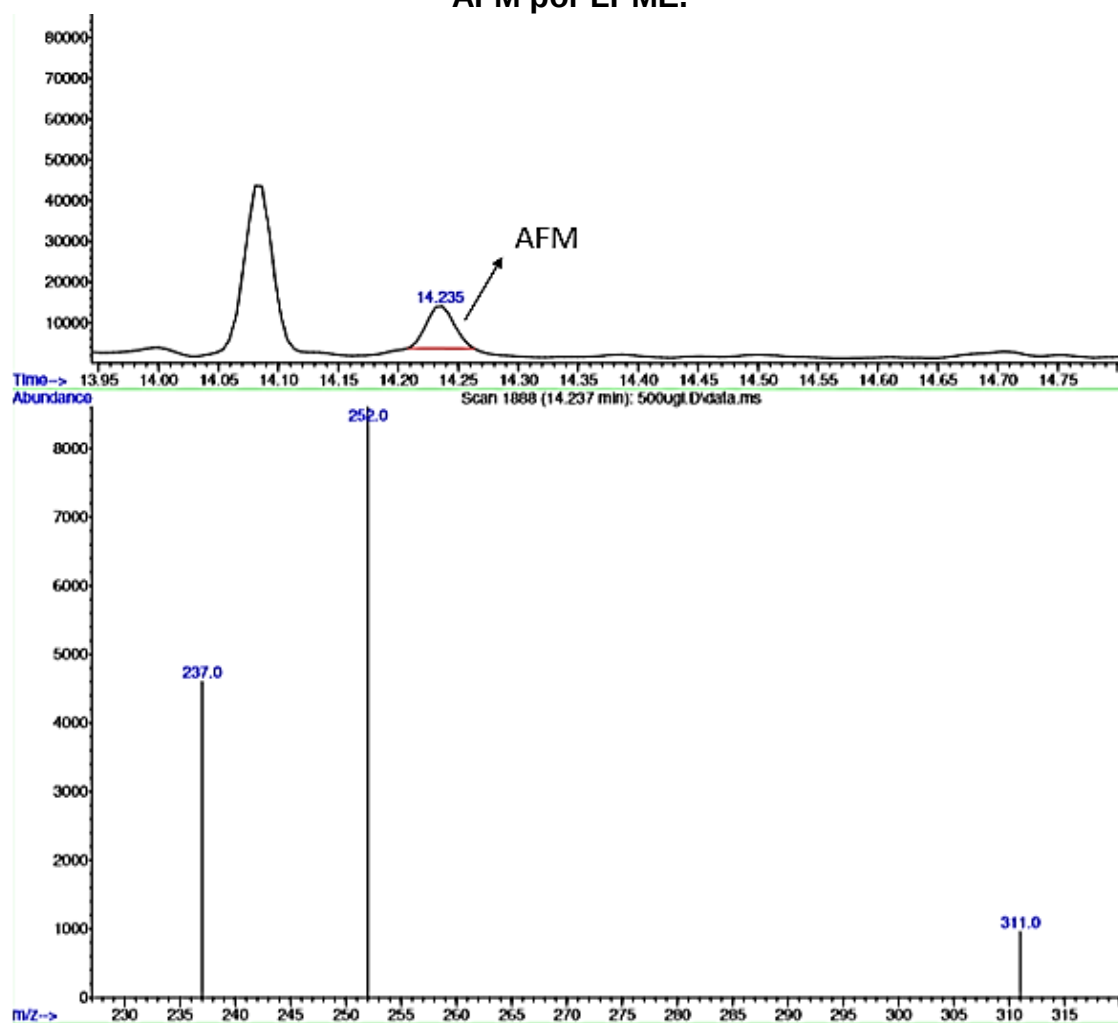


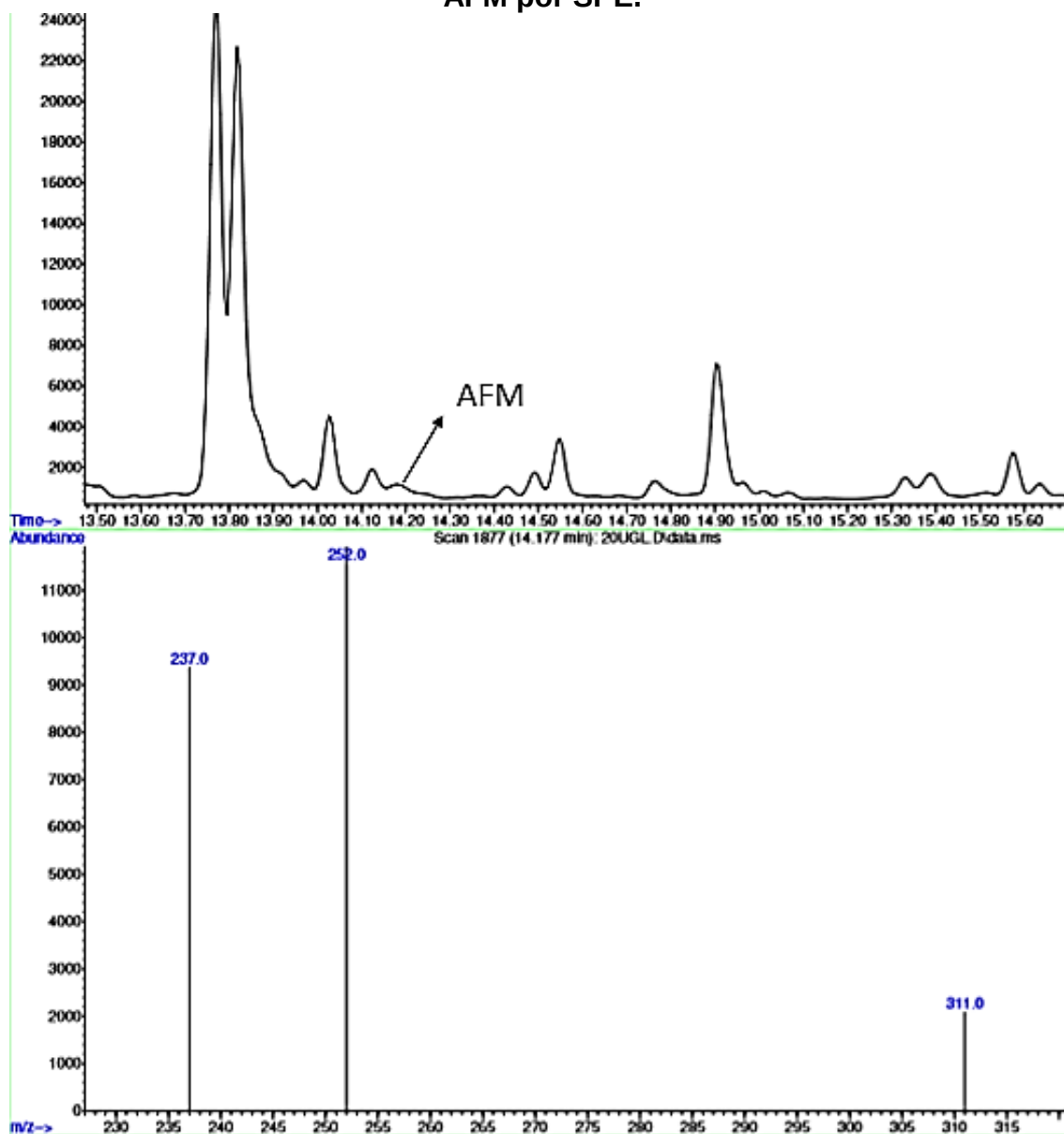
Figura 29 - Gráficos de Cromatografia e Espectrometria para a Análise de AFM por LPME.



9.3.3. Extração em Fase Sólida (SPE)

A **Figura 30** é um cromatograma da análise de AFM (0,5 µg/L) por GC-MS utilizando a SPE.

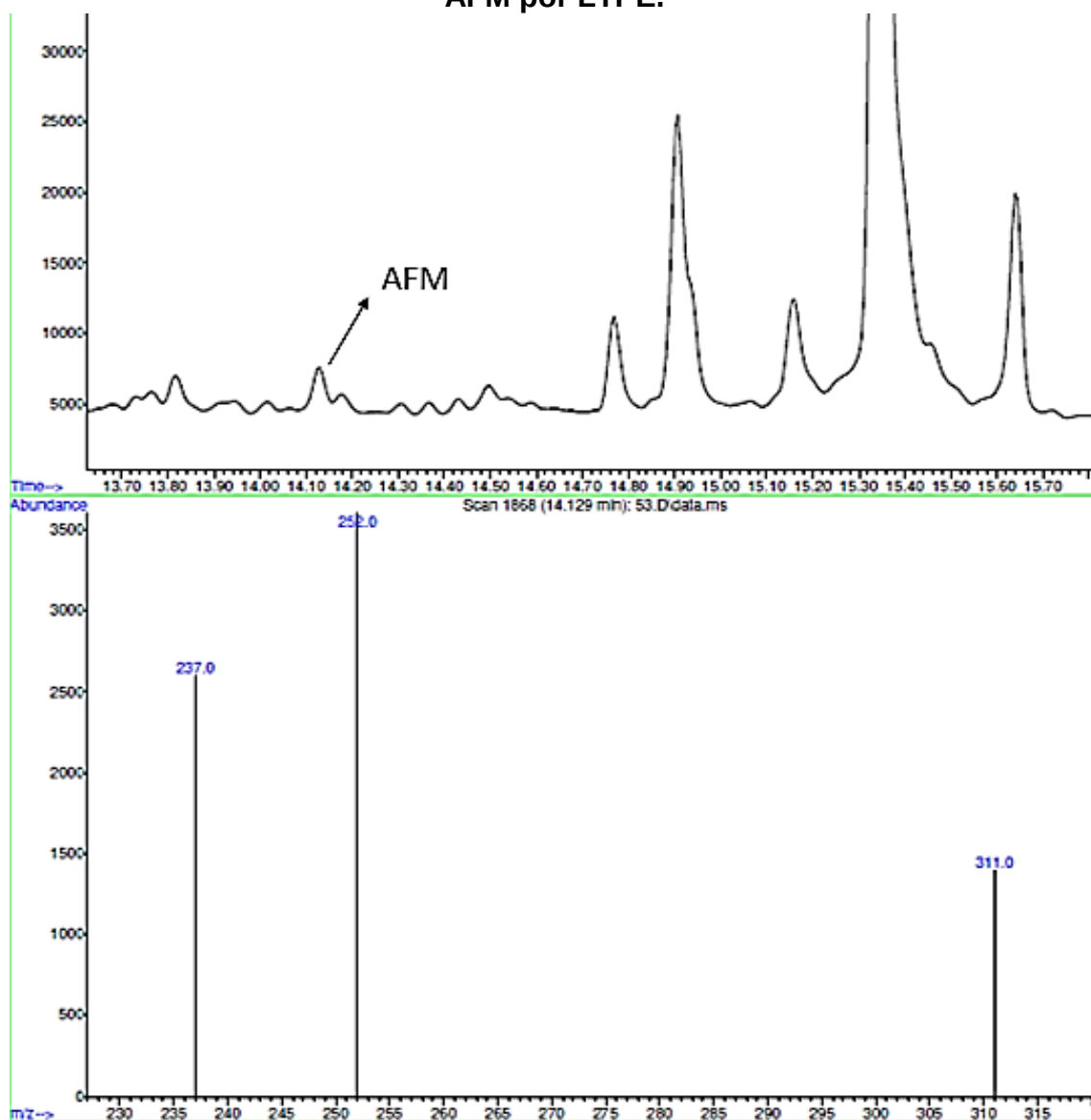
Figura 30 - Gráficos de Cromatografia e Espectrometria para a Análise de AFM por SPE.



9.3.4. Extração com Partição em Baixa Temperatura (LTPE)

A **Figura 31** é um cromatograma da análise de AFM (5 µg/L) por GC-MS utilizando a LTPE.

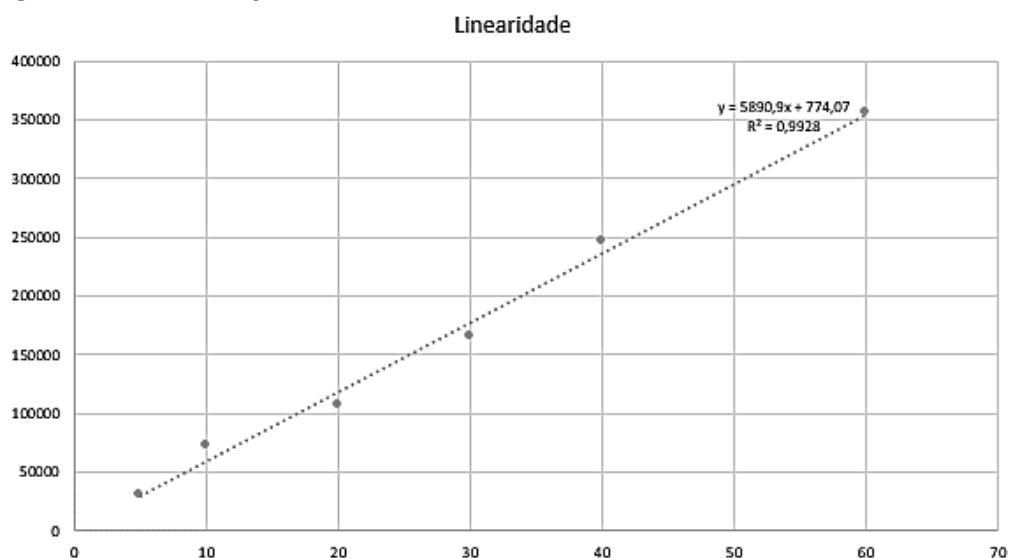
Figura 31 - Gráficos de Cromatografia e Espectrometria para a Análise de AFM por LTPE.



9.4. Figuras de Mérito

9.4.1. Linearidade

Os valores das médias das áreas encontradas para cada concentração foram plotados em um gráfico do tipo dispersão (Figura 32).

Figura 32 - Avaliação da Linearidade do AFM urinário utilizando LTPE.

Os dados obtidos na curva acima foram ajustados ao modelo de Regressão Linear Simples e, dessa forma, foi obtida a **Equação 7**:

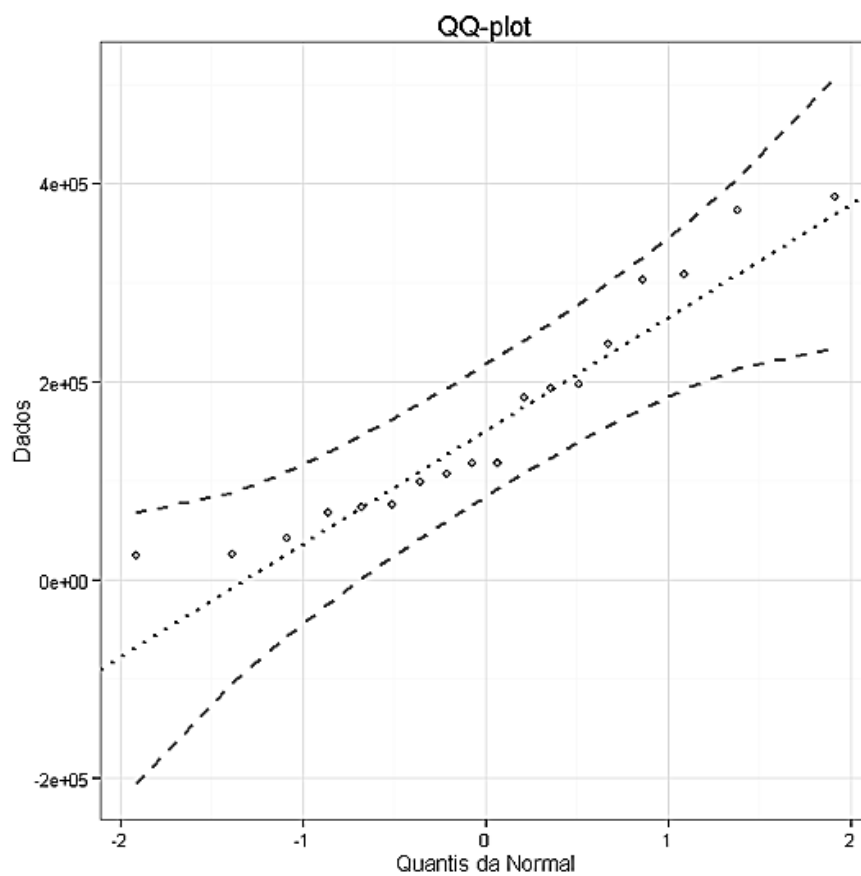
$$\text{Área} = 774,07 + 5890,9 * x \quad (6)$$

A **Tabela 17** e a **Figura 33** são resultados do teste de normalidade de Ryan-Joiner.

Tabela 17 - Resultado do teste de Normalidade de Resíduos através do modelo Ryan-Joiner.

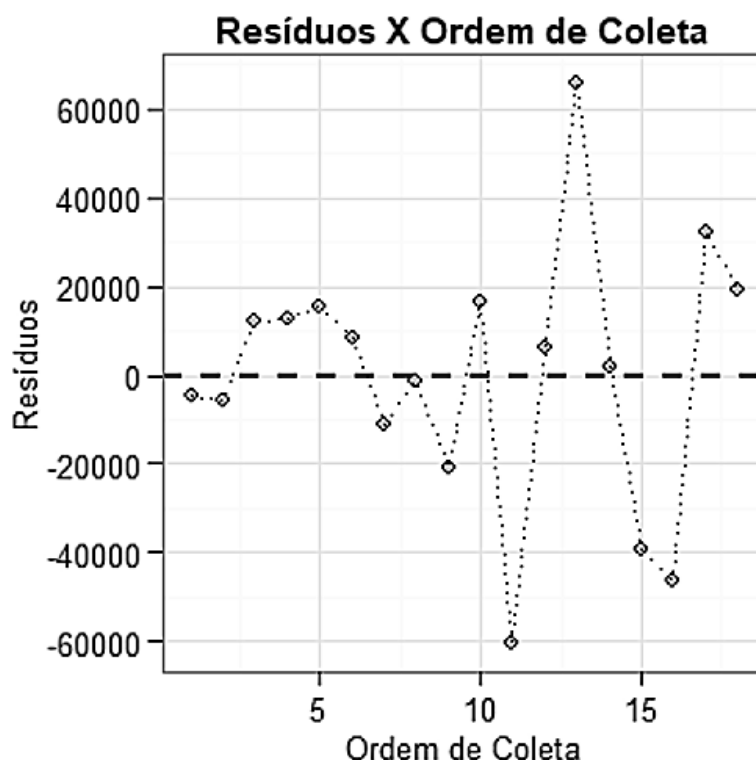
<i>Testes de Normalidade</i>		
<i>Testes</i>	<i>Estatísticas</i>	<i>P-valores</i>
Ryan – Joiner	0,96	0,11

Figura 33 - Gráfico QQ-Plot para a verificação da normalidade dos dados.



A **Figura 34** é um gráfico de Resíduos x Ordem de Coleta para avaliação da independência dos resíduos.

Figura 34 - Gráfico dos resíduos versus a ordem de coleta dos dados para avaliação da hipótese de independência dos dados.



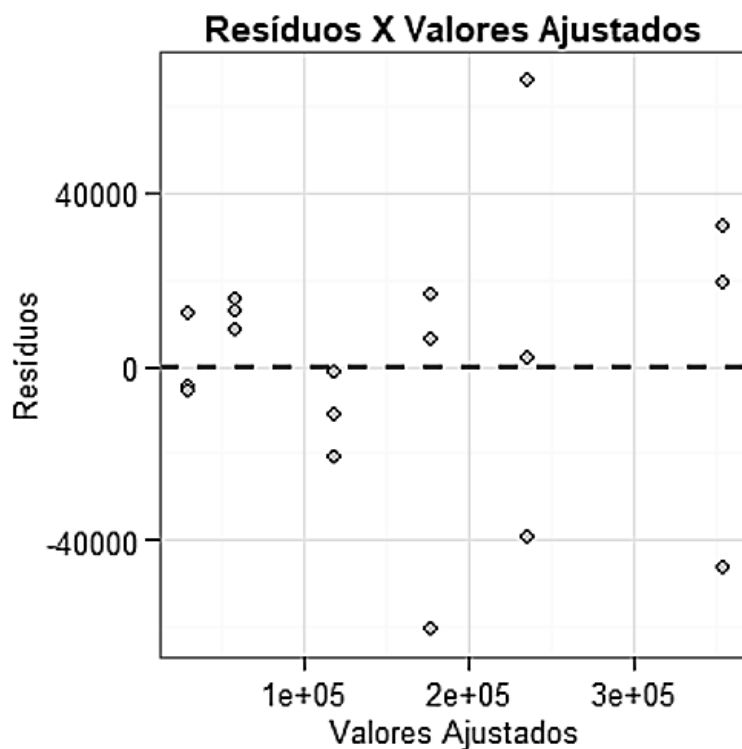
A **Tabela 18** apresenta o resultado do teste de independência utilizando o método *Durbin-Watson*.

Tabela 18 - Resultado do Teste de Independência utilizando o método Durbin-Watson.

<i>Teste de Independência - Durbin-Watson</i>	
<i>Estatística</i>	<i>P-valor</i>
1,96	0,36

A **Figura 35** é um gráfico dos resíduos versus valores ajustados, para verificação da homocedasticidade do modelo.

Figura 35 - Gráfico dos resíduos versus valores ajustados, para verificação da homocedasticidade do modelo.



A **Tabela 19** apresenta os dados da avaliação da homocedasticidade pelo teste de *Brown-Forsythe*.

Tabela 19 - Resultado da Avaliação da Homocedasticidade pelo teste de Brown-Forsythe.

<i>Teste de Homocedasticidade - Brown Forsythe</i>				
	<i>Estatística</i>	<i>G.L.Num.</i>	<i>G.L.Den.</i>	<i>P-valor</i>
Concentração	0,92	5	12	0,50

A **Tabela 20** mostra os resultados referentes ao teste de Falta de Ajuste.

Tabela 20 - Resultado do Teste de Falta de Ajuste (Lack of Fit).

<i>Teste de Falta de Ajuste</i>					
	<i>GL</i>	<i>Soma de Quadrados</i>	<i>Quadrado Médio</i>	<i>Estat. F</i>	<i>P-valor</i>
Concentração	1	2,17E+11	2,17E+11	2,01E+02	7,35E-09
Resíduos	16	1,45E+10	9,09E+08		
Falta de Ajuste	4	1,58E+09	3,94E+08	3,65E-01	8,30E-01
Erro Puro	12	1,30E+10	1,08E+09		

9.4.2. Precisão

O resultado dos testes de precisão inter e intra-ensaio para o método estão na **Tabela 21**.

Tabela 21 - Resultado dos Valores das precisões Intra-ensaio e Inter-ensaio.

Concentração	Inter-ensaio			Intra-ensaio		
	Média	Desvio Padrão	%CV	Média	Desvio Padrão	%CV
5 µg/L	24647,17	1873,63	7,60	24944,00	724,08	2,90
20µg/L	110199,00	4526,29	4,10	112153,00	6867,42	6,10
40µg/L	194994,83	27969,11	14,30	196236,00	3767,47	1,90

9.4.3. Exatidão

A **Tabela 22** apresenta os resultados de exatidão das concentrações de 5, 10 e 40 µg/L.

Tabela 22 - Resultados dos Valores Relacionados à Exatidão do Método.

Concentração Teórica	Média das Concentrações Obtidas	Erro Sistemático	Exatidão
5 µg/L	5,081	1,63	101,63
20 µg/L	18,11	-9,47	90,53
40 µg/L	41,60	4,01	104,01

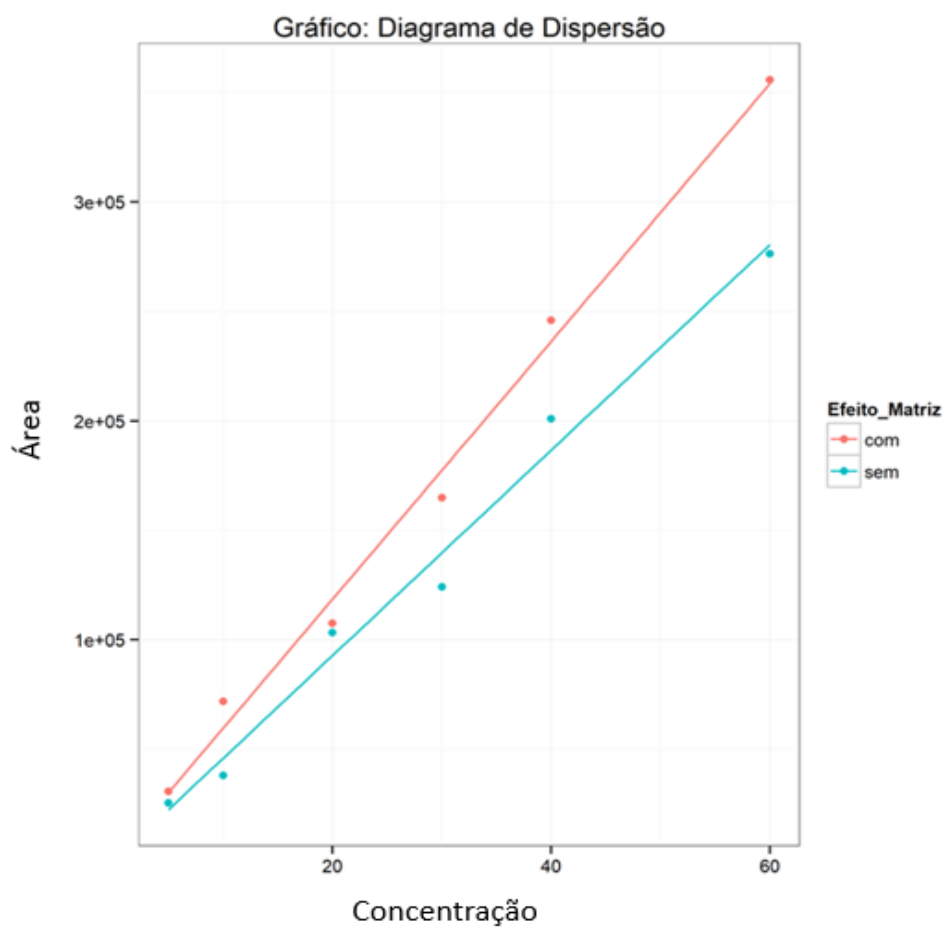
9.4.4. Efeito Matriz

A **Tabela 23** e a **Figura 36** mostram o resultado do teste de paralelismo entre as curvas.

Tabela 23 - Resultado dos Testes de Comparação Entre as Curvas.

Testes de Comparação				
	G.L.	Soma de Quadrados	Estat. F	P-valor
Paralelismo	1	4491368270	6,07	0,01

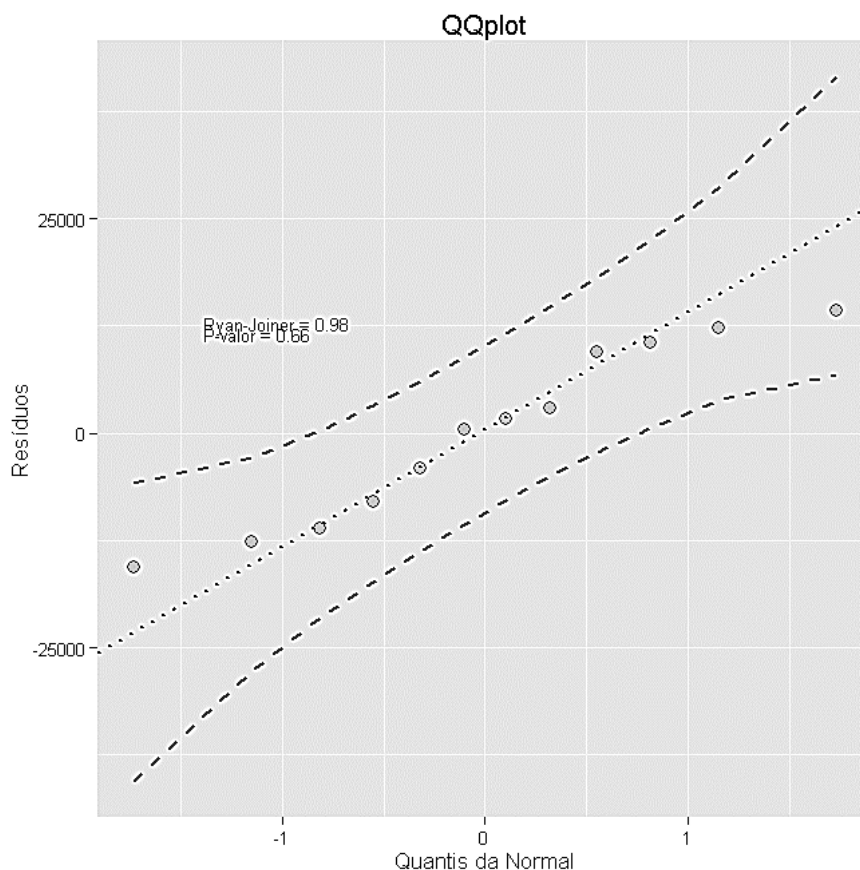
Figura 36 - Gráfico de Dispersão para comparação entre as curvas relativas ao AFM em urina e AFM em água.



O resultado do Teste de Normalidade de *Ryan-Joiner* é demonstrado pela **Tabela 24** e pela **Figura 37**.

Tabela 24 - Resultado do Teste de Normalidade para o efeito de matriz.

Teste de Normalidade		
	Estatística	P-valor
Ryan-Joiner	0,97	0,66

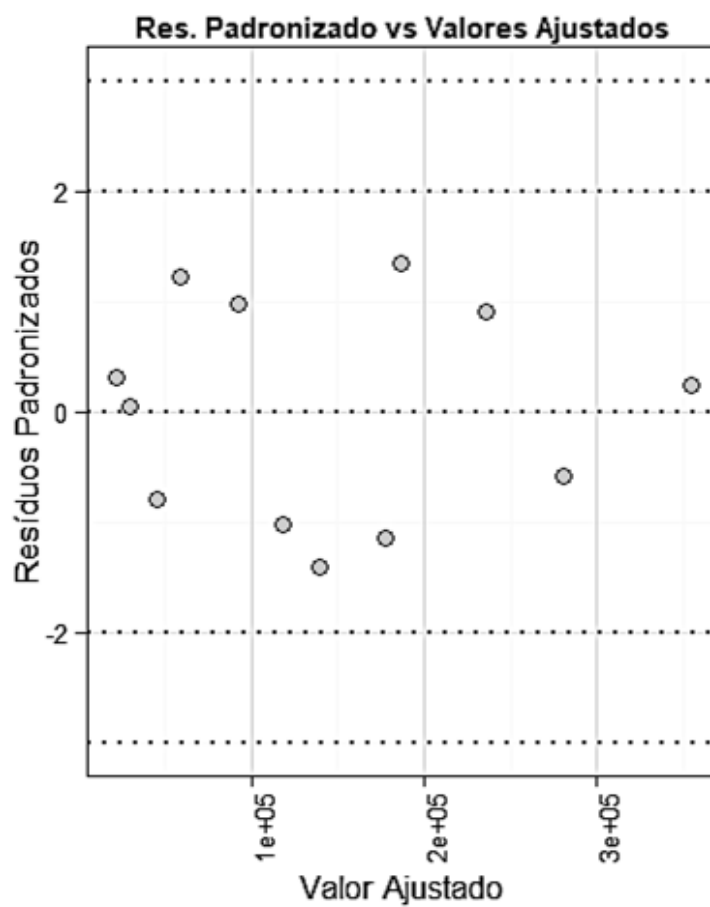
Figura 37 - Gráfico para o teste de normalidade utilizando o teste de Ryan-Joiner.

A **Tabela 25** mostra os resultados do teste de homocedasticidade de *Goldfeld-Quandt* e a **Figura 38** é um gráfico de Resíduos x Valores Ajustados para avaliação da presença de homocedasticidade.

Tabela 25 - Resultados para o teste de Homocedasticidade.

Teste de Homocedasticidade - Goldfeld Quandt				
Variável	Estatística	GL1	GL2	P-valor
Efeito_Matriz	0,89	11	10	0,90

Figura 38 - Gráfico de Resíduos x Valores Ajustados para a análise de homocedasticidade.

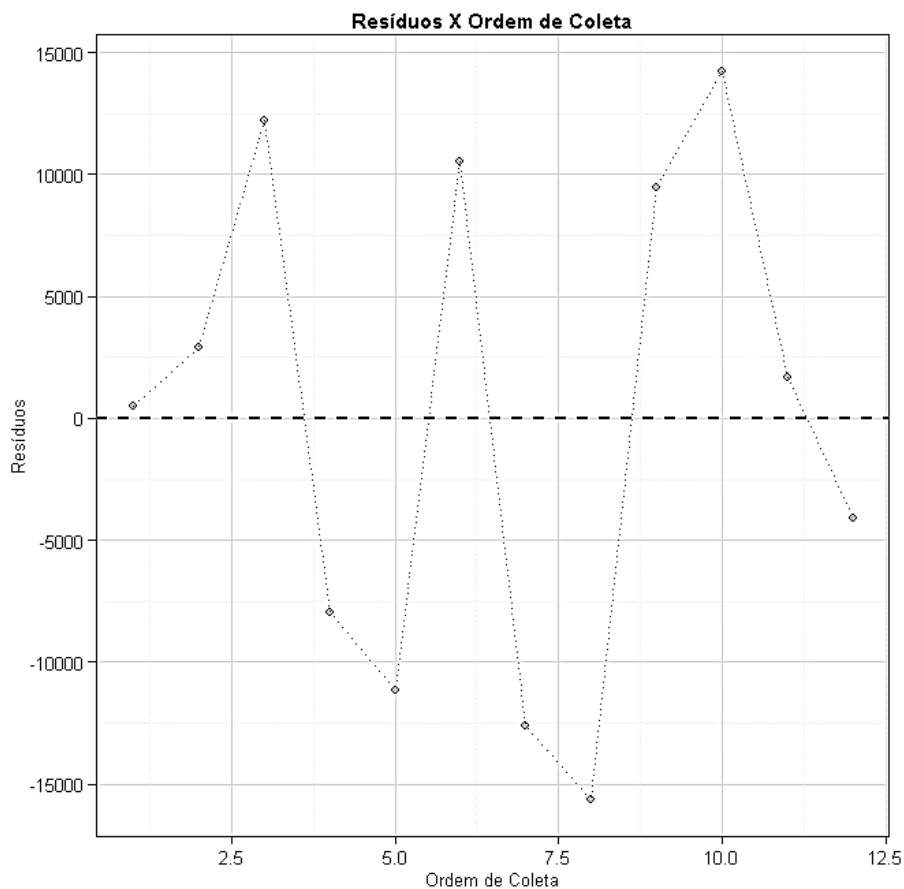


Para o diagnóstico de independência foi utilizado o teste de *Durbin-Watson* (**Tabela 26**) e o Gráfico de Resíduos x Ordem de Coleta (**Figura 39**).

Tabela 26 - Resultado do Teste de Durbin Watson para a realização do Diagnóstico de Independência.

Teste de Independência - Durbin-Watson	
Estatística	P-valor
2,63	0,61

Figura 39 - Gráfico de Resíduos x Ordem de Coleta para avaliação da Independência entre os resíduos.



9.4.5. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)

Foram encontrados os valores de 0,95 µg/L para o Limite de Detecção e 3,18 para o Limite de Quantificação.

9.5. Amostragem

9.5.1. Análise do AFM em Amostras de Urina

As **Tabelas 27 e 28** apresentam os resultados de AFM para os indivíduos ocupacionalmente e ambientalmente expostos ao benzeno analisados, respectivamente.

Tabela 27 - Concentração de AFM em Amostras de Urina de Frentistas de Postos de Gasolina da Cidade do Rio de Janeiro.

Amostra	AFM ($\mu\text{g/g}$ creatinina)
9900	NE
9901	NE
9902	NE
9903	NE
9904	ND
9905	NE
9906	NE
9907	NE
9908	NE
9909	NE
9910	NE
9911	NE
9912	NE
9944	1,82
9945	ND
9946	ND
9947	ND
9948	ND
9949	ND
9950	ND
9956	2,95
9957	ND
9958	ND
9959	0,61
9960	ND
9961	ND
9962	ND
10151	ND
10152	4,76
10153	NE
10154	ND
10155	ND
10156	ND
10157	ND
10158	NE
10159	ND
10160	4,08
10264	11,08
10265	14,60
10266	1,58
10267	ND
10268	1,23
10345	ND

10346	0,88
10347	ND
10361	ND
10362	4,31
10363	ND
10364	ND
10408	ND
10409	NE
10410	ND
10411	6,52

Legenda: NE: Não Enviada; ND: AFM não Detectado.

Tabela 28 - Concentração de AFM em Amostras de Urina dos Indivíduos Expostos Ambientalmente ao Benzeno.

Amostra	AFM (µg/g creatinina)
2015/0001	ND
2015/0002	ND
2015/0003	ND
2015/0004	ND
2015/0005	ND
2015/0006	ND
2015/0007	ND
2015/0008	ND
2015/0009	ND
2015/0010	5,96
2015/0011	ND
2015/0012	ND
2015/0013	ND
2015/0014	3,41
2015/0015	ND
2015/0496	ND
2015/0497	ND
2015/0498	ND
2015/0499	ND
2015/0500	ND
2015/0501	ND
2015/0502	ND
2015/0503	ND
2015/0504	ND
2015/0505	NE
2015/0506	ND
2015/0507	ND
2015/0508	ND
2015/0509	ND

2015/0510	ND
2015/0511	ND
2015/0512	ND
2015/0513	NE
2015/0514	NE
2015/0515	ND

Legenda: NE: Não Enviada; ND: AFM não Detectado.

9.5.2. Análise Estatística dos resultados do AFM urinário

Os valores da estatística descritiva para os valores de AFM em indivíduos ocupacionalmente expostos ao benzeno estão apresentados na **Tabela 29**:

Tabela 29 - Resultados da Estatística Descritiva Para os Valores de AFM.

Resumo Descritivo	
Mínimo	0,61
1º Quartil	1,23
Média	4,58
Mediana	2,95
3º Quartil	6,52
Máximo	14,60
Desvio Padrão da Média	1,37
Desvio Padrão	4,54
Tamanho da Amostra	11

A **Figura 40** é um histograma com distribuição das frequências dos valores de AFM para os indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno e a **Tabela 30** e a **Figura 41** apresentam o resultado do teste de normalidade de *Anderson-Darling*.

Figura 40 - Histograma com a distribuição das frequências dos valores de AFM para os indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno.

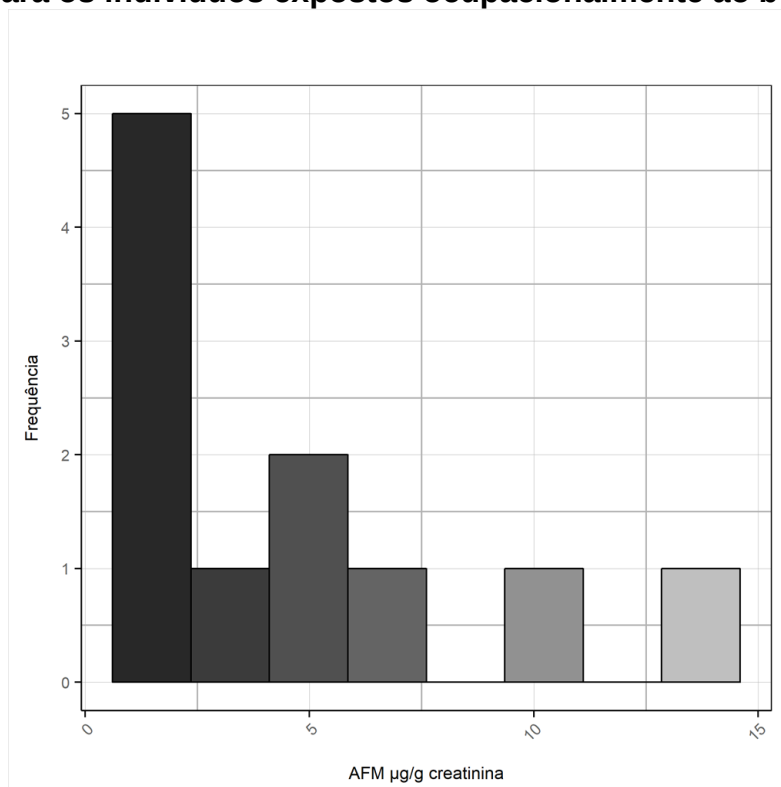
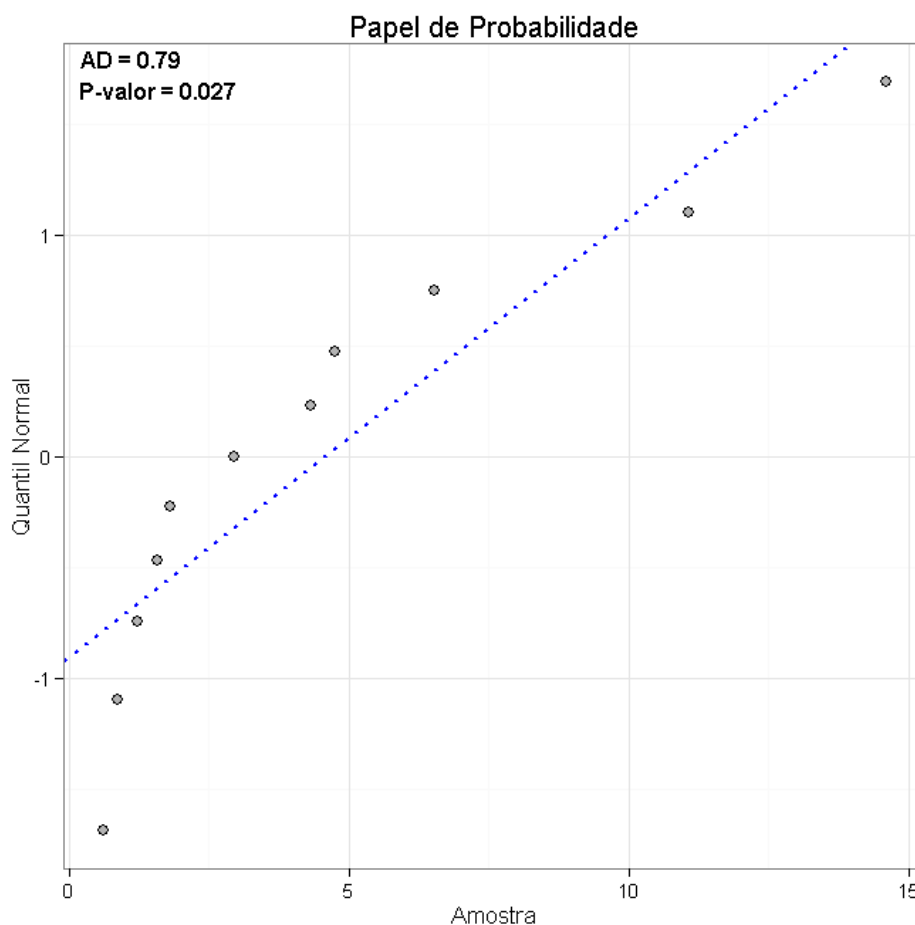


Tabela 30 - Resultado do Teste de normalidade de *Anderson-Darling*.

<i>Testes de Normalidade</i>		
<i>Testes</i>	<i>Estatísticas</i>	<i>P-valores</i>
Anderson - Darling	0,79	0,03

Figura 41 - Gráficos relacionados ao teste de Anderson-Darling.

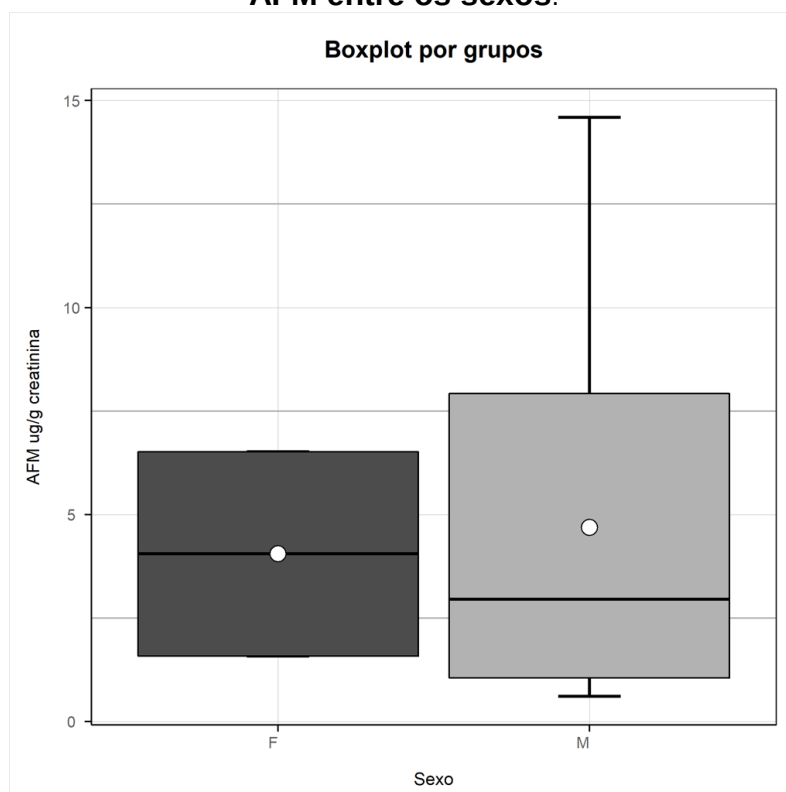


A **Tabela 31** e a **Figura 42** apresentam os resultados do teste de Mann-Whitney para a comparação dos valores de AFM entre os sexos.

Tabela 31 - Resultados do Teste de Mann-Whitney para a avaliação da relação entre quantidade de AFM na urina e sexo dos indivíduos.

<i>Tabela da Estatística do Teste de Mann-Whitney</i>	
<i>Informações</i>	<i>Valores</i>
Estatística	10
P-valor	0,91
Hipótese Nula	0
Limite Inferior	-13,01306225
(Pseudo) Mediana	0,526617545
Limite Superior	5,903029603
Nível de Confiança	0,95

Figura 42 - Boxplot para comparação entre as medianas dos valores de AFM entre os sexos.



Legenda: F: feminino; M: Masculino

10. DISCUSSÃO

Com base no tempo de retenção de saída do AFM e da área do pico correspondente a esse analito, foram escolhidas as condições do cromatógrafo e do espectrômetro de massas utilizadas no estudo.

Com relação às condições cromatográficas, as condições do injetor foram mantidas variando somente as condições da temperatura da coluna. Na Condição 1 (**Tabela 8**), que era mais simples, a temperatura inicial da rampa era de 75°C por 4 minutos. Já na segunda rampa, a temperatura aumentava 10°C por minuto até que a temperatura de 245°C fosse alcançada e essa se manteve por 10 minutos. Já a Condição 2 (**Tabela 9**) apresentou uma rampa a mais. A temperatura inicial foi de 10°C por 2 minutos. Na segunda rampa, a temperatura aumenta 10°C por minuto até chegar a 290°C. Na última rampa, a temperatura aumenta 30°C por minuto até alcançar a temperatura de 290°C, que se mantém por 10 minutos. O pós-corrida para as duas condições foi 290°C por 2 minutos. As condições relacionadas ao espectrômetro de massas foram iguais para os dois métodos.

Comparando-se os resultados nas duas Condições do sistema cromatográfico apresentado no **Item 9.1**, na Condição 1, o tempo de retenção do analito (18,302) foi maior que na Condição 2 (14,296). Em contrapartida, a área do pico referente ao AFM foi maior (49.466.638) na Condição 2 do que na Condição 1 (41.553.349). Dessa forma, a Condição 2 foi escolhida para a realização de todo o trabalho.

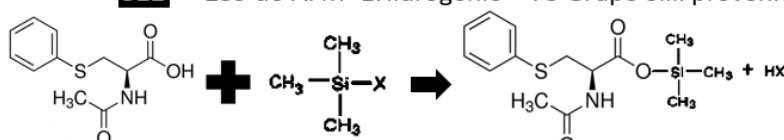
Com relação à análise do espectro de massas do AFM foram utilizados os íons 311, 252 e 237, de acordo com o padrão de fragmentação descrito na **Figura 43**.

Figura 43 - Padrão de fragmentação do Ácido Fenilmercaptúrico analisado por Espectrometria de Massas.

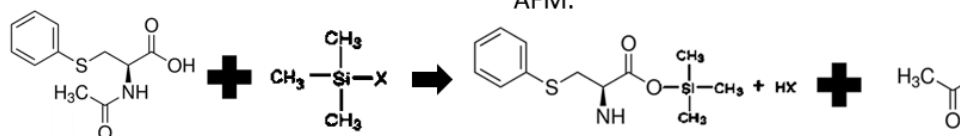
Fragmentação do AFM (BSTFA+TCMS+AFM)

Íons:

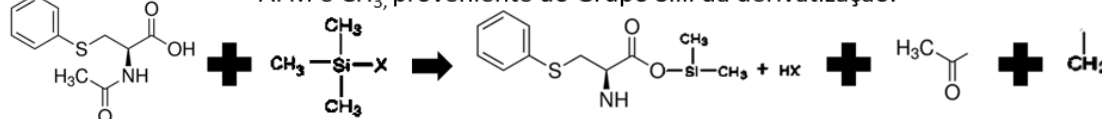
311 = 239 do AFM -1Hidrogênio + 73 Grupo Silil proveniente da derivatização.



252 = 311 do AFM derivatizado com a perda do grupo C_2OH_3 , proveniente da molécula de AFM.



237 = 311 do AFM derivatizado com a perda dos grupos C_2OH_3 , proveniente da molécula de AFM e CH_3 , proveniente do Grupo Silil da derivatização.



O íon 311 é correspondente a molécula completa de AFM adicionada do grupo silil proveniente do derivatizante. Já o fragmento 252 é composto pela molécula de AFM adicionada do grupo Silil, mas sem o grupo Acetil (C_2OH_3). O fragmento 237 é a molécula de AFM adicionada do grupo Silil menos os grupos Acetil (C_2OH_3) e o grupo Metil (CH_3).

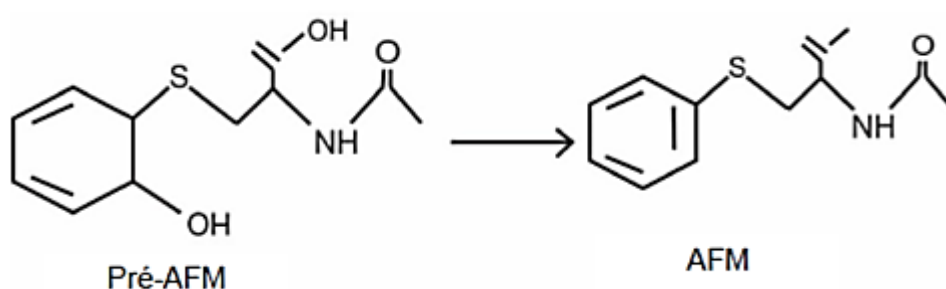
Para a escolha do agente derivatizante, de acordo com os dados da Tabela 12, o BSTFA foi escolhido como agente derivatizante, uma vez que, em ambas as condições testadas, as áreas dos picos correspondentes ao AFM derivatizado com o BSTFA foram maiores que as áreas referentes ao AFM

derivatizado com MSTFA. Já com relação às variáveis relativas à derivatização, de acordo com o que foi apresentado no **Item 9.2**, concluiu-se que as variáveis “tempo” e “relação de volume entre BSTFA/Acetato de Etila” foram as mais significativas, sendo que a significância da variável “tempo” foi bem maior. Isso se deu através da análise do p-valor na Análise de Experimentos sem réplicas (**Tabela 13**) e nos valores de Half-normal (**Tabela 14**). Esses resultados também puderam ser observados no Gráfico de Papel de Probabilidade Half-normal (**Figura 25**) e no Gráfico dos Efeitos pelo Método de Lenth (**Figura 26**). No primeiro gráfico, foi possível perceber que os pontos relativos às variáveis que apresentaram maiores valores de Half-Normal estavam mais afastados da linha imaginária, sendo que a variável “tempo” estava com o afastamento bem mais considerável. Já com relação ao segundo gráfico, foram considerados ativos os contrastes cujas barras ultrapassaram a linha SME, no caso em questão, os contrastes relacionados ao “tempo” e a “relação de volume entre BSTFA/Acetato de Etila”. Já o contraste correspondente ao efeito de interação entre a “relação de volume de BSTFA/Acetato de Etila” e “tempo” estava entre as linhas de referência ME e SME, que é considerada uma região “de incerteza” e, por isso, o mesmo não foi considerado como significativo. Por fim, aqueles contrastes cujas barras não ultrapassaram a linha de referência ME foram considerados inativos. Ao analisar esses resultados, contudo, o ideal seria ter considerado como escolha, com base nos resultados estatísticos, o teste em que para as variáveis “tempo” e “relação de volume entre BSTFA/Acetato de Etila” estivessem no nível +1 (**Experimento 8 – Tabela 16**). No entanto, visto que o teste 7 (**Tabela 16**) foi o que apresentou maior área do pico do AFM, o mesmo foi escolhido para a realização dos testes posteriores. Isso porque, tendo em vista a excreção do AFM na urina é baixa, a metodologia analítica deve buscar uma maior sensibilidade para a detecção do mesmo.

Estes testes relacionados à derivatização foram utilizados de forma completa apenas na ELL e LPME. Nas técnicas de extração de SPE e LTPE, as condições do equipamento de micro-ondas foram mantidas, mas foi utilizado apenas um volume fixo de 50 µL de BSTFA sem o acetato de etila, pois o BSTFA é um agente derivatizante com boas características de solvente e, por isso pode ser dispensado a interação com outro solvente para que a reação de derivatização ocorresse (**Tabela 17**).

É importante ressaltar que, nos procedimentos de extração de AFM, foi realizado o ajuste de pH igual a 1, para a ocorrência da hidrólise ácida. Esse procedimento é de extrema importância, uma vez que é nessa faixa de pH que ocorre a conversão de ácidos Pré-Mercaptúricos em Ácido Fenilmercaptúrico. A **Figura 44** apresenta o mecanismo dessa conversão.

Figura 44 - Conversão do Ácido Pré-Mercaptúrico em Ácido Fenilmercaptúrico.



Fonte: (Paci et al., 2007)

Nos estudos de determinação do AFM urinário são apresentadas várias técnicas de extração, utilizando diferentes sistemas cromatográficos (**Tabela 34**).

Tabela 32 - Estudos sobre determinação de AFM urinário.

Diferentes técnicas analíticas para determinação de AFM urinário			
Sistema cromatográfico	Técnica de Extração	LOD	Referência
GC-MS	ELL	1,0 a 5,0 ug/L	SITTERT et al., 1993
GC-MS	ELL	1,0 ug/L	POPP et al., 1994
GC-MS	ELL	1,0 ug/L	ANGERER; SCHILDBACH; KRÄMER, 1998
GC-MS	ELL	5,0 ug/L	CIARROCCA et al., 2012
GC-MS	ELL	5 ug/L	MARRUBINI et al., 2005
GC-MS	ELL	2 ug/L	WAIDYANATHA et al., 2004
HPLC-fluorescência	SPE	0,22 ug/L	MENDES; SILVEIRA; ANDRE, 2017
HPLC-fluorescência	SPE	1,0 ug/L	EINIG; DEHNEN, 1995
HPLC-fluorescência	ELL e SPE	1,0 ug/L	BURATTI et al., 2001
HPLC-fluorescência	SPE	0,5 ug/L	MAESTRII; GHITTORI; IMBRIANI, 1997
HPLC	ELL	0,02 mg/L	INOUE et al., 2000
HPLC	SPE	3,0 mg/L	SCHAFER; SCHAD; WEBER, 1993
HPLC-MS/MS		0,042 µg/L	LIN et al., 2006
HPLC-MS/MS	SPE	0.30 µg/L	BARBIERI et al., 2008
HPLC-MS/MS	SPE	0,30 µg/L	SABATINI et al., 2008
HPLC-MS/MS	SPE	0.05 µg/L	TRANFO et al., 2010
HPLC-MS/MS	SPE	0.026 µg/L	TRANFO et al., 2018
UPLC	ELL	1,0 µg/L	LEE et al., 2011
UPLC-MS/MS	SPE	0.08 µg/L	CARON-BEAUDOIN et al., 2018
LC-MS/MS	ELL	0.10 ng/mL	WANG et al., 2013
LC-ESI-MS/MS		0,8 ug/L	BAGHDADY; SCHUG, 2018
UHPLC-MS	LTPE	0.02 ug/L	GOMES et al., 2017

A ELL foi a primeira técnica de extração a ser testada, uma vez que é a mais utilizada nas análises de AFM por GC-MS. Entretanto, para os testes realizados nesse trabalho, houve problemas em relação à sensibilidade analítica. A concentração mais baixa detectada foi de 25 µg/L (**Figura 27**), o que não é interessante, uma vez que o valor de 25 µg/g de creatinina já é considerado como o Limite Biológico de Exposição ao benzeno (ACGIH, 2018). Além disso, essa técnica de extração possui limitações relacionadas ao uso de grandes volumes

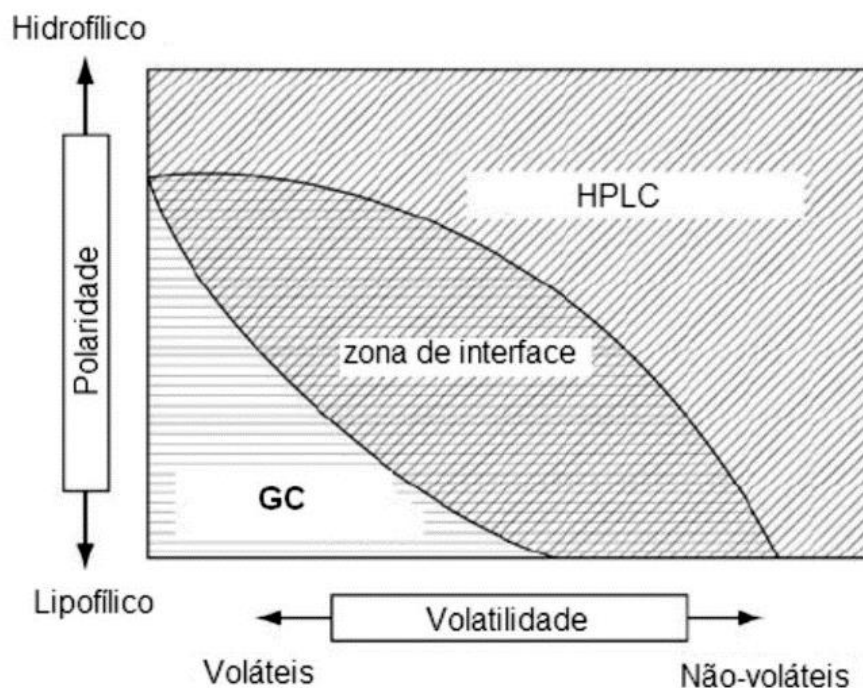
de reagente, presença de emulsão e extratos mais sujos. Em vista destes problemas analíticos, foram testados outros procedimentos de extração.

Para a LPME, os testes foram realizados em concentrações altas, as quais obtiveram bons resultados (**Figura 28**). Contudo, para concentrações muito baixas ($\mu\text{g/L}$), não foram obtidas boas respostas. A concentração mais baixa que foi detectada foi a de $500 \mu\text{g/L}$, cuja área foi 166.297 (**Figura 29**), que está bem distante das concentrações que deveriam ser utilizadas no trabalho em fases posteriores. Essa baixa sensibilidade se deve ao fato de que o tipo de extrato adquirido é extremamente sujo, o que gera uma linha de base muito alta no cromatograma. Além disso, já com a análise de poucas amostras, foi necessária a realização de limpeza da fonte de íons do Espectrômetro de Massas.

A SPE é um tipo de extração muito utilizado em análises de AFM por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Não foi identificado algum estudo que utilizasse a técnica de SPE com posterior injeção em GC-MS (**Tabela 34**). Esta técnica, assim como a ELL, tem a desvantagem da utilização de quantidades relativamente grandes de solventes. Porém, é uma técnica com menos limitações, no sentido de invalidação da amostra, já que não existe a possibilidade de ocorrência de emulsão. Um possível motivo de a mesma não estar associada a utilização de GC-MS deve-se ao fato de que são utilizados solventes polares na sua realização.

Diagramas de polaridade e volatilidade são esquemas interessantes para avaliação das características relacionadas às técnicas cromatográficas e ao analito de interesse, como mostra a **Figura 45**. Compostos voláteis e não polares são frequentemente separados por Cromatografia Gasosa. Em contrapartida, os Cromatógrafos Líquidos são mais indicados para análises de compostos que apresentam polaridade mais alta e menor volatilidade (DA SILVA; COLLINS, 2011).

Figura 45 - Correlação entre propriedades físico-químicas de analitos e as técnicas de Cromatografia Líquida e Gasosa.



Fonte: DA SILVA; COLLINS, 2011.

Dessa forma, as extrações por SPE estão mais associadas às análises realizadas em CLAE. Contudo, com o procedimento de levar o extrato a resíduo em banho de água, a técnica torna-se compatível, também, com utilização de Cromatografia Gasosa. Tendo em vista os fatos apresentados, a SPE foi testada no presente trabalho utilizando a técnica de CG-EM. O método foi mais sensível que as demais técnicas testadas, com a concentração mínima detectada de 0,5 µg/L (**Figura 30**). Contudo, nos testes realizados, houve muita variação nas áreas dos picos entre as replicatas de cada concentração testada. Além disso, apresenta como desvantagem o tempo gasto para a evaporação do solvente. Em vista do tempo limite para a conclusão do trabalho como um todo, somado ao fato de ser uma técnica cara, já que há a necessidade de colunas específicas e descartáveis para a extração de cada amostra, a utilização desse tipo de extração tornou-se inviável.

Tendo em vista as desvantagens relacionadas às técnicas de extração testadas, a LTPE foi considerada como uma boa escolha no procedimento de extração. Esta técnica de extração apresenta vantagens consideráveis como, uso de baixos volumes de amostra e de solvente, o processo de extração não é

complexo, apesar de demorado, não possui custo tão elevado, apresenta boa sensibilidade (**Figura 31**) e os extratos mais limpos, o que ajuda na limpeza do equipamento e, também, na manutenção da linha de base.

A **Tabela 46** apresenta as vantagens e desvantagens entre as técnicas de extração testadas no presente estudo.

Figura 46 - Vantagens e Desvantagens das técnicas de extração estudadas.

Técnica de Extração	Vantagens	Desvantagens
LLE	Simples realização; Rápida; Custo não muito elevado; Boa sensibilidade.	Presença de emulsão; Grande volume de amostra; Grande volume de reagente; Extratos sujos.
LPME	Baixo volume de reagentes.	Preparo da amostra é demorado; Necessidade de gastos com fibras; Alto volume de amostra; Extratos muito sujos; Linha de base alta.
SPE	Boa sensibilidade; Boa recuperação.	Alto custo; Preparo de amostra demorado; Volume alto de reagentes; Volume alto de amostra; Extratos sujos.
LPME	Boa sensibilidade; Extratos mais limpos; Baixo volume de reagentes; Baixo volume de amostra.	Procedimento demorado

Após concluir que a LTPE seria a técnica de extração de escolha para o trabalho e que as características de cada etapa da extração foram definidas, o método foi validado.

Com relação à linearidade, que foi a primeira figura de mérito a ser avaliada, foi observado que Coeficiente de correlação apresentou bom resultado ($R^2=99,28\%$) (**Figura 32**). Analisando-se o diagnóstico dos resíduos, foi possível observar que houve normalidade dos resíduos, uma vez que o p-valor do Teste

de Normalidade de Resíduos através do modelo *Ryan-Joiner* (**Tabela 17**) foi superior a 0,05, associado à análise do Gráfico QQ-Plot para a verificação da normalidade dos dados (**Figura 33**). Foi possível observar, também, que não houve indícios de dependência dos resíduos. Isso porque foi observado que o p-valor do Teste de Independência de *Durbin-Watson* (**Tabela 18**) foi superior à 5%. Somado a esse resultado, a análise do Gráfico dos resíduos versus a ordem de coleta (**Figura 34**) demonstrou que não existia tendência dos pontos presentes no gráfico. O teste de Homocedasticidade dos resíduos foi outro componente do diagnóstico de resíduos avaliado. Observou-se que houve homocedasticidade dos resíduos, já que o teste de *Brown-Forsythe* (**Tabela 19**) apresentou p-valor acima de 5% e que o Gráfico dos resíduos versus valores ajustados (**Figura 35**) não demonstrou tendência entre os pontos, uma vez que estes estavam distribuídos de forma aleatória em torno de 0 (zero). O último passo foi a avaliação do ajuste de modelo, utilizando, para isso, o teste de falta de ajuste. De acordo com a **Tabela 20**, nota-se que o modelo é adequado, já que o p-valor é de 0,83 para o nível de significância de 5%.

O estudo da precisão apresentou resultados satisfatórios. Avaliando-se o coeficiente de variação (%CV) referente a cada concentração nos dois ensaios (**Tabela 21**), foi possível perceber que todos os valores estavam dentro da faixa de CV aceita para que o método seja considerado preciso.

Para a exatidão, segundo RIBANI et al., 2004, consideram-se aceitáveis intervalos de recuperação para análises de resíduos entre 70 e 120%. Dessa forma, ao observar a porcentagem de recuperação das três concentrações analisadas, é possível concluir que o método teve exatidão (**Tabela 22**).

O Efeito Matriz foi analisado através do teste de comparação do paralelismo entre as curvas (**Tabela 23 e Figura 36**). Uma vez que o p-valor foi menor que 0,05, foi rejeitada a hipótese de que os coeficientes angulares são iguais ao nível de significância de 5%. Já que foi detectada diferença significativa entre as curvas para avaliar o efeito matriz, associado à análise do Gráfico de Dispersão para comparação entre as curvas, concluiu-se, então, que as retas não são paralelas, o que significa que o efeito matriz foi significativo. Para o diagnóstico dos resíduos, foi realizado, de início, o teste de Normalidade de *Ryan-Joiner* (**Tabela 24**). Analisando-se o p-valor do teste, foi possível perceber que não houve significância, uma vez que os valores estavam acima de 0,05.

Associado à análise do Gráfico para o teste de normalidade utilizando o teste de *Ryan-Joiner* (**Figura 37**), concluiu-se que houve normalidade dos resíduos. Foi observado, ainda, que o modelo era homocedástico. Isso porque o p-valor foi maior que 0,05 no teste de homocedasticidade de *Goldfeld-Quandt* e que o Gráfico de Resíduos x Valores Ajustados (**Figura 38** e **Tabela 25**) não demonstrou tendência de afunilamento. Para o diagnóstico de Independência, por sua vez, foi observado que existia independência entre os resíduos, uma vez que o p-valor no Teste de Independência de *Durbin-Watson* (**Tabela 26**) foi um valor acima do nível de significância e que no Gráfico de Resíduos x Ordem de coleta (**Figura 39**) os pontos não apresentaram um comportamento de repetição.

O método apresentou boa sensibilidade em função dos valores de Limite de Detecção e de Quantificação apresentados no **Item 9.4.5**.

Com relação às análises das amostras de urina, das 38 amostras provenientes de trabalhadores expostos ocupacionalmente ao benzeno analisadas, o AFM foi detectado em 12 dessas amostras (**Tabela 27**). Já com relação às amostras de indivíduos expostos ambientalmente ao benzeno, de um total de 32 amostras analisadas, somente em 02 amostras de urina o AFM foi detectado (**Tabela 28**). A amostra identificada como 10160 (**Tabela 27**) e a amostra identificada como 2015/0010 (**Tabela 28**) não foram incluídas nas análises estatísticas, uma vez que apresentaram valores de creatinina fora da faixa aceitável para as análises de metabólitos. Considerando que o Limite Biológico de Exposição do AFM é, segundo a ACGIH (2018), de 25 µg/g de creatinina para uma concentração de benzeno no ar igual a 0,5 ppm. Dessa forma, foi observado que, de acordo com a **Tabela 27**, os resultados encontrados nas amostras dos trabalhadores expostos ocupacionalmente ao benzeno foram característicos de baixa exposição ao benzeno. Isso porque, na maioria das amostras, o AFM não foi detectado e, quando houve detecção do mesmo, os valores foram bem abaixo de 25 µg/g creatinina.

De acordo com a estatística descritiva para os valores de AFM urinário (**Tabela 29**), foi observado que estes valores variaram de 0,61 a 14,60 µg/g de creatinina e a média foi 4,58 µg/g de creatinina. Nenhum indivíduo apresentou valores de AFM acima do Limite Biológico recomendado pela ACGIH (25 µg/g de creatinina).

Para a seleção dos testes estatísticos usados posteriormente, houve necessidade de verificação da normalidade da distribuição das amostras. Essa verificação foi realizada por meio de um histograma com distribuição das frequências dos valores de AFM para os indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno (**Figura 40**), e através do teste de normalidade de *Anderson-Darling*, em que foi observado que o p-valor foi menor que 5% de significância e que no Gráfico de Papel de Probabilidade foi demonstrado que alguns pontos estavam distantes da reta (**Tabela 30 e Figura 41**). Foi observado, dessa forma, que a distribuição das frequências dos valores de AFM não foi normal.

Uma vez que os valores de AFM não seguiram distribuição normal, o Teste de *Wilcoxon-Mann-Whitney*, por ser um teste não paramétrico, foi escolhido para a realização das análises (**Tabela 31**). O mesmo foi aplicado para a verificação da influência de gênero na excreção urinária do AFM. Isso porque a excreção urinária dos metabólitos do benzeno é influenciada por fatores individuais, sendo que o sexo é um desses fatores. Observou-se, dessa forma, que a mediana dos valores de AFM no sexo feminino foi maior que no sexo masculino (**Figura 42**), no entanto como o p-valor foi maior que 5%, pode-se concluir que esta diferença não foi significativa. Deve-se considerar que o fato da diferença não ter sido significativa pode ser devido ao baixo valor da amostragem (n=11), pois o maior valor médio encontrado nas amostras do sexo feminino com achados de Kim et al., 2006 corrobora com o fato de que a biotransformação do benzeno é maior no sexo feminino.

11. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Levando em consideração que as análises relativas à determinação do Ácido Fenilmercaptúrico na urina são, normalmente, complexas e que podem apresentar alto custo, torna-se necessário o desenvolvimento de técnicas mais simples e baratas, mas que tenham boa sensibilidade, já que esse metabólito está presente em concentrações muito baixas na urina. O presente trabalho testou algumas das técnicas de extração mais comuns para as análises de AFM por CG-EM. Todas as técnicas possuem vantagens e desvantagens específicas, mas, dentre essas técnicas, a de LTPE foi a que apresentou mais apropriada.

De acordo com resultados dos parâmetros analíticos apresentados para o desenvolvimento e validação do método para determinação do AFM por

cromatografia gasosa com espectrometria de massas, concluiu-se, que o método é adequado para os objetivos propostos.

O método analítico apresentou sensibilidade adequada ao propósito de avaliação de exposições ocupacional e ambiental ao benzeno. Neste sentido, é de grande interesse que o método estudado seja aplicado em amostras reais de populações expostas ao benzeno de forma a auxiliar a estimativa e avaliação do risco à saúde em relação a esta substância química devido a sua grande importância toxicológica.

12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACGIH, A. C. OF G. I. H. **Biological Exposure Indices (BEI®) Introduction.** Disponível em: <<https://www.acgih.org/tlv-bei-guidelines/biological-exposure-indices-introduction>>. Acesso em: 22 out. 2018.

AGGIO, R. B. M. et al. Identifying and quantifying metabolites by scoring peaks of GC-MS data. **BMC Bioinformatics**, v. 15, n. 1, p. 1–11, 2014.

AGILENT-TECHNOLOGIES. **Espectrometria de massas Princípios básicos – Teoria** Academic & Institutional Research, , 2016. Disponível em: <https://www.agilent.com/cs/library/slidepresentation/public/5991-5857_Agilent_MS_Theory_PTBR.pdf>

ANGERER, J.; SCHILDBACH, M.; KRÄMER, A. Gas chromatographic method for the simultaneous determination of S-p-toluymercapturic acid and S-phenylmercapturic acid in human urine. **Journal of analytical toxicology**, v. 22, n. June, p. 211–214, 1998.

ANVISA. Ministério da Saúde -MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária -ANVISA. **Diário Oficial da União**, v. 2003, 2003.

ARNOLD, S. M. et al. The use of biomonitoring data in exposure and human health risk assessment: Benzene case study. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 43, n. 2, p. 119–153, 2013.

BAGHDADY, Y. Z.; SCHUG, K. A. A novel diagnostic in situ derivatization kit for the simultaneous determination of 14 biomarkers of exposure to benzene, toluene, ethyl benzene and xylenes in human urine by isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry and kit optimiza. **Analytica Chimica Acta**, p. 1–9, 2018.

BARBIERI, A. et al. Urinary biomarkers and low-level environmental benzene concentration: Assessing occupational and general exposure. **Chemosphere**, v. 74, n. 1, p. 64–69, 2008.

BURATTI, M. et al. Determination of monobromobimane derivatives of phenylmercapturic and benzylmercapturic acids in urine by high-performance liquid chromatography and fluorimetry. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 751, n. 2, p. 305–313, 2001.

CALDAS, S. S. et al. Modern techniques of sample preparation for pesticide residues determination in water by liquid chromatography with detection by diode array and mass spectrometry. **Química Nova**, v. 34, n. 9, p. 1604–1617, 2011.

CARON-BEAUDOIN, É. et al. Gestational exposure to volatile organic compounds (VOCs) in Northeastern British Columbia, Canada: A pilot study. **Environment International**, v. 110, n. July 2017, p. 131–138, 2018.

CIARROCCA, M. et al. Assessment of occupational exposure to benzene, toluene and xylenes in urban and rural female workers. **Chemosphere**, v. 87, n. 7, p. 813–819, 2012a.

CIARROCCA, M. et al. Assessment of occupational exposure to benzene, toluene and xylenes in urban and rural female workers. **Chemosphere**, v. 87, n. 7, p. 813–819, 2012b.

COSTA-AMARAL, I. C. **Estudo da exposição ocupacional e ambiental ao benzeno em baixas concentrações sob a perspectiva dos efeitos genotóxicos**. Rio de Janeiro: [s.n.].

DA SILVA, C. G. A.; COLLINS, C. H. Applications of High Performance Liquid Chromatography For The Study of Emerging Organic Pollutants. **Química Nova**, v. 34, n. 4, p. 665–676, 2011.

DE PAIVA, M. J. N. et al. An alternative derivatization method for the analysis of amino acids in cerebrospinal fluid by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 931, p. 97–102, 2013.

EINIG, T.; DEHNEN, W. Sensitive determination of the benzene metabolite S-phenylmercapturic acid in urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 697, n. 1–2, p. 371–375, 1995.

EURACHEM. **Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics.** [s.l: s.n.].

GOMES, R. DE P. **Métodosde extração com partição a baixa temperatura para a determinação de marcadores biológicosde exposição ao benzeno, em urina,por UHPLC-MS/MS.**Ouro Preto, 2016.

GOMES, R. DE P. et al. Validation of a new high-throughput method to determine urinary S -phenylmercapturic acid using low-temperature partitioning extraction and ultra high performance liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 2, p. 550–557, 2017.

GUIDECHEM. **CHEMICAL TRADING GUIDE. Chemical Dictionary: CAS nº 35487-17-3.** Disponível em: <http://www.chemicaldictionary.org/dic/S/S-Phenylmercapturic-acid_2355.html>. Acesso em: 20 ago. 2009.

INOUE, O. et al. Urinary Phenylmercapturic Acid as a Marker of Occupational Exposure to Benzene. **Industrial Health**, v. 38, n. 2, p. 195–204, 2000.

KIM, K. H. et al. An exploration on the suitability of airborne carbonyl compounds analysis in relation to differences in instrumentation (GC-MS versus HPLC-UV) and standard phases (Gas versus Liquid). **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

KIM, S. et al. Using urinary biomarkers to elucidate dose-related patterns of human benzene metabolism. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 4, p. 772–781, 2006.

KIM, S. et al. Genetic polymorphisms and benzene metabolism in humans exposed to a wide Range of air concentrations. **Pharmacogenetics and Genomics**, v. 17, n. 10, p. 789–801, 2007.

LEE, B. L. et al. Ultra-performance liquid chromatographic assay coupled with two-dimensional separation for spectrometric determination of urinary S-phenylmercapturic acid. **Analytical Methods**, v. 3, n. 9, p. 2025–2031, 2011.

LIN, L. C. et al. Validation of an online dual-loop cleanup device with an electrospray ionization tandem mass spectrometry-based system for simultaneous quantitative analysis of urinary benzene exposure biomarkers trans, trans-muconic acid and S-phenylmercapturic acid. **Analytica Chimica Acta**, v. 555, n. 1, p. 34–40, 2006.

LIU, C. et al. Qualitative and Quantitative Analysis of Volatile Components

of Zhengtian Pills Using Gas Chromatography Mass Spectrometry and Ultra-High Performance Liquid Chromatography. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2016, p. 1–8, 2016.

MAESTRII, L.; GHITTORI, S.; IMBRIANI, M. Determination of specific mercapturic acids as an index of exposure to environmental benzene, toluene, and styrene. **Industrial Health**, v. 35, p. 489–501, 1997.

MARRUBINI, G. et al. Effect of hippuric acid on the gaschromatographic retention of S-phenylmercapturic acid. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 822, n. 1–2, p. 209–220, 2005a.

MARRUBINI, G. et al. Determination of S-phenylmercapturic acid by GC-MS and ELISA: A comparison of the two methods. **Biomarkers**, v. 10, n. 4, p. 238–251, 2005b.

MENDES, M. et al. Normas ocupacionais do benzeno: uma abordagem sobre o risco e exposição nos postos de revenda de combustíveis. v. 6369, n. supl 1, p. 1–19, 2017.

MENDES, M. P. R.; SILVEIRA, J. N.; ANDRE, L. C. An efficient analytical method for determination of S-phenylmercapturic acid in urine by HPLC fluorimetric detector to assessing benzene exposure. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 1063, n. August, p. 136–140, 2017.

NETO, B. DE B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos**. 3ª ed. Campinas: Editora Unicamp, 2007.

NICOARA, S. et al. Determining the levels of volatile organic pollutants in urban air using a gas chromatography-mass spectrometry method. **Journal of Environmental and Public Health**, v. 2009, p. 4–7, 2009.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de toxicologia**. 4ª ed. São Paulo: [s.n.].

POPP, W. et al. Concentrations of benzene in blood and S-phenylmercapturic and t,t-muconic acid in urine in car mechanics. **International Archives of Occupational and Environmental Health**, v. 66, n. 1, p. 1–6, 1994.

PORTAL-ACTION. **EXPERIMENTOS FATORIAIS SEM RÉPLICAS**. Disponível em: <<http://www.portalaction.com.br/planejamento-de-experimento/33-experimentos-fatoriais-sem-replicas>>. Acesso em: 6 out. 2018.

PROTANO, C. et al. Urinary trans, trans-muconic acid and S-phenylmercapturic acid are indicative of exposure to urban benzene pollution during childhood. **Science of the Total Environment**, v. 435–436, p. 115–123, 2012.

RAPPAPORT, S. M. et al. Human benzene metabolism following occupational and environmental exposures. **Chemico-Biological Interactions**, v. 184, n. 1–2, p. 189–195, 2010.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Quimica Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

SABATINI, L. et al. Validation of an HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of phenylmercapturic acid, benzylmercapturic acid and o-methylbenzyl mercapturic acid in urine as biomarkers of exposure to benzene, toluene and xylenes. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 863, n. 1, p. 115–122, 2008.

SCHAFER, F.; SCHAD, H.; WEBER, L. Determination of phenylmercapturic benzene-exposed BDF- 1 mice. **Journal of Chromatography**, v. 620, p. 239–242, 1993.

SIGMA-ALDRICH; SUPELCO. Derivatization Reagents For Selective Response and Detection in Complex Matrices. **Application Note**, p. 100, 2011.

STASHENKO, E.; MARTÍNEZ, J. . Gas chromatography-mass spectrometry. **Intechopen.Com**, 2014.

TEÓFILO, R. F.; FERREIRA, M. M. C. Quimiometria II: Planilhas eletrônicas para cálculos de planejamentos experimentais, um tutorial. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 338–350, 2006.

TRANFO, G. et al. Comparison of hydrolysis and HPLC/MS/MS procedure with ELISA assay for the determination of S-phenylmercapturic acid as a biomarker of benzene exposure in human urine. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 878, n. 27, p. 2529–2533, 2010.

TRANFO, G. et al. Biomonitoring of Urinary Benzene Metabolite SPMA in the General Population in Central Italy. **Toxics**, v. 6, n. 3, p. 37, 2018.

TUAKUILA, J. S-phenylmercapturic acid (S-PMA) levels in urine as an indicator of exposure to benzene in the Kinshasa population. **International**

Journal of Hygiene and Environmental Health, v. 216, n. 4, p. 494–498, 2013.

VAN SITTERT, N. J.; BOOGAARD, P. J.; BEULINK, G. D. Application of the urinary S-phenylmercapturic acid test as a biomarker for low levels of exposure to benzene in industry. **British journal of industrial medicine**, v. 50, n. 5, p. 460–469, 1993.

WAIDYANATHA, S. et al. Rapid determination of six urinary benzene metabolites in occupationally exposed and unexposed subjects. **Analytical Biochemistry**, v. 327, n. 2, p. 184–199, 2004.

WANG, Z. et al. A rapid and sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the quantitation of S-phenylmercapturic acid in human urine. **Analytical Methods**, v. 5, n. 21, p. 6081–6085, 2013.