

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Este exemplar corresponde à redação final da Tese
defendida por ZENILDA DE LOURDES CARDEAL, e aprovada
pela Comissão julgadora.

Campinas, 15 de dezembro de 1988

René Mendes

PRESIDENTE DA COMISSÃO
JULGADORA

DETERMINAÇÃO DE FENOL NA URINA
POR CROMATOGRAFIA GASOSA CAPILAR
PARA USO EM AVALIAÇÃO DE EXPOSIÇÃO
OCUPACIONAL AO BENZENO

ZENILDA DE LOURDES CARDEAL

Tese de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. RENÉ MENDES

-1988-

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

"Se não houver frutos,
valeu a beleza das flores.
Se não houver flores,
valeu a sombra das folhas.
Se não houver folhas,
valeu a intenção das sementes".

Henfil

À memória de
minha mãe.

AGRADECIMENTOS

Ao professor René Mendes, pelo estímulo e orientação para realização deste trabalho.

Ao professor Antônio Luiz Pires Valente, cuja co-orientação possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

A professora Carol Hollingworth Collins, pela colaboração e apoio na realização das etapas finais do trabalho.

A Professora Isabel Cristina Sales Fontes Jardim pela colaboração e sobretudo pela amizade e incentivo.

Ao colega Lourival Cardoso Faria pela ajuda na determinação de creatinina por análise em fluxo contínuo monosegmentado.

Aos professores e funcionários do Departamento de Medicina Preventiva - Área de Saúde Ocupacional, em especial ao Luiz Borges.

Aos colegas de laboratório, em especial a Bel e a Solange.

A todas as pessoas, que direta ou indiretamente, tornaram possível a realização desta tese.

ÍNDICE

Pág.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO	1
------------------	---

CAPÍTULO 2

AValiação DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL

AO BENZENO	5
2.1 - Avaliação Ambiental	5
2.2 - Avaliação Biológica	7
2.2.1 - Análise de Benzeno no ar Expirado	11
2.2.2 - Análise de Benzeno no Sangue	12
2.2.3 - Análise dos Metabólicos do Benzeno na Urina	13
a) Excreção Urinária de Sulfatos	13
b) Excreção Urinária de Fenol	14
2.3 - Determinação de Fenol	17
2.3.1 - Métodos Colorimétricos	17
2.3.2 - Métodos Cromatográficos	19

CAPÍTULO 3

MÉTODOS ANALÍTICOS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO

DE FENOL URINÁRIO	24
3.1 - Cromatografia Gasosa Capilar	27
3.2 - Coluna Capilar	28
3.3 - Sistema Cromatográfico	30

3.3.1 - Gás de Arraste	30
3.3.2 - Injetor	31
3.3.3 - Divisor de Amostras	31
3.3.4 - Forno	34
3.3.5 - Detector	35
3.4 - A Eficiência da Separação	36

CAPÍTULO 4

OBJETIVO	41
----------------	----

CAPÍTULO 5

PARTE EXPERIMENTAL	43
5.1 - Reagentes	43
5.2 - Instrumentos	44
5.3 - Purificação de Fenol	46
5.4 - Testes de Perda de Fenol	48
5.5 - Análises por Cromatografia Gasosa	49
5.5.1 - O Cromatógrafo à Gás	49
5.5.2 - A Coluna Capilar de Vidro	50
a) Medidas de Tempo Morto	51
b) Cálculo do Número de Pratos Teóricos	52
c) Análise de Fenol com a Coluna Capilar de Vidro	52
5.5.3 - Coluna Capilar de Sílica Fundida, Tipo "Megabore"	53
5.6 - Sistema de Pesagem do Fenol	53

5.7 - Extração por Solventes	55
5.7.1 - Extração em Tubo	56
5.7.2 - Extração Líquido-líquido	
Contínua	56
5.8 - Determinação de Creatinina	58
5.8.1 - Método Manual	59
5.8.2 - Método de Análise em Fluxo	
Contínuo Monosegmentado	60

CAPÍTULO 6

RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
6.1 - Purificação do Fenol	62
6.2 - Teste da Volatilidade do Fenol	64
6.3 - Medida do Tempo Morto, t_m , da Coluna	
Capilar de Vidro, de 18mm, 0,2mm de	
D.I. e F.E. OV-101	65
6.4 - Cálculo do Número de Pratos Teóricos	
da Coluna Capilar de Vidro	67
6.4.1 - Razão de Divisão Constante com	
Variação do Volume Injetado	67
6.4.2 - Volume de Injeção Constante com	
Variação da Razão de Divisão	68
6.5 - Análise de Fenol com a Coluna Capilar	
de Vidro	69
6.5.1 - Variação de Atenuação	71
6.5.2 - Variação do Volume Injetado	72
6.5.3 - Variação da Temperatura da Coluna	73

6.6 - Otimizações das Condições de Análise, Utilizando a Coluna Capilar de Sílica Fundida, tipo "Megabore"	75
6.6.1 - Vazão dos Gases que Alimentam o Detector	75
6.6.2 - Vazão da Fase Móvel	76
6.6.3 - Temperatura da Coluna	80
6.6.4 - Temperatura do Vaporizador	80
6.6.5 - Temperatura do Detector	83
6.7 - Análise Cromatográfica de Soluções de Fenol, Nitrobenzeno e Cresóis	83
6.8 - Construção da Curva de Calibração	85
6.9 - Extração por Solvente	87
6.9.1 - Extração em Tubo	87
6.9.2 - Extração Contínua	90
6.10 - Determinação de Creatinina	93
6.10.1 - Determinação de Creatinina Urinária pelo Método Espectofotométrico Manual	93
6.10.2 - Determinação de Creatinina em Urina pelo Sistema Monosegmentado em Fluxo	94
6.11 - Análise de Amostras de Urina	98

CAPÍTULO 7

CONCLUSÃO	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

RESUMO

O benzeno está associado a diversos efeitos lesivos sobre a saúde e a determinação do teor de seu metabólito principal, o fenol, que é excretado na urina, é utilizada para o monitoramento biológico da exposição ocupacional ao benzeno.

O método de análise escolhido consistiu na hidrólise ácida para liberação do fenol que se encontra na urina como ácido fenil sulfônico e ácido fenil glicurônico; extração do fenol; quantificação por cromatografia gasosa capilar; e normalização da concentração de fenol pela quantificação de creatinina na urina.

O uso de cromatografia gasosa possibilitou a determinação de fenol na urina, sem a interferência dos cresóis. Foram testadas duas colunas capilares. A que se mostrou adequada para análise de fenol na concentração de interesse foi uma coluna capilar de sílica fundida de 10 m de comprimento, DI 0,53 mm e F.E. HP-5 (2,23 mm de espessura de filme, com ligação cruzada).

Foram comparados dois métodos de extração: extração em tubo e extração contínua. Verificou-se que o melhor método é o de extração contínua por ter um rendimento maior.

A quantificação de creatinina foi feita pelo método espectrofotométrico estático e pelo método de análise em fluxo contínuo monosegmentado, sendo o último considerado mais conveniente para análises múltiplas.

Portanto, a determinação de fenol na urina tem resultados confiáveis quando a hidrólise ácida é feita em sistema fechado, seguida de extração contínua com éter isopropílico, análise do extrato por cromatografia gasosa capilar, e quantificação de creatinina através de análise espectrofotométrica.

ABSTRACT

Benzene is associated with health effects. The determination of its principal metabolite, phenol, which is excreted in urine, is used for biological monitoring of occupational exposure to benzene.

The method chosen involves acid hydrolysis to liberate phenol which is encountered in urine in the form of sulphonate and glucuronate derivatives, extraction of phenol; determination of phenol concentration by gas capillary chromatography; and normalization of the phenol concentration by determination of creatinine in urine.

Use of gas capillary chromatography has made possible the determination of phenol in urine without the interference of cresols. Two capillary columns were tested. A fused silica capillary column (SE HP-5, 2,23 mm film thickness; 0,53 mm i.d.; 10 m long) was shown suitable for analysis of the phenol in the concentration range of interest.

Comparison was made of two different methods of extraction: simple step extraction and continuous extraction. It was concluded that the best method is continuous extraction as it gave a higher yield of phenol.

Measurement of creatinine was made by a spectrophotometric method, or using monosegmented flow analysis. The latter is considered more convenient for multiple analysis.

Thus, the determination of phenol in urine has reliable results when acid hydrolysis is made in closed systems, followed by continuous extraction with isopropyl ether, analysis of the extract by gas capillary chromatography, and measurement of creatinine by a spectrophotometric analysis.

INTRODUÇÃO

Já de longa data, a exposição ocupacional ao benzeno tem sido associada a uma gama de efeitos lesivos à saúde, particularmente ao sistema hematopoiético. Existem inúmeros trabalhos epidemiológicos ou casos publicados sobre intoxicação por benzeno em exposição ocupacional, como mostra a revisão bibliográfica feita por Wakamatsu e Fernicola^{66, 67}.

O benzeno a altas concentrações, é depressor do Sistema Nervoso Central^{31, 44, 46, 66, 67}. Assim, os efeitos variam de narcose ao coma, entrecortado por convulsões e morte, dependendo da concentração ambiental. Uma exposição a concentração de 19.000 - 20.000 ppm de benzeno durante 5 a 10 minutos, é fatal. Existe também um efeito irritativo do benzeno sobre a pele, olhos e mucosas^{31, 66, 67, 73}, além disso ele pode afetar o fígado, os rins e o coração.

Exposições a baixas concentrações de benzeno, a longo prazo, podem causar^{44, 65, 75} uma doença denominada benzenismo crônico. Nesses casos, o benzeno (ou seus produtos de degradação)

atua sobre o sistema hematopoiético, situado na medula óssea podendo provocar alterações nos glóbulos vermelhos (anemia), nos glóbulos brancos (leucopenia e outras alterações) e plaquetas (manifestações hemorrágicas). Estas alterações são graves, mas reversíveis quando tratadas no estágio inicial da doença. Entretanto, pode ocorrer uma alteração global do quadro hematológico associado a uma alteração da medula óssea, ou seja, uma hipofunção medular (Hipoplasia ou Aplasia medular), que é irreversível, não tem tratamento e leva à morte^{31, 44, 46, 66, 67}.

Além disso, a leucemia também está entre os efeitos conhecidos, associados ao benzenismo crônico^{43, 63, 64, 68}. Outrosim, há comprovação de que o benzeno provoca alterações cromossômicas^{46, 71}, podendo inclusive reduzir a fertilidade masculina⁷⁴.

O benzeno (C_6H_6) é um líquido incolor, de odor agradável, altamente inflamável (temperatura de ignição $11^{\circ}C$) e extremamente volátil (pressão de vapor de 74.66 mmHg a $20^{\circ}C$). Produz vapores mais pesados que o ar, no qual se mistura lentamente acumulando-se nas regiões mais baixas do ambiente. É pouco solúvel em água (180 mg de benzeno por 100 mL de água a $20^{\circ}C$), porém, solúvel em acetonas, alcóois, éteres, óleos, gorduras, CS_2 , CCl_4 , CH_3CCl_3 . É usado como solvente para o enxofre, o fósforo e o iodo e grande número de matérias orgânicas, cera, cânfora, borracha, ácidos aromáticos e alcalóides. Pode ser utilizado na síntese de fenol, nitrobenzeno, cumeno, ciclohexano, servindo como intermediário na produção de vários produtos, como mostra a figura 1.1.³¹

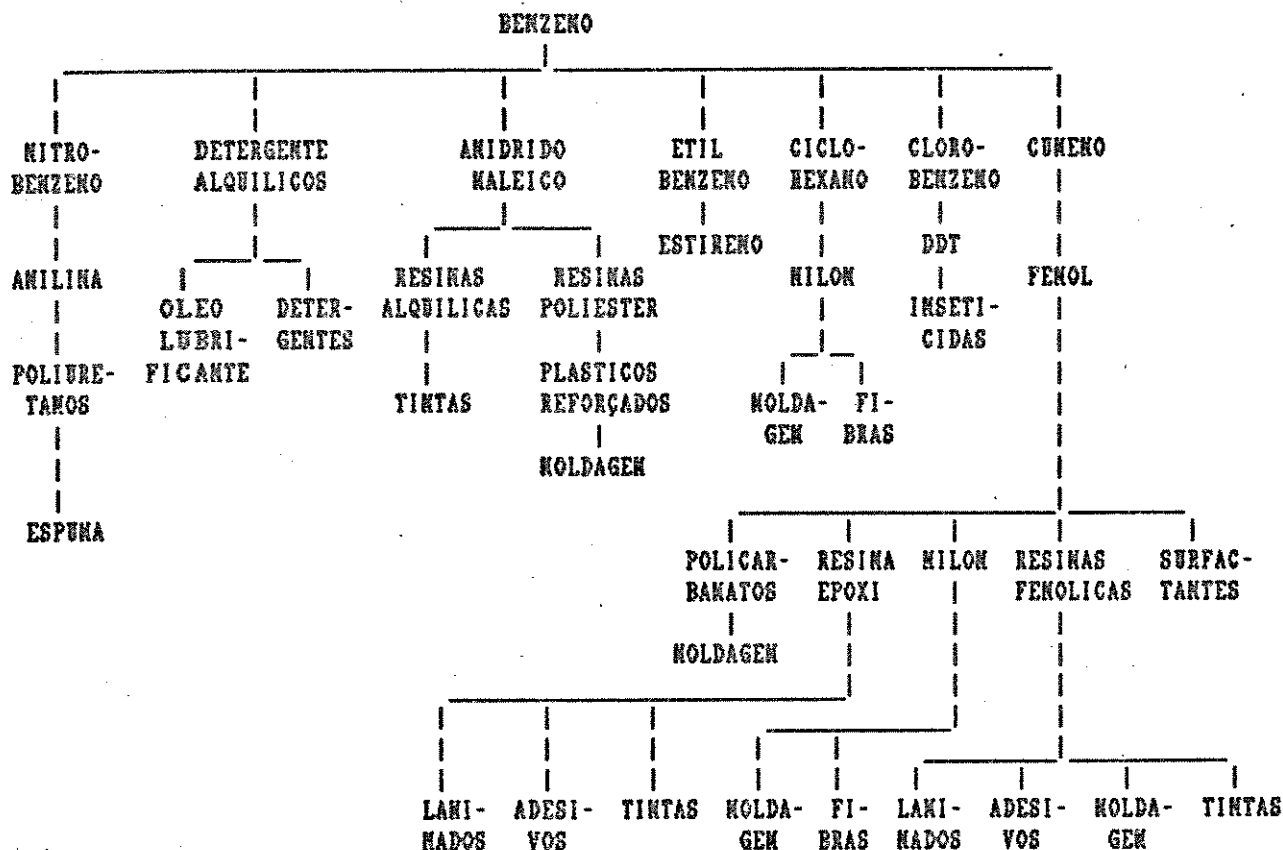


Figura 1.1 - Derivados do Benzeno e seus Usos

Ele é produzido em refinarias de petróleo por um processo chamado reformulação catalítica, que converte alguns hidrocarbonetos em aromáticos, utilizando-se catalisadores de metal (óxidos de metal do grupo VI B, tais como Cr e Mo) e altas pressões. Este processo também é utilizado para a produção de benzeno a partir de gás natural. Outra fonte de produção de benzeno é o carvão, a carbonização da hulha a temperaturas altas (de 1000 a 1200°C) produz hidrocarbonetos aromáticos.

Em muitos países o uso de benzeno como solvente está praticamente extinto⁷³, fazendo-se a sua substituição por outros

solventes menos tóxicos (ex.: tolueno, ciclohexano, xileno, ...). Entretanto alguns países ainda utilizam amplamente o benzeno como solvente, principalmente devido ao seu baixo custo.

Em 1971 a Organização Internacional do Trabalho (OIT) elaborou a Convenção No. 136 e a Recomendação No. 144 " sobre a proteção contra os riscos de intoxicação por benzeno ". Estes instrumentos prevêem a extinção do emprego de benzeno como solvente e que a porcentagem de benzeno que aparece como impureza nos demais solventes seja no máximo 1% em volume. O Brasil adotou esta convenção e o conteúdo desta norma internacional está expresso na Portaria Interministerial MS-MTd No. 3, de 28 de abril de 1982.

Entretanto, apesar das restrições adotadas, no Brasil além das refinarias de petróleo e das indústrias siderúrgicas muitos outros tipos de indústrias manuseiam o benzeno, pois como mostra a fig 1.1, a sua utilização é muito ampla, sendo, portanto, fundamental que seja feita periodicamente uma avaliação da exposição ocupacional ao benzeno nestas indústrias.

AVALIAÇÃO DA EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AO BENZENO

2.1 - Avaliação Ambiental

A avaliação ambiental baseia-se no Limite de Tolerância (L.T.). Os L.T. referem-se às concentrações de substâncias aerodispersóides e representam as condições sob as quais supõe-se que "quase" todos os trabalhadores podem estar expostos repetidamente dia após dia sem efeito adverso¹⁰.

O L.T. do benzeno vem diminuindo no decorrer dos anos, refletindo a preocupação constante de melhorar os níveis de segurança. Por exemplo, nos Estados Unidos, em 1938 o L.T. para o benzeno era de 100 ppm, em 1951 caiu para 25 ppm e em 1971 para 10 ppm. Em 1978 a O.S.H.A (Occupational Safety and Health Administration - U.S.A) propôs a redução do L.T. do benzeno de 10 para 1 ppm baseada na avaliação científica^{46, 71, 72} de que trabalhadores expostos ao benzeno estão propensos a um elevado risco de desenvolvimento de leucemia, mielopatias e aberrações cromossômicas. Mas a Suprema Corte Americana decidiu que não era neces-

sário mudar o L.T. para 1 ppm, aceitando a alegação de que efeitos adversos à saúde não ocorrem com 10 ppm de L.T. em 8 hs de trabalho durante uma jornada de 40 horas semanais.

No Brasil o L.T. para o benzeno é de 8 ppm, pois a jornada de trabalho brasileira é de 48 horas semanais. Na Alemanha Ocidental o L.T. também é de 8 ppm, na Suíça é de 5 ppm e na U.R.S.S. é de 1,6 ppm⁷.

A avaliação da exposição ambiental é feita pela quantificação dos vapores de benzeno no ar que será inalado pelo trabalhador. Esta quantificação pode ser feita pela passagem de um volume conhecido de ar através de um tubo que contenha um adsorvente sólido. Para passagem do ar através do tubo utiliza-se uma bomba de amostragem de fluxo controlado^{4, 7, 26, 47, 49, 52} (fig. 2.1). A bomba é presa na cintura do trabalhador e o tubo é colocado no ombro próximo ao nariz, para que a amostragem seja equivalente ao ar inalado pelo trabalhador. O benzeno que foi absorvido no tubo de absorção de vapor é então desorvido e analisado por cromatografia gasosa.

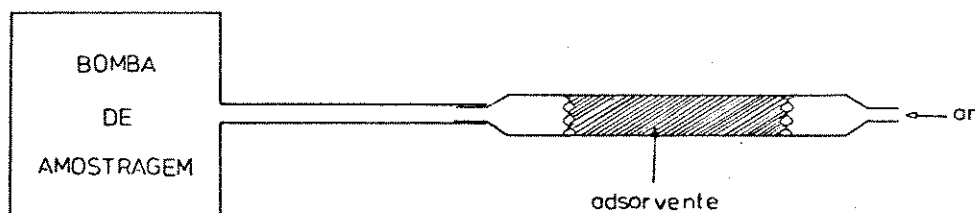


Figura 2.1 - Sistema de coleta de ar para quantificação de benzeno

2.2 - Avaliação Biológica

O parâmetro biológico de exposição reflete a exposição integral do trabalhador em relação às flutuações das concentrações das substâncias tóxicas no ar, a ventilação pulmonar e a absorção cutânea e gastrointestinal. Os valores obtidos pela avaliação biológica indicam se os níveis de exposição são nocivos à saúde, baseando-se no Limite de Tolerância Biológica (L.T.B.)³⁶.

A principal via de penetração do benzeno no organismo é a respiratória, uma vez que a absorção cutânea é pequena. O NIOSH (National Institute of Occupational Safety and Health - USA) realizou um estudo com ratos sem pelos, nos quais se aplicou nafta de petróleo contendo 0.5% de benzeno, marcado com ^{14}C e verificou-se que 1% do benzeno aplicado foi absorvido pela pele, concluindo que um trabalhador que manipula 150 litros de benzeno por dia pode absorver aproximadamente 6 mg de benzeno diariamente através da pele intacta⁴⁶.

Cerca de 40-55% do benzeno inalado^{67,73} é retido pelo organismo, dependendo da concentração e do tempo de exposição. A retenção pode ser considerada constante, ao redor de 1,0 mg/mL em exposições de 25 ppm, com uma ventilação pulmonar de 25 L/min⁶⁴. Sendo o benzeno lipossolúvel, ele se fixa em tecidos ricos em gorduras, tais como centros nervosos e medula óssea⁵⁹.

Parke e Willians^{in:55} administraram benzeno [^{14}C] em ratos e observaram que havia uma considerável concentração de benzeno na medula óssea e no baço dos ratos, imediatamente após a

inalação.

Também em experiência com animais, Schrenk e col.^{1n:73} observaram uma concentração de benzeno cerca de 20 vezes maior na medula óssea e nas gorduras que no sangue, concluindo que a perda de benzeno pelos tecidos gordurosos é muito lenta.

Cerca de 12-50% do benzeno absorvido é eliminado, sem alterações, pela expiração⁷⁰. Hunter e Blair³⁰ observaram que na exposição de alguns homens as concentrações de benzeno de 63 a 405 µg/L (em câmaras fechadas), a eliminação de benzeno pela expiração não foi maior que 12% da dose retida. Teisinger e colaboradores^{1n:65} colocaram homens a uma exposição de 340 µg/L de benzeno diariamente durante cinco horas e observaram que a média de retenção do vapor inalado foi de 46,3%, deste total aproximadamente 26% foi expirado, e 0,1-0,2% excretado na urina, sem qualquer transformação.

A base do entendimento da biotransformação do benzeno foi obtida através de experiências com animais, geralmente ratos, coelhos e macacos. Inicialmente observou-se que com a administração de benzeno havia considerável excreção de fenol urinário. Posteriormente foi detectada também a presença de quinol e pequenas quantidades de catecol, hidroxiquinol, ácido fenil mercaptúrico e ácido trans-trans mucônico.

A biotransformação provável do benzeno está esquematizada na figura 2.2. Do benzeno absorvido, aproximadamente 40% é eliminado sem alteração pela expiração. O restante é oxidado no fígado a epoxibenzeno pelo sistema enzimático hidrocarboneto de aril

hidroxilase. O epoxibenzeno então se desdobra em três caminhos. Primeiro, ele pode rearranjar-se espontaneamente para produzir fenol. Segundo, ele pode ser atacado por hidrase epóxido, dando benzeno glicol. O benzeno glicol então produz predominantemente catecol via desidrogenação enzimática, e ácido trans-trans mucônico através da subsequente oxidação. Terceiro, o epoxibenzeno pode reagir com glutathione na presença de epoxitransferase para produzir ácido fenil mercaptúrico. A maioria do fenol formado sofre subsequente oxidação para produzir hidroquinona, que reage com ácido sulfúrico e/ou glicurônico sendo então eliminado. Finalmente, a maioria do catecol reage com ácido sulfúrico e/ou glicurônico sendo eliminado, com uma pequena quantidade sendo oxidada a hidroxiquinona.

A biotransformação do benzeno no homem é similar a observada em animais como mostra o estudo feito por Teisinger e colaboradores^{11:55}. Analisando a urina de pessoas expostas a 100 ppm de benzeno por 5 horas, Teisinger verificou que dos 46% do benzeno absorvidos, 6,1% foi eliminado como fenol, 6,3% como catecol, e 2,4% como hidroquinona.

Muitos autores^{55,65,67,73} atribuem a toxicidade do benzeno aos seus metabólitos, principalmente catecol e epoxibenzeno.

O estado nutricional e o uso de drogas pode influenciar o processo de oxidação e conjugação do benzeno⁷³.

A avaliação biológica da exposição ao benzeno pode ser efetuada pelas seguintes análises :

- análise de benzeno no ar expirado;
- análise de benzeno no sangue;
- análise dos metabólitos do benzeno na urina.

2.2.1 - Análise de benzeno no ar expirado

A análise do ar expirado após exposição ao benzeno indica a velocidade de eliminação do benzeno do corpo, sendo possível deduzir então a quantidade absorvida. Contudo, para avaliação da exposição ao benzeno deve existir uma correlação entre a concentração de benzeno no ar expirado e a concentração no ambiente.

Imediatamente após a exposição a velocidade de liberação do benzeno pela expiração é bem rápida, mas ela reduz-se após o término da exposição. Isto indica que o corpo tem diferentes compartimentos de absorção do benzeno e a velocidade de eliminação de cada um é descrita adequadamente por uma curva exponencial^{52, 53}. A meia-vida de eliminação imediatamente após a exposição é de 1 hora e está associada à liberação de benzeno do sangue. No dia seguinte a meia-vida de eliminação é de um dia e está associada à liberação de benzeno dos tecidos gordurosos, incluindo a medula óssea.

Para avaliação da exposição ao benzeno a coleta do ar expirado pode ser feita imediatamente após a exposição ou antes da próxima exposição. A avaliação antes da próxima exposição tem menor sensibilidade pois a quantidade de benzeno eliminada é

menor, mas é o meio mais adequado para se prever o risco dos efeitos a longo prazo. Um nível de 0,12 ppm de benzeno no ar expirado foi proposto como limite para uma exposição 10 ppm de benzeno por 8 horas, fazendo-se a coleta 16 horas após a exposição⁷.

A coleta do ar expirado pode ser feita com tubos de coleta (análise instantânea) ou através de máscaras com respirador (análise por período de tempo pré-estabelecido). O ar coletado é então analisado por cromatografia gasosa.

Sherwood e Carter⁵³ realizaram uma experiência com um homem, em uma câmara com concentração controlada de benzeno e observaram que imediatamente após uma exposição sedentária a 24 ppm de benzeno por 4 horas e 30 minutos, a concentração na expiração foi cerca de 2 ppm. Na manhã seguinte a concentração foi cerca de 0,2 ppm. A atividade dos trabalhadores expostos pode influenciar estes valores, pois com uma maior velocidade respiratória, ocorre uma maior ingestão de benzeno.

A desvantagem desta análise é o risco de se obter interferentes durante a coleta do ar expirado. Além disto, para a coleta é necessário habilidade técnica e instrumento de análise de alta sensibilidade, pois a concentração obtida é geralmente 1 ppm.

2.2.2 - Análise de Benzeno no Sangue

A determinação de benzeno no sangue não é um método recomendado para o monitoramento biológico de exposição ao benze-

no devido aos problemas práticos encontrados na coleta da amostra.

Além disso, não existe comprovação^{31, 52} de boa correlação entre a concentração de benzeno no sangue e sua concentração no ambiente. Snyder e colab.⁵⁴ por exemplo, relataram que a concentração de benzeno encontrada no sangue de sete ratos, que foram expostos a 300 ppm de benzeno em 6 horas por dia durante 70 dias, foi de 3,2-8,4 µg por g de sangue. O sangue foi extraído com tolueno e analisado por cromatografia gasosa, utilizando-se dicloro-metano como padrão interno.

2.2.3 - Análise dos Metabólitos do Benzeno na Urina

O benzeno que é absorvido no organismo é biotransformado no fígado e seus principais metabólitos são excretados na urina. O fenol é o principal e é eliminado na forma sulfo ou glicuro-conjugada (fig. 2.2). A determinação da concentração de fenilsulfato ou fenol na urina pode ser utilizada para avaliar a exposição ao benzeno.

a) Excreção Urinária de Sulfatos

Em uma população sadia, não exposta ao benzeno a quantidade de sulfato inorgânico geralmente excretada na urina é de 80-90% do sulfato total^{57, 67, 73}. Na exposição ao benzeno com subsequente metabolização a fenol na forma de fenilsulfato, ocorre um acréscimo da quantidade de sulfatos orgânicos na urina, e a relação sulfato inorgânico / sulfato total diminui. Este decréscimo é utilizado como índice do grau de exposição.

A determinação de sulfatos pode ser feita por análise gravimétrica utilizando-se cloreto de bário como agente precipitante. A urina deve ser coletada logo após o término da exposição, porque a excreção de fenilsulfato aparentemente, inicia-se rapidamente e termina abruptamente²⁴.

Teisinger e Fiserová-Bergerová⁵⁷ observaram em suas experiências que pode ocorrer uma considerável conjugação de fenol com ácido glicurônico em detrimento da conjugação com ácido sulfúrico. Outrossim, apenas em concentrações superiores a 150 ppm de benzeno (muito acima do Limite de Tolerância) ocorre um decréscimo considerável da relação sulfato inorgânico / sulfato total, sem que haja uma boa correlação com o grau de exposição, pois em exposições de 200 a 500 ppm obteve-se porcentagens semelhantes de sulfato inorgânico.

Além disto a porcentagem de sulfatos pode ser alterada pela ingestão de certos vegetais, consumo de medicamentos contendo enxofre e exposição ao ciclohexano e seus derivados. Por conseguinte, é desaconselhável a utilização da análise da excreção urinária de sulfato como índice de avaliação de exposição ao benzeno⁵⁷.

b) Excreção Urinária de Fenol

Em uma população sadia não exposta a produtos químicos, existe uma excreção normal de fenol que aumenta com a exposição ao benzeno, e também ao fenol e seus derivados. Existe uma variação individual na excreção de fenol devido a influência de inges-

tão de proteínas, gorduras, alimentos defumados, água (a concentração máxima de fenol permitida em água potável de padrão internacional é de 0,002 mg/L²³), etanol, analgésicos (salicílicos), aplicação de pomadas que contenham fenol e distúrbios intestinais, que favorecem a degradação bacteriológica de tirosina e fenilalanina e alterações renais ou hepáticas^{7, 14, 66}.

A determinação da quantidade de fenol na urina varia com o método utilizado. Van Haaften e Sie⁶³, em 1965, utilizando cromatografia gasosa obtiveram uma concentração média de 7.0 mg/L para excreção normal de fenol na urina. Eles também observaram que não houve nenhuma diferença significativa entre as amostras de urina coletadas no período da manhã com as coletadas à tarde, e entre as urinas de fumantes e não fumantes.

Docter e Zielhuis¹⁵, em 1967, utilizando o método colorimétrico de Gibbs²² analisaram a urina de 45 homens e 9 mulheres, obtendo uma concentração média de excreção normal de fenol de 7,8 mg/L.

Buchet, Lauwerys e Cambier⁸, em 1972, desenvolveram um método de cromatografia gasosa para determinação de fenol urinário e analisaram a urina de 20 pessoas obtendo o valor médio de 9,4 mg/L ou 4,7 mg/g de creatina para a concentração normal de fenol na urina.

O NIOSH⁴² desenvolveu um outro método de cromatografia gasosa encontrando um intervalo 3,1-5,8 mg/L ou 1,5-2,8 mg de fenol/g de creatinina para a concentração normal de fenol na urina.

Spiegel e Opar⁵⁶, em 1978, utilizando o método de cromatografia gasosa de Van Haaften e Sie⁶⁰, obtiveram um valor médio de 10,2 mg/L para a concentração de fenol na urina.

Anami e Martins¹, em 1985, utilizando um método de cromatografia gasosa encontraram como valores normais de fenol de 9,6 mg/L ou 5,4 mg de fenol por g de creatinina.

Analisando estes valores podemos concluir que a faixa média da concentração normal de fenol na urina é de 4,5-9,6 mg de fenol por L de urina ou de 2,2-5,4 mg de fenol por g de creatinina.

Embora haja variação na excreção normal de fenol, a quantidade de fenol na urina tem uma boa correlação com a exposição ao benzeno. Teisinger e Fiserová-Bergová³² concluíram que uma excreção urinária de fenol de 40 mg/L indica que a exposição ao benzeno não é significativa e que uma excreção urinária de fenol de 100 mg/L indica uma exposição a aproximadamente 35 ppm durante 8 horas. Para o NIOSH uma concentração de 75 mg/L de fenol na urina indica uma exposição ao benzeno, inaceitável.

O Grupo de Trabalho Internacional sobre Toxicologia de Benzeno (Paris, 9-11 de novembro de 1976) adotou os seguintes valores de fenol na urina, determinados imediatamente após a exposição

- cerca de 100 mg/L indica uma exposição a 25 ppm de benzeno durante 8 hs;

- cerca de 50 mg/L indica uma exposição a aproximadamente 10 ppm de benzeno durante 8 hs;

- acima de 25 mg/L indica alguma exposição ao benzeno;
- menos de 10 mg/L provavelmente mostra a ausência de exposição significativa.

De acordo com a legislação do Ministério do Trabalho (Norma Regulamentadora nº. 7 da Portaria No. 12, de 06.06.83) é obrigatório o controle biológico de todos trabalhadores que manuseiam benzeno. O índice biológico da exposição ao benzeno é o fenol urinário com valor até 30 mg/L e L.T.B. = 50mg/L⁴⁷.

Considerando que o fenol é excretado rapidamente e que sua meia-vida na urina é de 270 min^{53, 73} a urina deve ser coletada logo após o término da exposição. Considerando-se as variações individuais, a concentração de fenol deve ser normalizada. Para normalização pode ser adotada uma densidade urinária padrão, obtida preferencialmente pela densidade média da população em estudo, ou pode ser feita a quantificação de creatinina na urina a ser analisada.

2.3 - Determinação do Fenol

A determinação de fenol pode ser feita através de métodos colorimétricos ou de métodos aplicando cromatografia gasosa.

2.3.1 - Métodos Colorimétricos

Em 1924, Theis e Benedict⁵⁹ descreveram um método colorimétrico de determinação de fenol, a níveis de até 10 mg/L. Eles utilizaram o reagente p-nitroanilina diazotizada que se torna alaranjado para vermelho quando reage com fenol.

Logo depois, em 1927, Gibbs²² desenvolveu um outro método colorimétrico baseado na formação de indofenol pela condensação de 2,6-dicloroquinonacloroimida ou 2,6-dibromoquinonacloroimida com fenol em pH de 8,0 a 10,0. A produção de indofenol, que é azul, ocorre no máximo em 18 minutos, sendo sua quantificação realizada por meio de espectrofotômetro utilizando-se comprimento de onda 610 μm . A formação de indol não ocorre com fenóis que contenham um radical na posição para em relação à hidroxila (ex.: p-cresol).



Ettlinger, Ruchhoft e Lishka¹⁷, em 1951, propuseram o uso de 4-aminoantipirina e extração com clorofórmio para determinação colorimétrica de fenol. A solução alaranjada obtida é analisada por espectrofotometria a 460 μm .

Mohler e Jacob³⁹, em 1957, analisaram alguns métodos colorimétricos para determinação de fenol e concluíram que no método de Gibbs o completo desenvolvimento da cor requer de 6 a 24 h^{rs}, a precisão do método a baixas concentrações é questionável e variações no pH e temperatura afetam o desenvolvimento da cor. No método que utiliza 4-aminoantipirina há interferência de alcoóis e cetonas e a sensibilidade varia com o pH.

Wexler⁶⁹, em 1963, propôs para determinação de fenol a

utilização de ultravioleta na região de 340 μm a 220 μm . O método baseia-se na análise das diferenças entre o espectro do fenol em H_2O ou CH_3OH e o espectro do fenol em solução de KOH 1N. Porém, a sensibilidade do método de ultravioleta de Wexler é pequena.

Goren-Strull, Mostaert e Kleijn²³, em 1965, fazendo uma revisão dos métodos colorimétricos concluíram que no método de diazotização de fenol de Vulkan-Verlog, fenóis com o grupo para e orto substituídos são codeterminados (p-cresol e o-cresol) e a cor não é estável.

Heistand e Todd²⁸, em 1972, desenvolveram um método automático para determinar fenol na urina. O método consiste na hidrólise dos fenóis conjugados com H_2SO_4 8M e destilação a vapor seguida por determinação colorimétrica (com 4-aminoantipirina em $\text{pH} = 10,2$) do fenol no destilado. A cor é medida por um colorímetro usando, a 520 nm, um filtro de interferência.

2.3.2 - Métodos Cromatográficos

Van Haaften e Sie⁶³, em 1965, compararam dois métodos colorimétricos, os de Gibbs²² e de Theis e Benedict⁵⁶ com um método de cromatografia gasosa (C.G.) para determinação de fenol urinário. No método de C.G., a amostra de urina foi hidrolisada com H_3PO_4 em uma pré-coluna de borosilicato sendo o fenol liberado analisado com uma coluna contendo como Fase Estacionária (F.E.) polietileno glicol 6000 sobre Chromosorb-W. Eles utilizaram um cromatógrafo à gás equipado com um detector por ionização

em chama (D.I.C.) e H_2 como gás de arraste. Eles concluíram que o método C.G. é mais específico, pois separa o fenol de todos os cresóis, e mais rápido, e que os dois métodos colorimétricos sofrem interferência dos cresóis.

Sherwood e Carter⁵³, em 1970, descreveram um método cromatográfico de determinação de fenol na urina. A urina foi hidrolisada com $HClO_4$ a $95^\circ C$ por 2h, o fenol extraído com éter isopropílico e analisado por C.G. em uma coluna recheada com adipato de etileno glicol 2% sobre Universal B. Para normalização da concentração eles utilizaram a densidade urinária padrão de 1,018 mg/L.

Buchet, Lauwerys e Cambier⁸, em 1972, sugeriram um método aperfeiçoado de determinação de fenol na urina, utilizando a dosagem de creatinina para normalizar a concentração de fenol. A amostra de urina onde se adiciona uma quantidade conhecida de nitrobenzeno como padrão interno é aquecida a $100^\circ C$ por 30 min com HCl 12,5 N para hidrolisar os fenóis conjugados. Os fenóis e o padrão são extraídos com éter etílico e uma alíquota do extrato é injetada no cromatógrafo a gás utilizando-se uma coluna recheada com SE 30 3% sobre Varaport 30. A determinação foi realizada com D.I.C. a $100^\circ C$, utilizando N_2 como gás de arraste.

Dirmiks e Darbre¹⁴, em 1974, descreveram um método de C.G. para análise de fenol em que foi feita uma hidrólise enzimática dos fenóis conjugados com β -glucoronidase e aril sulfatase em pH 5,0 a $37^\circ C$ por 48 hs, e posterior extração com éter etílico. Foram testados vários tipos de fase estacionária optando-se pela F.E. éster fosfato TXP 0,5% sobre Chromosorb W-HP. Foram

feitas análises comparativas entre este método cromatográfico e o método colorimétrico de Gibbs, concluindo-se que os resultados mais altos obtidos com o método colorimétrico foram ocasionados pela interferência de o-cresol e 2,6 xilenol.

O NIOSH⁴², em 1974, recomendou um método cromatográfico de análise de fenol em que a amostra de urina é hidrolisada com HCl concentrado por 90 min a 95°C, o fenol é extraído com éter etílico ou éter isopropílico e analisado por C.G., utilizando-se uma coluna de vidro recheada com adipato de dietileno glicol 2% sobre Anakrom (60/70 mesh). Utiliza-se nitrobenzeno como padrão interno na determinação com D.I.C. e He como gás de arraste. A concentração de fenol é normalizada pela densidade urinária de 1,024 g/mL.

Roush e Ott⁵¹, em 1977, utilizaram o método recomendado pelo NIOSH para análise de fenol na urina de trabalhadores expostos ao benzeno, sugerindo a saturação da urina hidrolisada com cloreto de sódio, para aumentar o rendimento da extração com éter isopropílico.

Fell e Lee¹⁹, em 1976, descreveram um método de cromatografia gasosa com coluna capilar para análise de fenol na urina. A urina foi hidrolisada em pH 5,0 com "Helix pomatia" a 37°C por 6 h, e o fenol foi extraído com éter etílico e derivatizado com trimetilsilano, sendo cromatografado em coluna capilar de vidro com fase estacionária OV-101 e detecção por ionização em chama.

Spiegel e Opar⁵⁶, em 1978, aperfeiçoaram um método cro-

matográfico para análise de fenol na urina. Eles utilizaram hidrólise enzimática com Glusulase, extração com éter isopropílico, álcool benzílico como padrão interno e uma coluna de vidro recheada com polietileno glicol 6000 10% sobre Anakrom ABS. Foram analisadas urinas em que a densidade estava entre 1,010 e 1,030 g/mL, sendo a concentração de fenol normalizada pela densidade urinária de 1,024 g/mL, apesar do valor médio observado no estudo ser de 1,019 g/mL. Foram feitas também análises por cromatografia em camada delgada utilizando como eluente uma solução de clorofórmio e acetona na proporção de 9:1.

Van Roosmalen, Purdham e Drummond⁶⁴ detectaram algumas falhas nos métodos existentes, tais como: hidrólise insuficiente, perda de fenol no aquecimento e baixo rendimento na extração. Nas extrações simples o rendimento era de 50-60% e nas extrações com prévia saturação salina o rendimento aumentava para 80%, mas algum material estranho poderia estar sendo extraído. Para suprir estas falhas eles sugeriram então, o uso de destilação a vapor para hidrolisar a amostra e extrair o fenol. Ácido sulfúrico foi utilizado para hidrólise, uma solução o-etil fenol em acetona como padrão interno e a hidrólise e a extração (com água) foram feitas em um aparelho semelhante ao soxhlet. Para análise cromatográfica utilizou-se uma coluna de vidro, recheada com Tenax G.C.

Kalman³⁴, em 1980, utilizou coluna capilar de sílica fundida com F.E. SE-30 para análise de fenol, comparando diferentes técnicas de injeção e diferentes métodos de conexão da coluna ao D.I.C. concluindo que a melhor técnica é de injeção

"on-column".

Lisi e Grossi³⁶, em 1984, relataram o método utilizado para determinação de fenol na urina dos trabalhadores da USIMINAS (MG). Para hidrólise dos fenóis conjugados eles utilizaram HCl 12,5 N a 100°C por 30 min. A extração foi feita com éter isopropílico e os fenóis foram analisados em uma coluna empacotada com carbowax 20 M sobre Chromosorb W.

Anami e Martins¹, em 1985, testaram vários tipos de fase estacionária e a que se mostrou mais adequada na determinação de fenol urinário foi a S.P. 2100. Para hidrólise dos fenóis conjugados utilizou-se HCl 12,5 M a 100°C por 30 min. O padrão interno utilizado foi solução de 3,5-dimetilfenol em NaOH 0,01 N e a extração foi feita com éter etílico. As urinas analisadas foram padronizadas pela densidade de 1,024 g/mL e também pela determinação de creatinina urinária.

MÉTODOS ANALÍTICOS EMPREGADOS NA DETERMINAÇÃO DO FENOL URINÁRIO

Para análise de fenol na urina geralmente se utilizam métodos colorimétricos ou cromatografia gasosa (C.G.). Nos métodos colorimétricos há interferência dos cresóis, como o para cresol, que está normalmente presente na urina em grandes quantidades, e é co-determinado. Por outro lado, a C.G. não apresenta estas desvantagens, pois há uma completa separação entre o fenol e os cresóis.

A colorimetria comum baseia-se na comparação visual da coloração da solução problema com as colorações de soluções padrões semelhantemente desenvolvidas. Este método possui um erro relativo de 5%. O método colorimétrico mais utilizado é a absorciometria que baseia-se na medida da transmitância ($T = P/P_0$) e no relacionamento desta à concentração da espécie absorvente.

A cromatografia é um método físico-químico de separação no qual misturas complexas são fracionadas pela distribuição de

seus componentes entre duas fases: uma móvel (F.M.) e outra estacionária (F.E.).

Quando a F.E. (líquida ou sólida) é depositada sobre superfícies planas caracteriza-se a Cromatografia Planar que só utiliza F.M. líquida. Quando a F.E. (líquida ou sólida) é introduzida em um tubo (coluna cromatográfica) caracteriza-se a cromatografia em coluna que utiliza fase móvel líquida (cromatografia líquida) ou fase móvel gasosa (cromatografia gasosa).

Na cromatografia em coluna a amostra é introduzida na F.M. que passa continuamente, pela F.E., a uma velocidade constante. Forma-se então um equilíbrio dos componentes da amostra entre a fase móvel e a fase estacionária ($S_{F.M.} = S_{F.E.}$) e as substâncias começam a migrar de acordo com as interações físico-químicas que cada molécula sofre, individualmente. Na saída da coluna acopla-se um detector, que detecta as substâncias separadas e transmite para um registrador um sinal proporcional à sua concentração.

A cromatografia gasosa utiliza como F.M. um gás, normalmente inerte, puro e selecionado de acordo com o detector utilizado. A F.E. pode ser um sólido (cromatografia gás-sólido - C.G.S.), neste caso a retenção seletiva dos componentes da amostra é devida a fenômenos de adsorção e desorção. E a F.E. pode ser um líquido (cromatografia gás-líquido - C.G.L.). Este líquido pode ser depositado na superfície de um sólido inerte, ou na parede do tubo que forma a coluna. Neste caso o processo é de adsorção, ou partição.

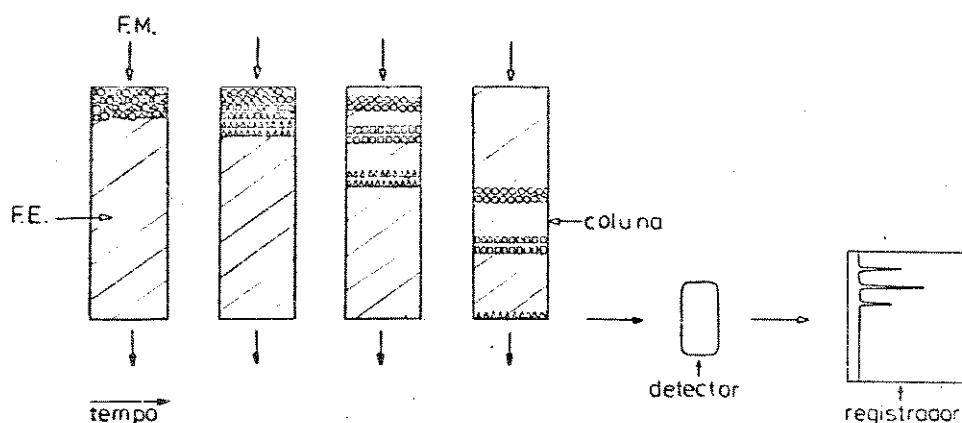


Figura 3.1 - Sequência de Eventos na Separação Cromatográfica

As colunas de C.G. podem ser classificadas em recheadas e capilares. As colunas recheadas possuem diâmetro interno de 1 a 4 mm, comprimento⁶ de 1 a 3 m e são densamente recheadas com partículas sólidas desagregadas sendo o sólido a F.E. ou o suporte. As colunas capilares possuem diâmetro interno na ordem de 0,010-0,75 mm, comprimento de 5-150 m e a F.E. apenas recobre a parede interna da coluna deixando um orifício no seu interior.

3.1 - Cromatografia Gasosa Capilar

As colunas capilares para C.G. geralmente apresentam uma grande eficiência, superior à obtida com colunas recheadas, para separar misturas complexas em pequenos intervalos de tempo. Um exemplo típico é a análise de um perfume, mostrada na fig. 3.2, onde se observa que com uma coluna recheada de 1,5 m de comprimento obtém-se 16 picos enquanto que com uma coluna capilar obtém-se mais de 30 picos da mesma amostra²¹.

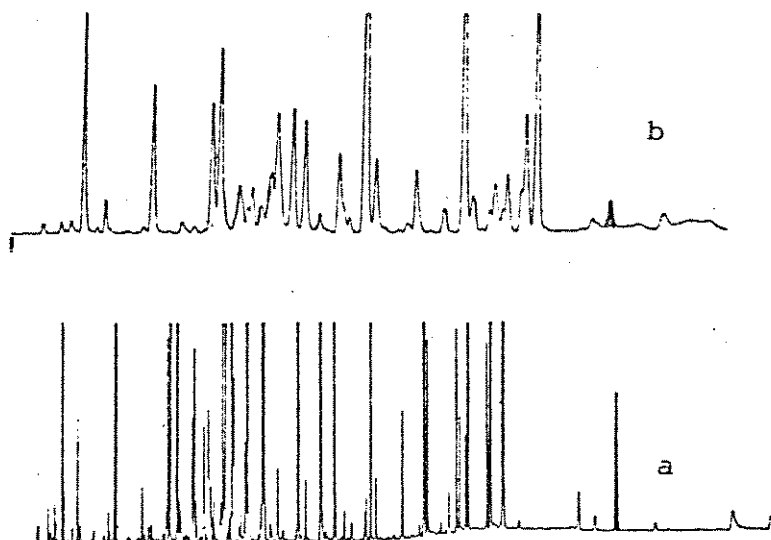


Figura 3.2 - Comparação da separação de uma amostra de perfume feita com uma coluna capilar (a) e uma - coluna recheada (b), ambas com F.E. carbowax 20 M e sob as mesmas condições.

3.2 - Coluna Capilar

A principal parte de um cromatógrafo é, sem dúvida nenhuma, a coluna. Colunas capilares são tubos abertos, longos e de diâmetro interno pequeno.

Existem diversas terminologias^{6,24} utilizadas para designar as várias colunas. Na tabela 3.2 estão descritas algumas delas.

Tabela 3.2 - Terminologia de Colunas Capilares

SIGLA	SIGNIFICADO EM INGLÊS	NOME EM PORTUGUÊS
W.C.O.T.	Wall-Coated Tubular Column	Coluna capilar com parede recoberta com um filme de F.E.
S.C.O.T.	Support-Coated Open Tubular	Coluna capilar com suporte recoberto com F.E. líquida
P.L.O.T.	Porous-Layer Open Tubular	Coluna capilar com camada porosa
W.T.O.T	Wall-Treated Open Tubular	Coluna capilar com parede tratadas
F.S.O.T	Fused Silica Open Tubular Column	Coluna capilar de sílica fundida
W.B.O.T	Wall-Bonded Open Tubular	Coluna capilar com F.E. quimicamente ligada à parede do tubo

A primeira coluna do tipo W.C.O.T²⁴ foi fabricada com Tygon (cloreto de polivinila) que apresenta as inconveniências de ser útil apenas em baixo intervalo de temperatura (36 a 93°C), além de ter força mecânica, inércia e durabilidade limitadas.

Posteriormente foram empregados tubos de aço inoxidável, que são inflexíveis, difíceis de quebrar e podem ser operados a altas temperaturas, mas possuem a desvantagem de apresentarem superfícies internas irregulares e de ter reatividade inaceitável para algumas aplicações.

Na década de 60, D.H. Desty²⁴ iniciou o uso de tubos capilares de vidro, que apresenta a vantagem de ser de baixo custo e transparente, mas tem a desvantagem de ser frágil e quebrar com facilidade quando manuseado. A composição química do vidro é fortemente polar e a sua superfície deve ser tratada para ser desativada, antes da aplicação da fase estacionária.

Em 1979, Dandeneau e Zerenner²⁴ introduziram as colunas de sílica fundida. Estas colunas têm a vantagem de serem inertes, pois a sílica amorfa é livre de metais (< 1 ppm) e sua moldagem a altas temperaturas inibe a reidratação da superfície. A sílica fundida é fabricada por fibras óticas e sua parede externa é recoberta com poliamida para que a coluna adquira resistência mecânica. As paredes internas são inerentemente planas e o tubo tem uma grande flexibilidade, facilitando a conexão ao injetor e detector do cromatógrafo.

O diâmetro interno de colunas capilares varia entre 0,010mm a 0,35 mm, enquanto que o diâmetro interno das colunas denominadas "Megabore" está entre 0,50 a 0,75mm. Geralmente a eficiência de uma coluna capilar aumenta com o decréscimo do diâmetro interno da coluna. Mas o que deve ser sempre levado em consideração é a duração da análise, sensibilidade do detector,

eficiência requerida e capacidade de amostragem, bem como o tipo e a quantidade de amostra.

O comprimento das colunas capilares varia entre 5,0 a 150,0m. A resolução está relacionada a raiz quadrada do comprimento da coluna²⁴. Por exemplo, para duplicar a resolução, mantendo-se constante as demais condições, necessita-se quadruplicar o comprimento da coluna.

As colunas capilares geralmente estão associadas a eficiência e resolução altas, análises rápidas, e eliminação no alargamento das bandas devido à irregularidades no enchimento. As desvantagens das colunas capilares são: pequena quantidade de amostra que pode ser injetada (limite necessário à detectabilidade) e amostras não representativas devido à discriminação no momento da injeção, ocasionadas pelo divisor de amostras.

3.3 - Sistema Cromatográfico

3.3.1 - Gás de Arraste

A fonte do gás de arraste (fase móvel na cromatografia gasosa) é um cilindro contendo o gás sobre alta pressão, este gás arrasta as substâncias presentes na amostra através da coluna e fora dela, quando elas deixarem de interagir com a fase estacionária. Os gases de arraste mais empregados na cromatografia com colunas capilares são H_2 , Ne, He e Ar. O gás de arraste deve ser inerte para evitar interação com a amostra ou a fase estacionária, barato, disponível e compatível com o detector usado. Ele

deve também, ser puro, isento de água, oxigênio e substâncias orgânicas, para uma maior durabilidade da coluna cromatográfica. É, portanto, aconselhável o uso de um sistema de remoção destas eventuais impurezas do gás, entre o cilindro e o cromatógrafo.

3.3.2 - Injetor

O injetor é o sistema utilizado para introduzir a amostra na coluna. O injetor deve ser aquecido para que ocorra vaporização total e instantânea da amostra. O injetor deve ser mantido em uma temperatura alta, mas não em demasia para evitar que ocorra decomposição catalítica no vaporizador metálico ou vaporização e decomposição térmica do septo.

A amostra deve ser injetada instantaneamente, com uma boa técnica de injeção, para que se obtenha picos simétricos e reprodutíveis.

A injeção pode ser feita através de válvulas ou microseringas. Normalmente, as microseringas são mais utilizadas apesar de terem menor reprodutibilidade, pois pode ocorrer uma pré-volatilização do solvente dentro da agulha, e há necessidade de uma técnica de injeção aprimorada.

3.3.3 - Divisor de Amostras

Devido ao volume interno pequeno das colunas capilares que exigem que a fase estacionária seja aplicada sob a forma de filmes finos, é necessário que a quantidade de amostra que chega até a coluna seja pequena. Para que isto seja conseguido utiliza-

se um divisor de amostras, que se situa entre o injetor e a coluna.

O divisor recebe a amostra, vaporizada pelo injetor, e a divide em duas porções desiguais, sendo que, a menor delas vai para a coluna. As razões de divisão podem ser de 10/1 a 500/1. Geralmente as maiores razões de divisão proporcionam as maiores resoluções.

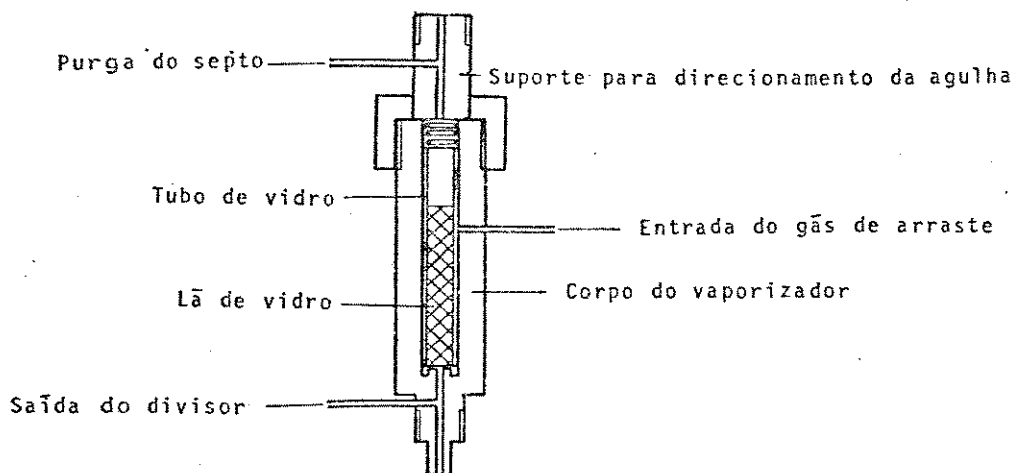


Figura 3.3 - Tubo de Vaporização para Homogeneizar a Amostra Injetada

O divisor pode ser utilizado para diversas finalidades tais como aumentar a eficiência da transferência de calor da amostra injetada, misturar a amostra volatilizada e prevenir a

entrada de material não volátil na coluna. O tubo de volatilização utilizado neste trabalho está ilustrado na fig.3.3. A amostra é injetada com a agulha que passa através de um septo de entrada convencional, em um pequeno volume, que está a uma temperatura elevada. Ela é vaporizada, misturada com o gás de arraste e enviada ao tubo de vaporização para que a mistura seja efetivada. Então a amostra é dividida em dois caminhos: um vai para a coluna capilar e o outro é purgado para a atmosfera por meio de uma purga de vazão ajustável.

O divisor funcionou como fluxo de purga contínua e a razão de divisão (R.D.) foi calculada pela fórmula :

$$R.D. = \frac{F_C}{F_C + F_P}$$

onde: F_C = vazão da coluna

F_P = vazão da purga do divisor

A vazão da coluna é obtida através da relação entre o volume da coluna (V_C) e o tempo morto.

$$V_C = \pi r^2 L$$

r = raio da coluna; metade do diâmetro interno da coluna

L = comprimento da coluna.

A vazão de purga do divisor foi medida com um bolhômetro.

Além do tipo de injeção com divisor existem outros tipos:

- Injeção "Splitless" , onde a amostra é injetada em um tubo de

vaporização (fig. 3.3), do qual se retira a lâ de vidro, e não há divisão de amostra. Este tipo de injeção é utilizado em análises de traço, quando é necessário ter grandes quantidades de amostra chegando na coluna para se obter uma sensibilidade adequada. Neste tipo de injeção é essencial o uso de programação de temperatura, pois a técnica depende de uma reconcentração, na cabeça da coluna, do soluto vaporizado. Portanto, a amostra é injetada, mantendo-se a temperatura da coluna próxima ao ponto de ebulição do solvente e depois da eluição deste, é aquecida até a temperatura de análise.

- Injeção "on-column", a amostra é injetada diretamente na coluna capilar sem utilizar o tubo de vaporização. Como na injeção "splitless" a amostra necessita ser concentrada na cabeça da coluna, e a injeção é feita com a coluna em uma temperatura próxima do ponto de ebulição do solvente. A desvantagem desta técnica é que materiais não voláteis da amostra são depositados diretamente na coluna e podem acumular na mesma, causando perda da eficiência e inativação da coluna capilar.

3.3.4 - Forno

A finalidade do forno é controlar a temperatura da coluna cromatográfica durante a análise. O controle da temperatura da coluna é um dos fatores mais importantes para obtenção de um bom desempenho cromatográfico.

O tempo de retenção é muito afetado pela variação da temperatura da coluna e geralmente um decréscimo de 30°C duplica

o tempo de retenção. A temperatura selecionada para a coluna deve ser suficientemente alta para eluir os componentes em um tempo razoável, sem causar decomposição térmica da amostra ou sangria da F.E., porém suficientemente baixa para que a separação se efetue. Em temperaturas menores há melhores separações porque há maior solubilidade dos componentes da amostra na fase estacionária. Mas, ao se diminuir a temperatura o tempo de análise aumenta.

O forno pode ser operado isotermicamente ou com programação de temperatura. A maior utilidade da programação de temperatura é para amostras de composição desconhecida, pois neste caso o uso de operação isotérmica poderia causar a não eluição dos componentes com temperatura de ebulição superior ou a sua eluição retardada, com picos pequenos e de má resolução; e os componentes de baixo ponto de ebulição poderiam ter seus picos sobrepostos com o pico do solvente.

3.3.5 - Detector

Em cromatografia capilar pode ser usado qualquer tipo de detector normalmente disponível para cromatografia gasosa. Os detectores de maior sensibilidade como detector por ionização em chama (D.I.C.) ou detector por ionização por argônio são os mais adequados, pois devido ao diâmetro reduzido das colunas capilares, o tamanho da amostra também é pequeno.

Como o volume da coluna é muito reduzido pode ocorrer alargamento das bandas se no final da coluna não tiver uma área

de alta velocidade de gases. Além disso, todo detector de cromatografia gasosa tem um desempenho ótimo em vazões de gás de arraste maiores que as normalmente utilizadas em colunas capilares. Por exemplo um D.I.C. tem melhores sensibilidades com vazões do gás de arraste de 30 mL/min. Para aumentar a velocidade linear e diminuir o tempo de residência dos componentes na cela do detector deve-se utilizar um gás complementar, que minimiza o alargamento das bandas e aumenta a sensibilidade do detector.

3.4 - Eficiência da Separação

O meio mais prático de expressar a eficiência de uma coluna é através do número de pratos teóricos (n). Um prato teórico corresponde a uma etapa de equilíbrio do soluto com a fase estacionária e fase móvel; portanto, quanto maior o número de pratos teóricos, maior o número de equilíbrios e maior será a eficiência, sendo que picos mais estreitos são obtidos. O número de pratos teóricos é definido por :

$$n = (t_r / \sigma)^2 \quad (1)$$

onde

t_r = tempo de retenção do pico

σ = desvio padrão do pico

O desvio padrão do pico está relacionado à largura da base do pico:

$$\sigma = \frac{w_b}{4} \quad (2)$$

substituindo-se (2) em (1) obtem-se :

$$n = \frac{(t_r)^2}{(W_D/4)^2} = 16 (t_r / W_D)^2 \quad (3)$$

Uma equação equivalente é:

$$n = 5,54 (t_r / W_h)^2 \quad (4)$$

onde W_h = largura a meia altura

O número de pratos teóricos depende do comprimento da coluna (L), sendo utilizada a altura equivalente a um prato teórico (h) para comparar colunas de diferentes comprimentos:

$$h = \frac{L}{n} \quad (5)$$

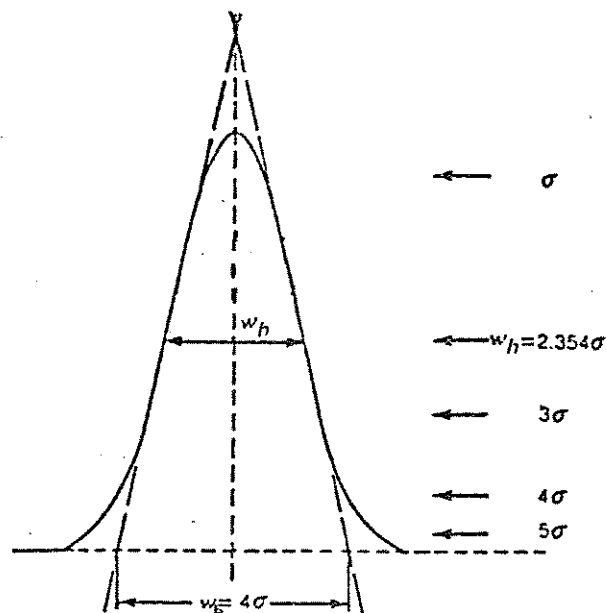


Figura 3.4 - Relação entre W e σ em pico Gaussiano

A altura equivalente a um prato teórico pode ser descrita pela equação de Van Deemter (6), que descreve o desempenho da coluna cromatográfica, relacionando h à velocidade linear do gás de arraste e fatores que provocam o alargamento de picos. Esta equação é expressa da seguinte forma:

$$h = A + \frac{B}{\mu} + C \mu \quad (6)$$

A é o termo da difusão turbilhonar que se refere ao alargamento do pico devido aos múltiplos caminhos seguidos pelas moléculas de um componente ao longo de uma coluna empacotada. Para minimizar o termo A é necessário usar colunas com diâmetros internos pequenos, bem recheadas e partículas com diâmetros pequenos e uniformes^{6, 21}. O termo A é nulo para colunas capilares.

B é o termo relacionado ao alargamento longitudinal do pico devido a difusão molecular do soluto na fase móvel. Quanto maior a capacidade do soluto em se difundir no gás de arraste, maior o alargamento do pico; portanto, há uma perda na eficiência da coluna. O aumento da densidade do gás de arraste, por um aumento na sua massa molecular ou na pressão, provoca uma diminuição na difusão do soluto. É preferível, quando possível, o uso de nitrogênio ou argônio como fase móvel, devido a suas maiores massas moleculares. A diminuição na velocidade linear do gás de arraste provoca um aumento na largura dos picos⁶.

O termo C está relacionado a facilidade de transferência das moléculas do soluto entre a fase móvel e a fase estacionária.

Quando a fase estacionária é líquida, tem-se um filme recobrindo as partículas do suporte e quanto maior for a espessura deste filme, maior será o termo C, e menor a eficiência da coluna. Um filme fino de fase líquida com baixa viscosidade produz separações mais eficientes⁶.

A velocidade linear média do gás de arraste, μ , é determinada por:

$$\mu = \frac{L}{t_m} \quad (7)$$

onde t_m é o tempo de retenção de um componente que não reage com a F.E.

Sendo que, para colunas capilares, o termo A não existe, a equação de Van Deemter reduz-se a equação de Golay:

$$h = \frac{B}{\mu} + C \mu \quad (8)$$

O termo B é dado pela equação:

$$B = 2D_g \quad (9)$$

onde D_g é o coeficiente de difusão do soluto e tem dimensão de cm^2s^{-1} .

E o termo C é dado pela equação:

$$C = C_g + C_l \quad (10)$$

onde:

$$C_g = \frac{r^2}{D_g} \cdot \frac{1 + 6K + 11K^2}{24(1 + K)^2} \quad (11)$$

e

$$C_l = \frac{d_f^2}{D_L} \cdot \frac{2K^2}{4(1 + K)^2} \quad (12)$$

D_L = Coeficiente de difusão do sólido na fase líquida. Na Prática , C_g é muito maior que C_l porque a espessura do filme (d_f) é da ordem de 10^{-15} m. Então, a equação (8) torna-se:

$$h = \frac{2D_g}{\mu} + \frac{r^2}{D_g} \cdot \frac{1 + 6K + 11K^2}{24(1 + K)^2} \mu \quad (13)$$

OBJETIVOS

Levando-se em consideração que inúmeros trabalhadores brasileiros podem estar expostos a concentrações nocivas de benzeno, pois o benzeno tem ampla aplicação industrial. Como matéria prima para síntese de nitrobenzeno, fenol, anidrido maleico, estireno, ciclohexano, perfumes, explosivos, corantes, pesticidas, detergentes, solventes, polímeros, etc. Como solvente tem larga utilidade para extração e retificação na indústria da borracha, na fabricação de tintas, óleos, gorduras, colas, e como um agente desengordurador e clarificante na extração e remoção de produtos gordurosos de ossos, peles, couros, tecidos, fibras têxteis, plásticos e na limpeza de peças metálicas. Sua elevada volatilidade, traduzida pela secagem rápida é aproveitada na indústria gráfica, de fotogravuras, de pinturas a spray e de limpeza à seco.

A exposição a longo prazo ao benzeno produz mielopatias, podendo causar uma doença grave, a aplasia medular, que leva à morte, enquanto o efeito agudo da exposição ao benzeno é a

depressão do Sistema Nervoso Central podendo causar efeitos narcóticos a altas concentrações.

Os efeitos crônicos e agudos da exposição ocupacional ao benzeno podem ser prevenidos através da avaliação quantitativa sistemática da exposição a qual orienta a adoção de medidas necessárias à proteção da saúde dos trabalhadores expostos. Com esta finalidade podem ser efetuadas avaliações biológicas, através da quantificação da excreção de metabólitos do benzeno na urina.

Considerando as afirmações anteriores, o objetivo deste trabalho é : o aperfeiçoamento de um método de determinação do teor de fenol urinário, em trabalhadores expostos ao benzeno, para avaliação biológica da exposição . As etapas a serem investigadas e aperfeiçoadas envolvem a extração do fenol e a sua posterior determinação usando cromatografia gasosa capilar.

PARTE EXPERIMENTAL

5.1 - Reagentes

Todos os reagentes que foram utilizados eram de pureza analítica

Ácido clorídrico

Ácido Pícrico

Cloreto de Sódio

Creatinina

2, 6 Dicloroquinona-4cloramina

Éter etílico

Éter isopropílico

Fenol

Hidróxido de Sódio

Isopropanol

Meta-cresol

Nitrobenzeno

Orto-cresol

Para-cresol

Pentano

Piridina

Sulfato de Magnésio

Tetra metil amônio

Tolueno

Undecano

5.2 - Instrumentos

- cromatógrafo a gás modelo C.G. 370 capilar
(Instrumentos Científicos C.G. Ltda)

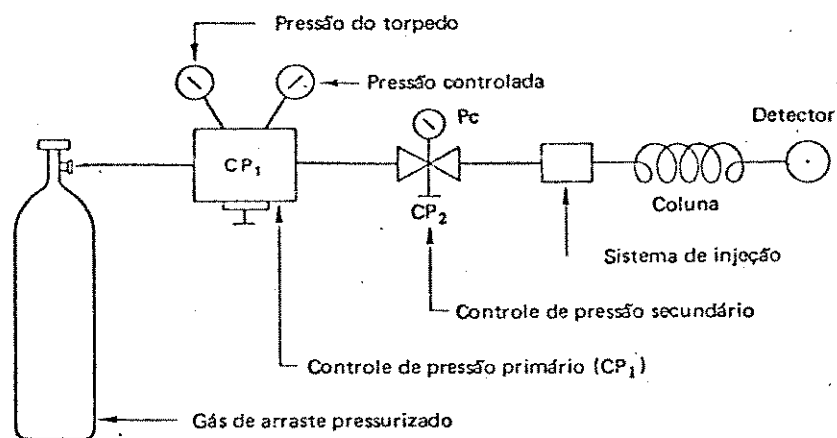


Figura 5.1 -Esquema do Cromatógrafo a gás.

- Detector por Ionização em Chama

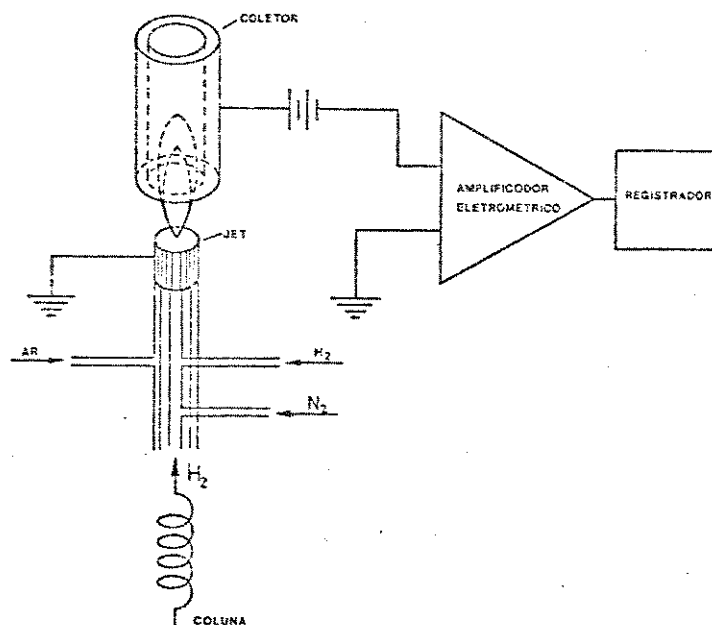


Figura 5.2 - Esquema de um Detector por ionização em chama

O gás de arraste, hidrogênio, sai da coluna e se mistura com nitrogênio. Estes gases mais o ar sintético constituem uma chama onde um número relativamente pequeno de íons são formados. Entretanto, quando um composto orgânico é introduzido na chama há um grande acréscimo do número de íons presentes. Os íons assim produzidos são recolhidos pelo coletor acarretando uma queda de voltagem que é então ampliada pelo amplificador eletrométrico e enviada ao registrador.

- Registrador Potenciométrico
- Modelo Instrumentos Científicos C.G. Ltda
- Modelo Servogor
- Modelo RB101, Equipamentos Científicos do Brasil
- Coluna Capilar de vidro

Diametro interno de 0,2 mm, 18 metros de comprimento com fase estacionária OV-101.

- Coluna Capilar de Sílica fundida tipo "Megabore"

Diametro interno 0,53 mm e 10 metros de comprimento com fase estacionária HP-5 (5% fenil-metil silicone) com 2,23 mm de espessura de filme, tipo ligação cruzada.

- Espectrofotômetro modelo B832 da Micronal com registrador de feixe duplo.

- Potenciômetro modelo B274 da Micronal com eletrodo indicador de aço inoxidável 316-L e o eletrodo referencia uma liga de níquel-cromo.

- Espectrofotômetro Zeiss modelo PM 2D

- Bomba peristáltica Ismatec modelo MP 136J-4

- Microbureta Metrohm modelo E-457

5.3 - Purificação de Fenol

O fenol é um sólido cristalino de coloração branca. É uma substância higroscópica e seu ponto de fusão é de 43°C.

Inicialmente foi utilizado fenol (P.A.) da Fisher Scientific Company que foi purificado pelo seguinte método :

Dissolveu-se 1,0 g de fenol em éter dietílico (anteriormente destilado) e passou-se a solução para uma seringa hipodérmica de vidro de 5,0 mL que continha sulfato de magnésio

anidro para eliminar água. Injetou-se a solução filtrada (colocando-se algodão na agulha) em um frasco sob atmosfera de nitrogênio para evaporar o éter. O nitrogênio passou por um sistema de borbulhamento em ácido sulfúrico (para eliminar a água) e num segundo estágio através de um tubo contendo pastilhas de NaOH (para neutralizar os ácidos). Os cristais obtidos através desta purificação se fundiam após alguns dias, indicando que a eliminação da água foi insuficiente.

Foi feita, portanto, uma destilação sob pressão reduzida para a purificação deste fenol, denominado fenol I.

Obteve-se também um fenol II com a especificação do fabricante de 99,85% de pureza. Para verificar o teor de pureza destes fenóis fez-se uma titulação potenciométrica⁴⁰:

A titulação potenciométrica é uma titulação automática, feita em meio não aquoso, utilizando piridina como solvente de titulação, e como titulante hidróxido de tetrametil amônio 0,1 N em piridina e isopropanol 1:1 (v/v). A adição da solução titulante foi contínua com registro automático da curva de titulação. O registro automático das curvas foi feito com o registrador ECB, modelo RB 101, em 100 mV com a velocidade de papel de 2,0 cm/min. As leituras de potenciais foram feitas com o potenciômetro modelo B-274 da Micronal. O eletrodo indicador era de aço inoxidável 316-L e o eletrodo referência era uma liga de níquel-cromo. Foi utilizado um propulsor de seringa (hipodérmica de vidro OMEGA de 20 mL) para adição de solução titulante.

As curvas foram obtidas na forma de primeira derivada da

curva de titulação, utilizando-se um derivador construído no Laboratório de Pesquisa do professor O.E.S. Godinho, no I.Q. UNICAMP.

5.4 - Testes de Perda de Fenol

O método inicialmente escolhido para determinação de fenol na urina consistia em adicionar quantidades de ácido clorídrico 12 M à amostra de urina em um tubo de ensaio com tampa de rosca e aquecer em banho-maria a 100°C por 30 min. Esta é uma etapa crítica do método, pois, devido à alta volatilidade do fenol, podem ocorrer perdas consideráveis, tanto durante o aquecimento, caso os tubos não apresentem perfeita vedação, como no instante dos tubos serem abertos.

Para constatar este fato foi feito o teste descrito por Feigl e Jungreis¹⁸, foram preparadas soluções de fenol em água de concentração de 0,10 mg/L até 10,0 mg/L. Colocou-se 5,0 mL de solução de cada concentração em um tubo de ensaio, cobrindo-se os tubos com discos de papel de filtro impregnados com uma solução saturada de 2,6 dicloroquinona-4-cloramina em tolueno. Aqueceu-se a solução em banho-maria a 100°C por 30 min. Os papéis foram retirados e tratados com vapores de amônia. Uma mancha azul indicou a presença de fenol volatilizado, constatando a perda de fenol em todos os casos.

5.5 - Análise por Cromatografia Gasosa

5.5.1 - O cromatógrafo a gás

No cromatógrafo a gás CG370 equipado com detector por ionização em chama foram utilizadas as seguintes vazões de gases para o detector:

- 300 mL/min de ar sintético (gás para a chama);
- 30 mL/min de hidrogênio (gás para a chama);
- 30 mL/min de nitrogênio (gás de complementação).

Esta relação do 30:30:300 mL/min para os gases foi escolhida por ser a relação ideal de vazões de gases para este tipo de detector^{9, 35}.

O hidrogênio também foi utilizado como gás de arraste, com purga de divisão contínua. A vazão de purga do septo foi de 20 mL/min.

As medidas de vazão foram efetuadas com bolhômetro (fig. 5.3). Pressionando o bulbo de borracha a solução detergente sobe e tampa a entrada do gás que, por sua vez arrasta um filme da solução através do tubo de vidro. Este tubo tem volume calibrado de 20 mL, e o tempo gasto pelo filme para percorrer este volume corresponde à vazão do gás, em mL/min.

Por exemplo quando o filme percorre os 20 mL durante 10 s a vazão do gás será :

$$V_{\text{gás}} = \frac{60\text{s/min} \times 20\text{mL}}{10\text{s}} = 120\text{mL/min}.$$

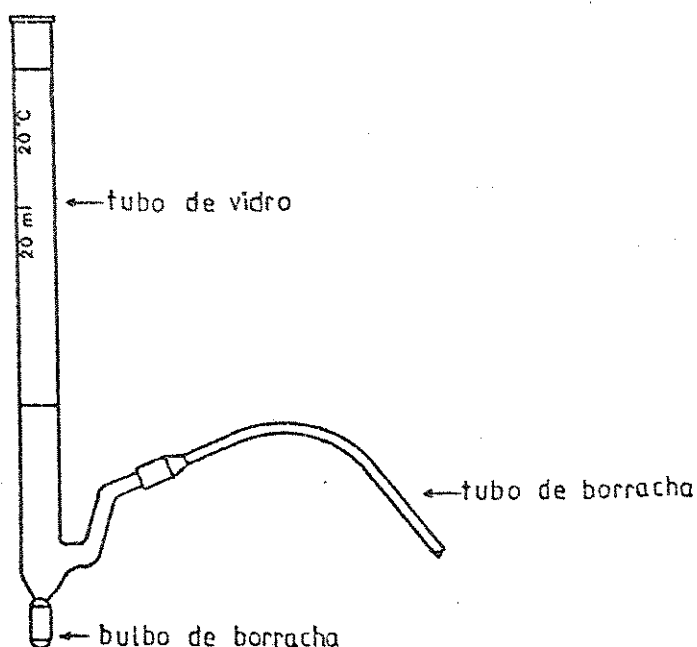
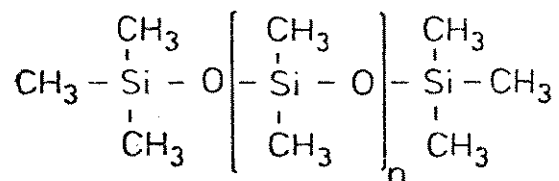


Figura 5.3 - Bolhometro de Filme

5.5.2 - A Coluna Capilar de Vidro

A coluna capilar de vidro que foi utilizada continha como fase estacionária OV-101, que é uma metil silicone com a seguinte estrutura:



Esta fase OV-101 é apolar e é similar a fase estacionária SP2100 utilizada e recomendada por Anami¹.

A coluna capilar de vidro apresentou diversas quebras nas junções com o detector e o vaporizador. Nestes locais a coluna deve ser reta, para que possa ser instalada, e a linearidade é obtida através de aquecimento com chama direta. Esta operação ocasionava um destemperamento do vidro tornando as extremidades mais suscetíveis a quebras. Foi feita então uma junção nas extremidades da coluna capilar de vidro com pedaços de capilar de sílica fundida (fig 5.4). Este ajuste facilitou a adaptação da coluna, evitando as quebras nas junções com o detector e o vaporizador.

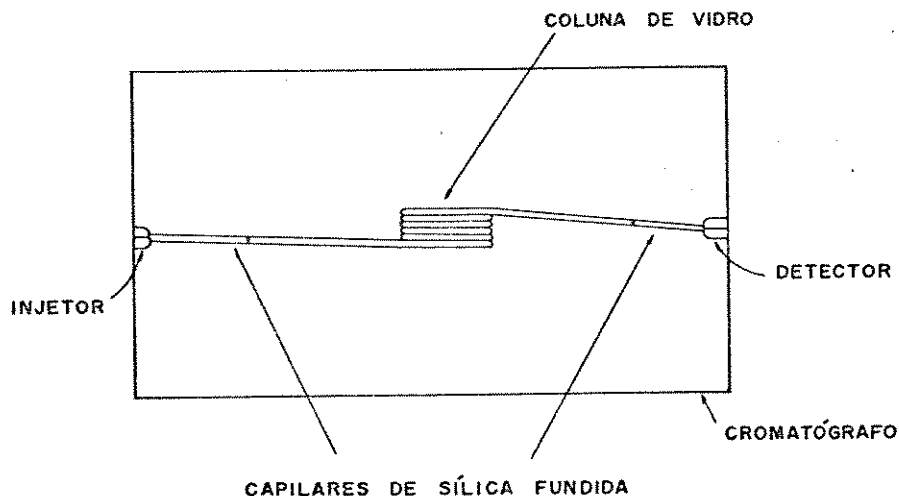


Figura 5.4 - Ajuste da Coluna Capilar de Vidro com Capilares de Sílica Fundida

Foram feitos os seguintes testes com esta coluna:

a) Medidas do tempo morto

O tempo morto (t_m) é a medida do tempo de retenção de uma

substância que não é retida pela fase estacionária sendo portanto o tempo que a fase móvel gasta para percorrer a coluna.

Para se fazer a medida de t_m , utilizou-se butano (gás liquefeito de petróleo - GLP). As injeções foram feitas em diferentes temperaturas da coluna.

b) Cálculo do número de pratos teóricos

O conceito de pratos teóricos foi originalmente utilizado em colunas de destilação, onde historicamente as primeiras colunas eram compostas de pratos discretos. No laboratório entretanto as colunas de destilação são recheadas e o número de pratos teóricos é utilizado para se avaliar a eficiência da coluna.

Também em cromatografia o número de pratos teóricos é um conceito artificial usado para calcular o número de estágios de equilíbrios teóricos dentro da coluna.

c) Análise de fenol com a coluna capilar de vidro

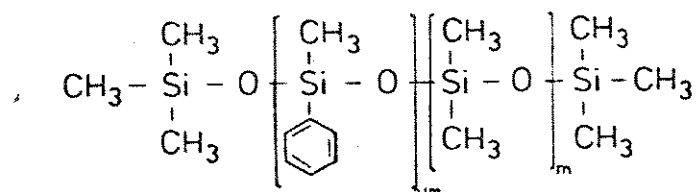
Foram preparadas, em balões calibrados de 5,0 mL, soluções de fenol em éter isopropílico de concentrações: 56,4 mg/L, 94,0 mg/L, 141,0 mg/L, 188 mg/L, 211,0 mg/L, 282,0 mg/L. Fazendo-se injeções de 3,0 μ L de cada solução nas mesmas condições cromatográficas para se avaliar os picos obtidos. Posteriormente foram exploradas outras condições de análise, isto é, variou-se separadamente a atenuação, o volume injetado e a temperatura da coluna.

Constatando-se que com a coluna capilar de vidro não era possível analisar o fenol na concentração de interesse, ou seja,

de 5,0 a 50,0 mg/L.

5.5.3 - Coluna Capilar de Sílica Fundida, Tipo "Megabore"

A fase estacionária desta nova coluna também é uma metil-silicone só que ela contém 5% de fenil, sendo portanto mais polar que a metil silicone. Sua estrutura é:



A determinação do tempo morto e o número de pratos teóricos foi realizada como foi descrito para a coluna de vidro (item 5.5.2).

Para otimizações de alguns parâmetros cromatográficos, tais como: vazão dos gases no detector, vazão da coluna, temperatura do detector, temperatura do injetor e temperatura do vaporizador, foi utilizada uma solução com concentração de 56,4 mg/L de fenol em éter isopropílico.

5.6 - Sistema de Pesagem do Fenol

Sendo o fenol uma substância muito higroscópica poderia ocorrer absorção de água nos seus cristais ocasionando um erro de pesagem. Foi utilizado então um sistema fechado para se pesar os cristais (fig. 5.5):

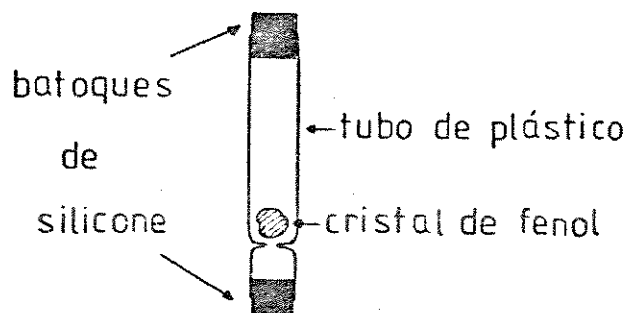


Figura 5.5 - Tubo de Pesagem do Fenol

A transferência do cristal de fenol para o tubo de pesagem foi feita em um "glove bag", utilizando-se argônio, que passava por um frasco contendo H_2SO_4 18 M para eliminar água e por um outro contendo NaOH para eliminar traços ácidos.

Para preparar a solução estoque de fenol foi utilizado um funil onde se gotejou o éter isopropílico.

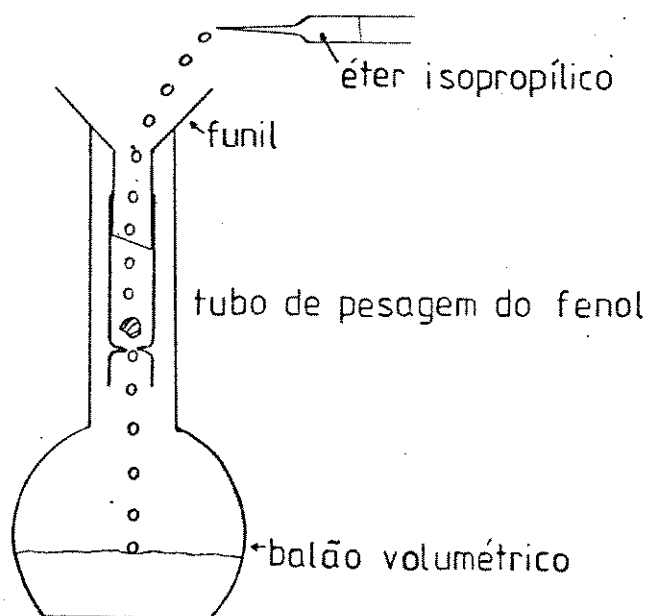


Figura 5.6 - Transferência do Fenol

As outras soluções utilizadas para construção da curva padrão foram preparadas pelo método das diluições sucessivas com volumes fixos⁶¹, com uma seringa Hamilton modelo 1000 RN de 250,0 μL com o êmbolo travado em 200,0 μL . A partir da solução estoque preparou-se uma solução de 1:1 (sol 1) e uma solução de 1:2 (sol 2) em éter isopropílico, fazendo-se a seguir diluições sucessivas de 1:1 em éter isopropílico a partir destas soluções 1 e 2.

As soluções de nitrobenzeno foram feitas pelo mesmo método de pesagem, transferência e diluições sucessivas acima descritos.

Cada solução de fenol foi colocada em um pequeno frasco de vidro onde se adicionou a solução de nitrobenzeno na proporção 1:1. O frasco foi fechado com uma tampa de pressão e outra de rosca. Os frascos fechados foram então colocados dentro de um outro frasco de vidro, fechado com tampa de rosca, embalado em plástico e conservado no congelador. Estas soluções foram assim embaladas para evitar perdas por evaporação, pois periodicamente era feita a construção da curva de calibração com as mesmas. E as curvas se reproduziram com insignificantes desvios.

5.7 - Extração por Solvente

A extração líquido-líquido é uma técnica em que uma solução (usualmente aquosa) é posta em contato com um segundo solvente (usualmente orgânico), essencialmente imiscível com o primeiro, a fim de efetuar uma transferência de um ou mais solu-

tos para o segundo solvente.

O fenol foi extraído da urina (solução aquosa) com éter isopropílico (solvente orgânico).

Foram testados dois métodos de extração, utilizando-se soluções de concentração conhecida de fenol em solução aquosa de NaCl 0,13 M.

A urina é composta de diversos sais, sendo o NaCl o de maior concentração, por isso ele foi o único utilizado na preparação das soluções de fenol. A concentração de 0,13 M é equivalente a concentração de NaCl geralmente encontrada na urina²⁵.

Os métodos de extração líquido-líquido utilizados foram:

5.7.1 - Extração em Tubo

Inicialmente fez-se a hidrólise adicionando-se, em um tubo de ensaio de 25,0 mL, 10,0 mL da solução de fenol, 2,0 mL de nitrobenzeno e 1,0 mL de ácido clorídrico 12 M. Aqueceu-se a solução em banho-maria a 100°C por 30 min. Depois que a solução esfriou foi feita a extração, adicionando-se 5,0 mL de éter isopropílico e agitando-se vigorosamente os frascos. Após resfriamento, a fase etérea foi transferida para outro frasco e 3,0 µL foram injetados no cromatógrafo a gás.

5.7.2 - Extração Líquido-Líquido Contínua

Para a extração contínua utilizou-se o aparelho da fig. 5.7.

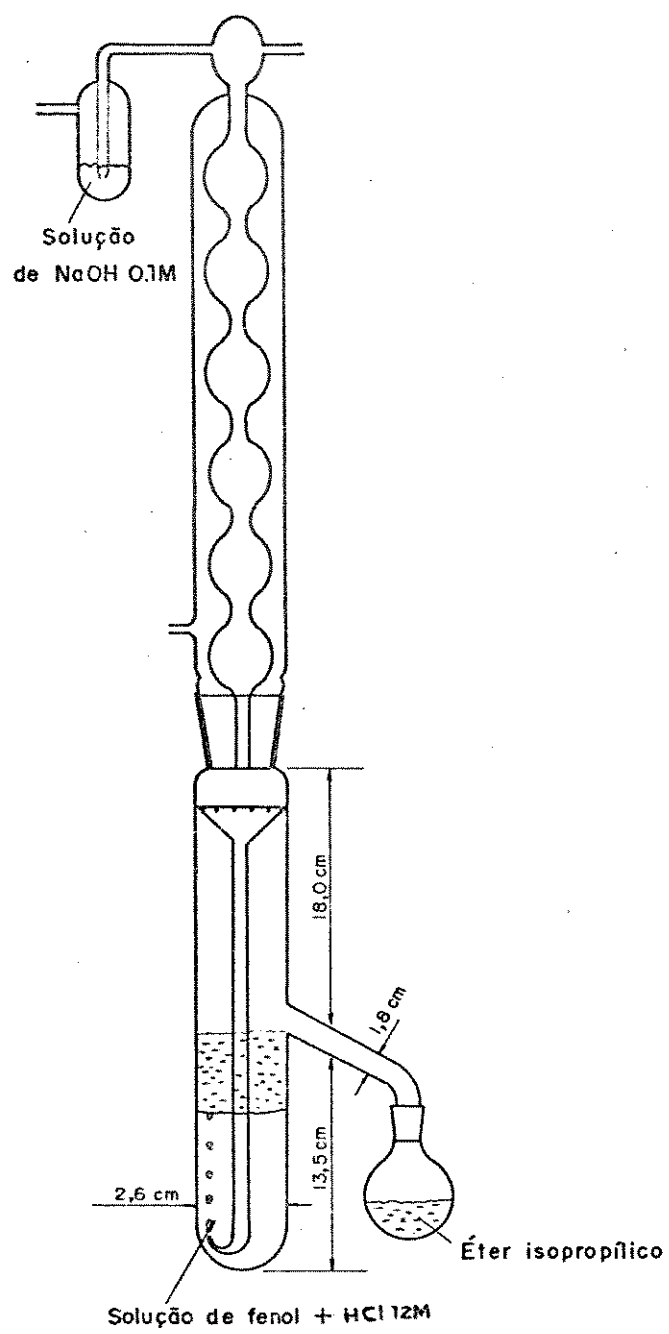


Figura 5.7 - Aparelho de Extração Contínua

No tubo extrator foi adicionado, utilizando-se uma bureta de 50,0 mL, 35,0 mL de uma solução de fenol de concentração conhecida e, com pipetas volumétricas, 2,0 mL de HCl 12 M e 2,0 mL de nitrobenzeno de concentração conhecida. Com uma bureta de 100,0 mL adicionou-se 60,0 mL de éter isopropílico no balão de 100 mL. O aparelho foi montado como mostra a fig.5.7 e o tubo que continha a solução de fenol e HCl foi aquecido em banho-maria a 100°C por 30 min (etapa correspondente a hidrólise dos fenóis que na urina são excretados conjugados com ácido sulfônico e ácido glicurônico). Após este período, retirou-se o banho-maria e depois que a solução com fenol esfriou, aqueceu-se o balão contendo éter isopropílico com uma manta de aquecimento, iniciando-se o processo de extração.

Durante a extração vapores de éter se condensaram no condensador, escoaram pelo funil e borbulharam na solução extraíndo o fenol. Então, por ser mais leve, esta solução etérea foi para a superfície e retornou ao balão, iniciando outro ciclo de extração.

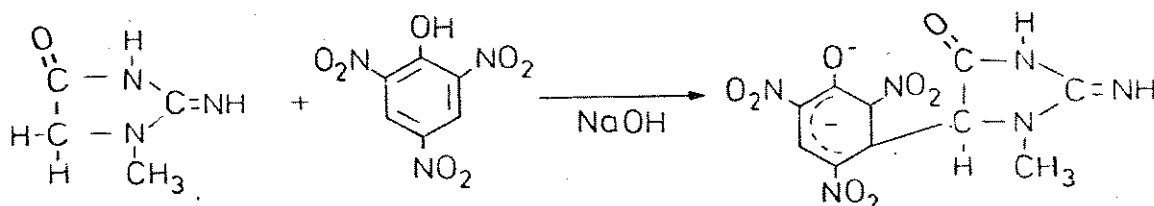
5.8 - Determinação de Creatinina

A creatinina urinária representa, sob condições fisiológicas normais, a filtração glomerular e a excreção tubular ativa (isto dá uma indicação se o rim está funcionando normalmente na filtração e excreção), sendo seu valor utilizado como valor de referencia para expressar a proporção de excreção de outros constituintes urinários.

Muitos autores^{1, 36} ajustam o valor de fenol pela densidade da urina, usando o valor médio de 1,024 g/mL. Mas, este é um valor médio obtido em um estudo realizado nos Estados Unidos da América em uma população sadia⁷³, podendo ser diferente do existente na população brasileira.

Portanto, foi decidido utilizar a creatinina urinária para normalizar a concentração de fenol em cada amostra de urina analisada.

A determinação de creatinina na urina foi feita pelo método espectrofotométrico de análise da solução alaranjada, formado pela adição de ácido pícrico em meio alcalino, através da reação de Jaffé :



5.8.1 - Método Manual

Utilizou-se ácido pícrico 0,04 M, que foi padronizado com hidróxido de sódio 0,1 M, usando fenolftaleína como indicador e Hidróxido de sódio 0,75 M;

Uma solução estoque de creatinina (1) de 1,0 mg/mL, foi preparada dissolvendo-se 0,100 g de creatinina em 100,0 mL de uma solução de HCl 0,10 M.

Para construção da curva de calibração foram preparadas soluções de creatinina com as seguintes concentrações: 3,0 mg/L, 6,0 mg/L, 9,0 mg/L, 12,0 mg/L e 15,0 mg/L. Estas soluções foram preparadas utilizando-se uma micro-bureta Metrohm modelo E-457 e balões volumétricos calibrados. Com uma pipeta graduada transferiu-se 4,0 mL de cada solução de calibração para tubos de ensaio individuais, adicionando-se a cada um 1,0 mL de ácido pícrico 0,04 M e 1,0 mL de hidróxido de sódio 0,75 M. Esperou-se 15 min e fez-se então a leitura da absorbância de cada solução a 600 nm, usando como branco uma solução contendo 4,0 mL de H₂O, 1,0 mL de ácido pícrico 0,04 M e 1,0 mL de NaOH 0,75 M.

Na análise da urina cada amostra foi diluída 1:250. E, seguindo o procedimento acima descrito, utilizou-se 4,0 mL de urina diluída, 1,0 mL de ácido pícrico 0,04 M e 1,0 mL de NaOH 0,75 M para determinar a concentração de creatinina em cada amostra de urina.

5.8.2 - Método de Análise em fluxo contínuo monosegmentado

Comparativamente, foi utilizado o método de análise em fluxo contínuo monosegmentado para a determinação de creatinina.

O sistema de análise está descrito na fig 5.8, onde C₁ e C₂ = NaCl 2%, R₁ = NaOH 0,75 M, R₂ = ácido pícrico 0,04 M, P = bomba peristáltica, A = amostra, V₁ e V₂ : válvulas de injeção dos fluidos, L₁ : volume da amostra introduzida; T = trompa d'água; I = bobina de reação; L₂ = volume da parte central da amostra, W = solução descartada.

No final da bobina de incubação I, um volume fixo de 150 μL (volume da parte central da amostra a ser analisada) é introduzido no detector, enquanto o restante da solução e as bolhas de ar são descartadas. Os fluídos são impulsionados com uma bomba peristáltica Ismatec MP13GI-4 utilizando-se tubos especiais de Tygon. As medidas espectrofotométricas foram obtidas com o uso de uma cela de fluxo de 80 μL de capacidade, adaptada a um espectrofotômetro Zeiss PM2D ($\lambda = 500 \text{ nm}$), acoplado a um registrador potenciométrico ECB-RE101.

Utilizou-se as soluções de ácido pícrico, hidróxido de sódio e creatinina anteriormente descritas.

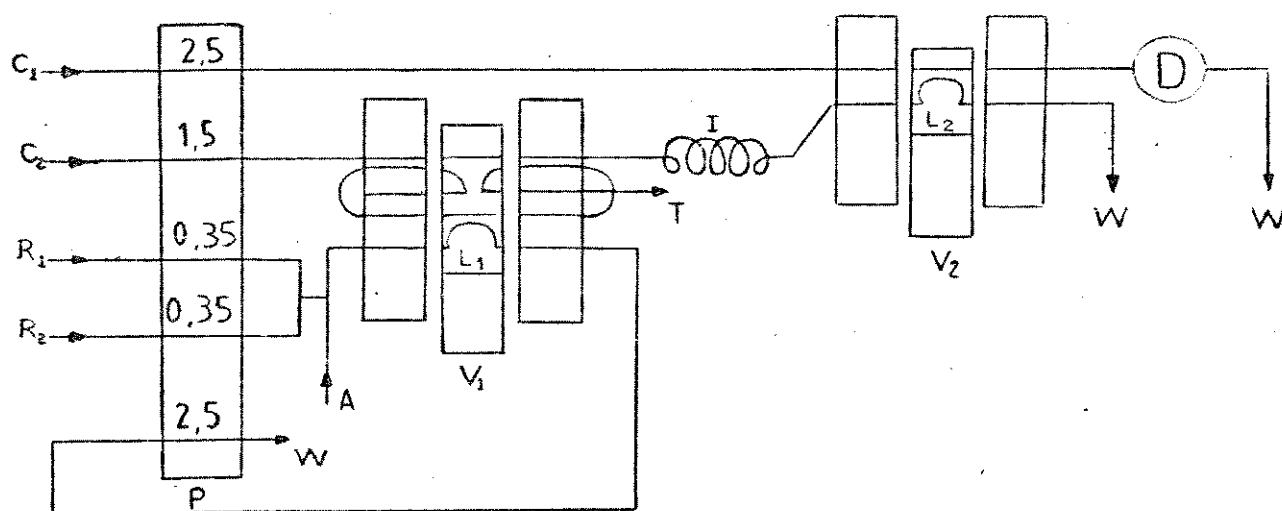


Figura 5.8 - Sistema de Análise em Fluxo Contínuo

Monosegmentado com Remoção Mecânica das bolhas de ar.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para determinar um método seguro de quantificação do teor de fenol urinário foram feitos inicialmente testes com o fenol a ser utilizado para avaliar seu teor de pureza e verificar sua volatilidade. A seguir foram determinadas as condições mais adequadas de determinação de fenol por cromatografia gasosa capilar, incluindo os métodos mais adequados para a extração do fenol e para a quantificação de creatinina.

Os resultados obtidos nestas etapas serão apresentados a seguir:

6.1 - Purificação do Fenol

Para construção da curva de calibração havia dois tipos de fenol disponíveis :

- Fenol I - destilado neste trabalho
- Fenol II - de 99,85% de pureza, especificada pelo fabricante, sendo 14 ppm de impurezas (determinada por uma

análise por cromatografia gasosa, cujo cromatograma encontra-se na fig. 6.1), e 0,084% de água.

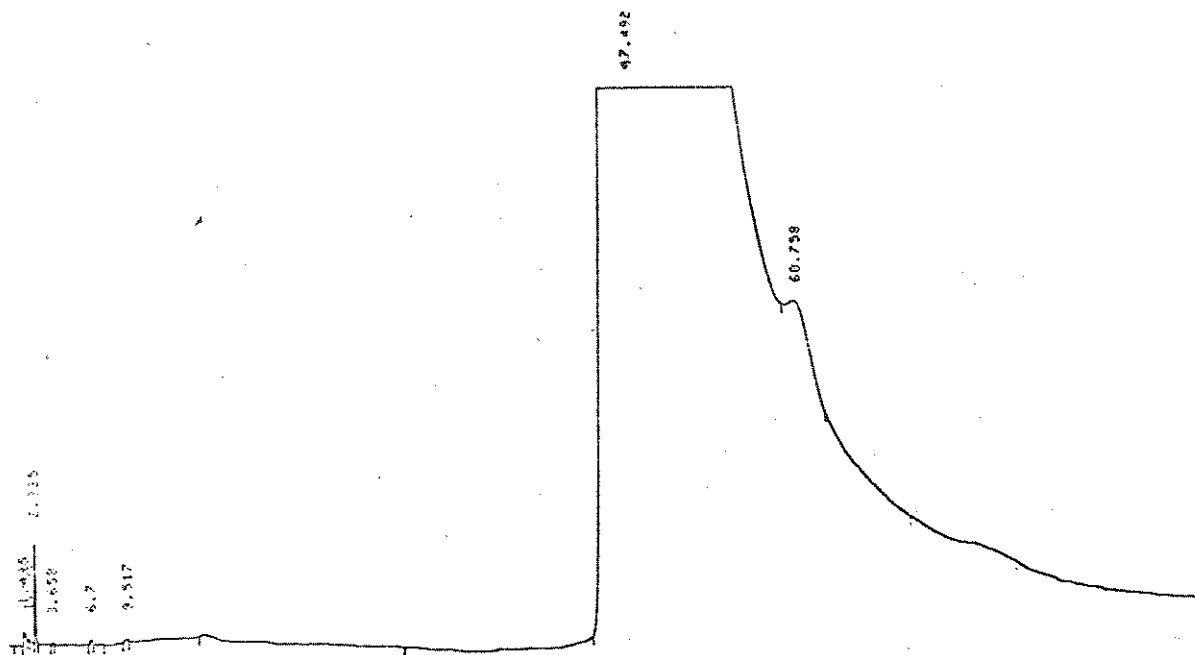


Figura 6.1 - Cromatograma do Fenol II

Para verificar o teor de pureza destes dois fenóis foi feita uma titulação potenciométrica.

Preparando-se uma solução do fenol I em piridina com concentração de 12,05 mg/L, foi determinada, pela titulação com hidróxido de tetrametilamônio 0,10 N em piridina, uma concentração de 10,67 mg/L, ou seja, um conteúdo de impurezas ao redor de 11,5%.

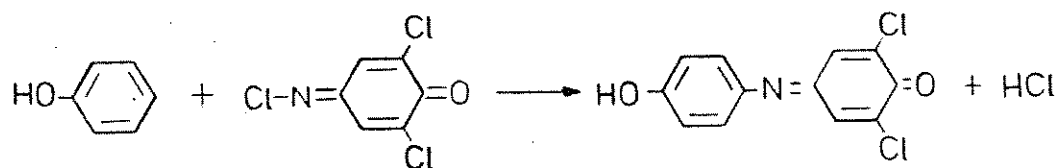
Preparando-se uma solução do fenol II em piridina de

10,18 mg/L. fez-se outra titulação com hidróxido de tetrametil amônio, obtendo-se uma concentração de 9,91 mg/L, que corresponde a impurezas de 1,9%.

O fenol II era o mais puro e foi portanto escolhido para construção da curva de calibração e para os demais testes. Sendo que o método cromatográfico utilizado pelo fabricante para determinar as impurezas deste fenol é mais preciso do que o de titulação potenciométrica, considerou-se a pureza do fenol como de 99,85%.

6.2 - Teste da volatilidade do Fenol

Utilizando como teste a reação de 2,6-dicloroquinona-4-cloramina com fenol, reação de Gibbs¹⁸ para determinação dos vapores de fenol, verificou-se que em soluções de 1,0 mg/L a 50,0 mg/L há perda de fenol por volatilidade e/ou arraste.



Reação de Gibbs

Portanto pode ocorrer perdas de fenol quando a hidrólise é feita por aquecimento em tubos de ensaio.

6.3 - Medida do Tempo Morto, t_m , da coluna capilar de vidro,
de 18 m, 0,2 mm de D.I. e F.E. OV-101

Para a medida injetou-se 3,0 μ L de butano (GLP). Utilizou-se uma vazão de purga de divisão de 30 mL/min com a temperatura do detector e a do vaporizador a 125°C.

O ganho do eletrômetro foi de 10^{-10} A/mv e do atenuador 256. A velocidade do papel foi de 12 cm/min. As temperaturas da coluna foram : 33°C, 47°C, 72°C, 80°C, 93°C e 113°C. Os t_m observados são apresentados na tab 6.1, com seus respectivos valores de S. S é o desvio padrão absoluto calculado pela fórmula:

$$S = \left| \frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{N - 1} \right|^{1/2}$$

onde: N é o número de medidas

X_i é o valor de cada medida

$\bar{X}$ é o valor médio das medidas

Tabela 6.1 - Tempo Morto (t_m) em função da temperatura da
coluna (T_c)

T_c (°C)	$\bar{t}_m$ (min)	S_t
33	0,446	0,003
47	0,450	0,007
72	0,551	0,005
80	0,534	0,003
93	0,553	0,002
113	0,572	0,002

O tempo morto tem um acréscimo não linear com o aumento da temperatura da coluna. Isto indica que o butano interage com a fase estacionária, e que estas medidas somente se aproximam do tempo morto.

Não se utilizou metano porque não se tinha disponível.

Os picos obtidos eram simétricos e sem caudas como mostra a fig 6.2

As medidas foram feitas com um escalímetro com 0,25 mm de incerteza.

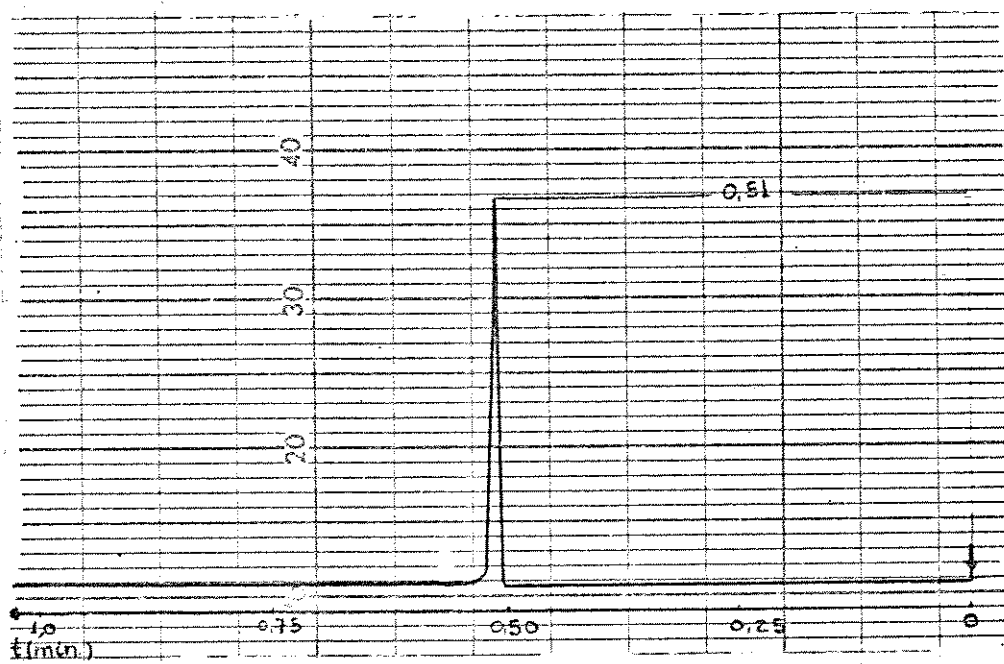


Figura 6.2 - Cromatograma do Butano (t_m) a 113°C. Coluna capilar, FE OV-101, $T_{vap} = T_{det} = 125^\circ\text{C}$, Vazão de 30 mL/min.

6.4 - Cálculo do Número de Pratos Teóricos da Coluna Capilar de Vidro

Utilizou-se uma solução de 65,0 μL de undecano em 1,0 mL de pentano. A temperatura do detector foi mantida a 122°C, a temperatura da coluna a 80°C e a temperatura do vaporizador a 123°C. O ganho do eletrômetro foi de 10^{-11} A/mv e o atenuador 128. A velocidade do papel era de 12 cm/min.

Foram feitos cálculos com variação do volume injetado e com variação de divisão:

6.4.1 - Razão de Divisão Constante com Variação do Volume Injetado

Mantendo-se a razão de divisão de 1/25, fez-se injeções de diferentes volumes de undecano. Para cada medida foram feitas quatro injeções. Os tempos de retenção (em segundos) e as larguras dos picos foram calculados por média aritmética, com seus respectivos desvios padrão. Os resultados estão na tab 6.2.

Tabela 6.2 - Valores do número de pratos teóricos (n) com diversos volumes de injeção (V_1). (R.D. = 1/25)

$V_1(\mu\text{L})$	$\bar{t}(\text{s})$	S_t	$\bar{W}_D(\text{s})$	S_w	n
0,2	36,7	0,03	0,75	0,00	38207
0,3	36,8	0,06	0,91	0,01	23205
0,4	37,3	0,00	1,00	0,00	22201
0,6	37,3	0,04	1,05	0,01	20137
0,8	37,5	0,00	1,15	0,01	17013
1,0	37,9	0,03	1,25	0,00	14709

Quanto maior o volume injetado, menor é o número de pratos teóricos, isto é, a eficiência do sistema aumenta quando se diminui a quantidade de amostra que efetivamente entra na coluna.

6.4.2 - Volume de Injeção Constante com Variação da Razão de Divisão (R.D.)

Para cada medida foram feitas quatro injeções de 0,3 μ L da solução de undecano, calculando-se a média aritmética dos tempos de retenção (em segundos) e das larguras dos picos (em segundos), e suas estimativas do desvio padrão.

O número de pratos teóricos foi calculado pela fórmula (4) descrita no item 3.4, e a razão de divisão pela fórmula descrita no item 3.3.3).

As medidas foram feitas com um escalímetro de 0,25 mm de incerteza, utilizando uma lente de aumento. Os resultados se encontram na tab. 6.3.

Tabela 6.3 - Valores do número de pratos teóricos (n) em diversas razões de divisão (R.D.)

R.D.	$\bar{t}(s)$	S_t	$\bar{W}_D(s)$	S_w	n
1/25	36,8	0,06	0,97	0,01	23205
1/35	36,6	0,03	0,92	0,01	25322
1/55	37,2	0,04	0,92	0,01	26089
1/70	37,5	0,02	0,92	0,01	26314
1/90	37,6	0,04	0,90	0,00	27867

O número de pratos teóricos aumenta com o aumento da razão de divisão, em concordância com a conclusão anterior (item 6.4) de que amostras menores aumentam a eficiência do sistema.

6.5 - Análise de Fenol com a Coluna Capilar de Vidro

Sendo que uma concentração de fenol urinário de 50,0 mg/L é o Limite de Tolerância Biológico de exposição ao benzeno (cap. 2 - pag. 17), e a faixa de 4,5 - 9,6 mg/L de fenol urinário é a concentração normalmente encontrada em pessoas sem história ocupacional de exposição ao benzeno (cap. 2 - pág. 16), as curvas de calibração deveriam abranger o intervalo de 5,0 a 50,0 mg/L.

Para verificar se eram obtidos picos mensuráveis, foram preparadas soluções de fenol, em éter isopropílico, com as seguintes concentrações: 56,4 mg/L, 94,0 mg/L, 141,0 mg/L, 188,0 mg/L, 211,0 mg/L e 282,0 mg/L; fazendo-se três injeções de 0,3 µL de cada solução nas seguintes condições cromatográficas: R.D. = 1/30, temperatura do detector 210°C, temperatura do vaporizador 245°C, temperatura da coluna 100°C, velocidade do papel de 6,3 cm/min. Ganho do eletrômetro 10^{-12} A/mv e atenuador 128.

Os cromatogramas obtidos (fig. 6.3) permitem concluir que em tais condições a análise de fenol só seria adequada para soluções de concentração acima de 100,0 mg/L, o que não nos interessava.

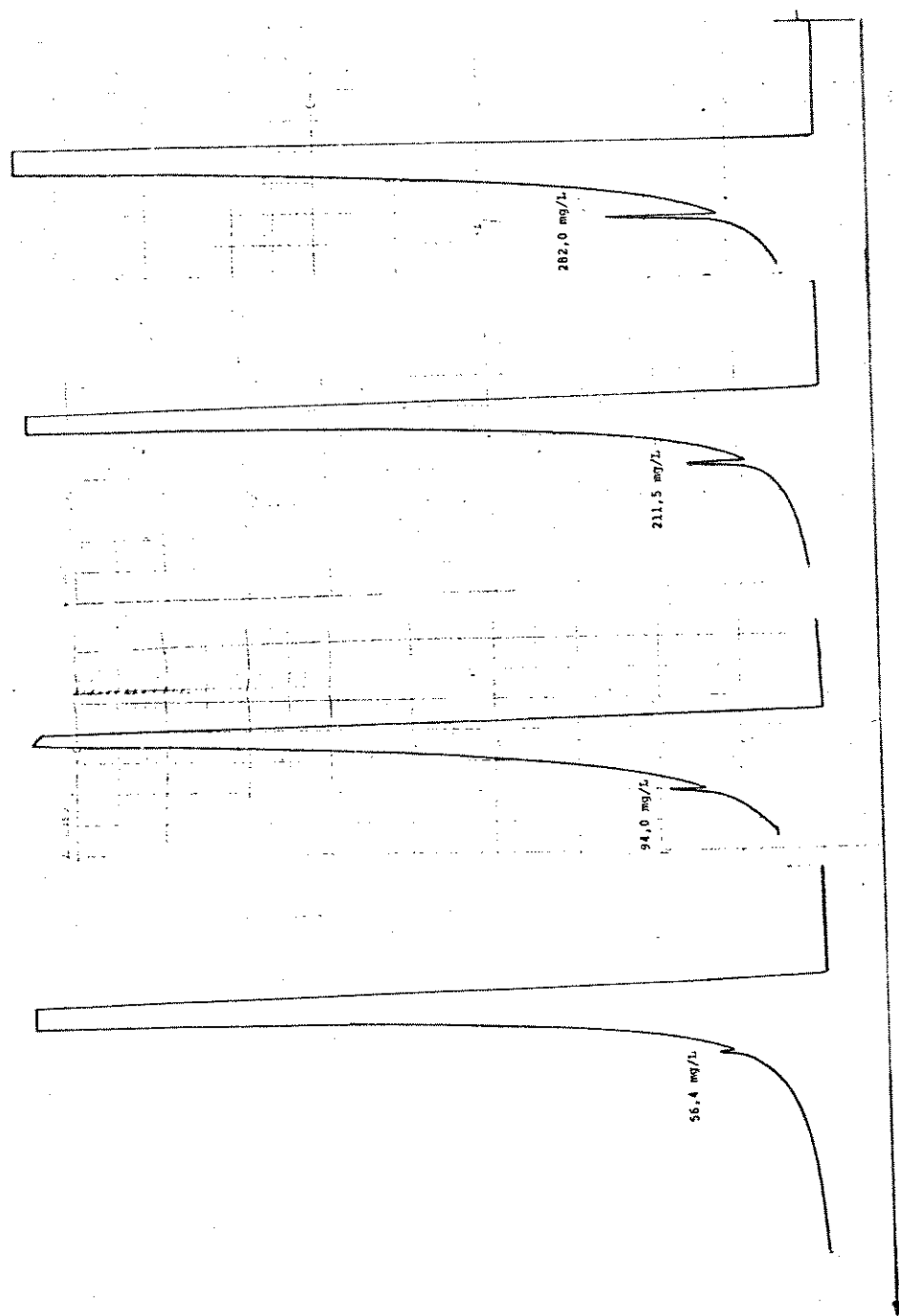


Figura 6.3 - Teste de Resolução e sensibilidade de detecção usando coluna capilar de vidro, DI=0,2 mm, FE OV-101. Demais condições cromatográficas no texto.

Outras condições de análise foram então exploradas:

6.5.1 - Variação de Atenuação

O atenuador foi mudado para 64 e posteriormente para 32, mantendo 10^{-12} A/mv de ganho, utilizando-se as mesmas condições anteriores e a solução de 56,4 mg/L.

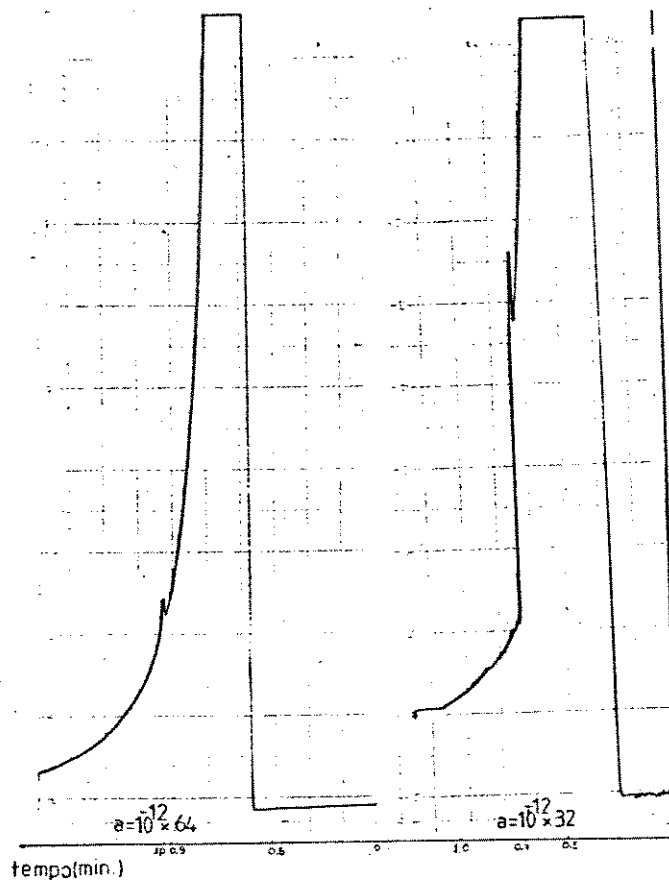


Figura 6.4 - Efeito da variação de atenuação. As demais condições cromatográficas estão no texto.

Foi constatado (fig 6.4) que, como esperado, quanto menor a atenuação, maior é o pico do fenol, mas maior também é a sua sobreposição com a cauda do éter, devido ao aumento da sensibili-

dade do instrumento.

6.5.2 - Variação do Volume Injetado

Mantendo-se o atenuador em 128 e as mesmas condições do item 6.5.1, o volume foi aumentado para 0,5 μL e 0,7 μL .

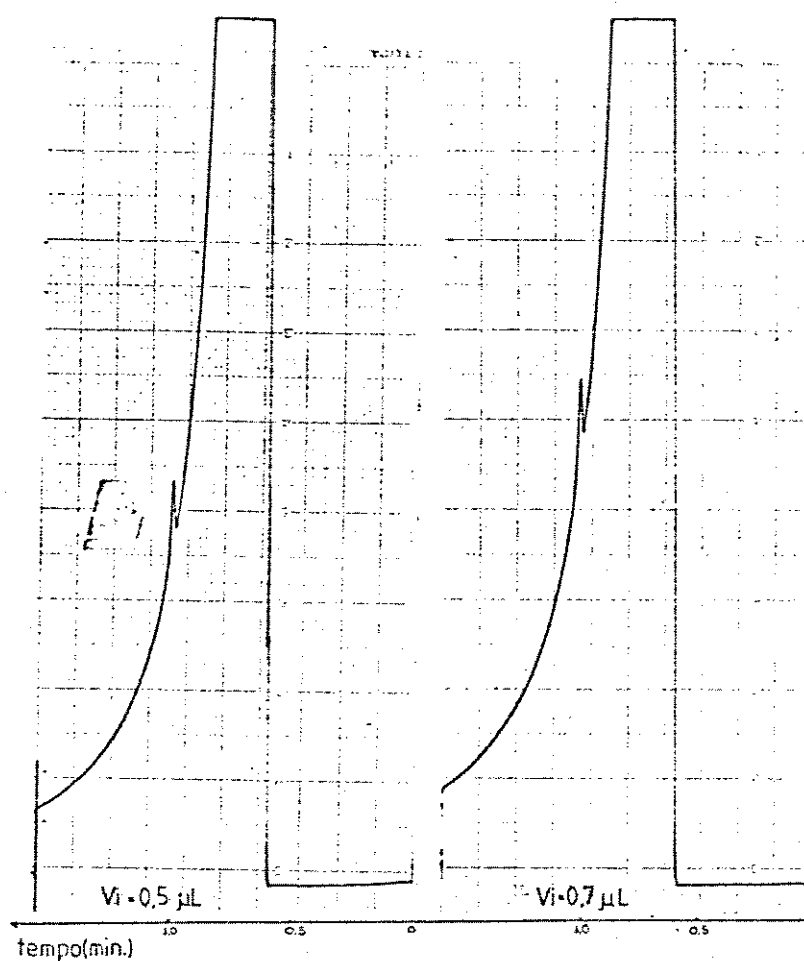


Figura 6.5 - Testes de variação da resolução do fenol com o volume injetado. Demais condições no texto.

Quanto maior o volume maior é o pico do fenol e maior a cauda do solvente, resultando em maior sobreposição do pico à cauda do éter. Portanto o aumento de volume não pode ser usado para possibilitar avaliar picos de fenol nas concentrações desejadas.

6.5.3 - Variação da Temperatura da Coluna

Foi injetado um volume de 0,3 μ L. Foram mantidas as demais condições dos itens 6.5.1 e 6.5.2, variando-se a temperatura da coluna para 82°C (valor que se estabilizou ao tentar diminuir de 20°C a temperatura da coluna) e 122°C (valor obtido ao se tentar aumentar de 20°C a temperatura da coluna).

Como ilustra a fig. 6.6 na temperatura de 122°C o pico do fenol desaparece sob a cauda do éter. A 82°C obteve-se uma melhor separação da cauda do éter, porém este aumento de resolução não é suficiente para compensar o aumento do tempo de análise de (0,94 min para 0,79 min). Notou-se que, tanto a 82°C quanto a 100°C, os picos não têm linhas de base estabilizadas, dificultando a quantificação.

Concluímos que a coluna de vidro era inadequada para análise de fenol na faixa de concentração de interesse, pois obtinha-se um pico muito pequeno, devido à pequena quantidade de massa que era enviada ao detector (0,50 ng para amostras de 50,0 mg/L).

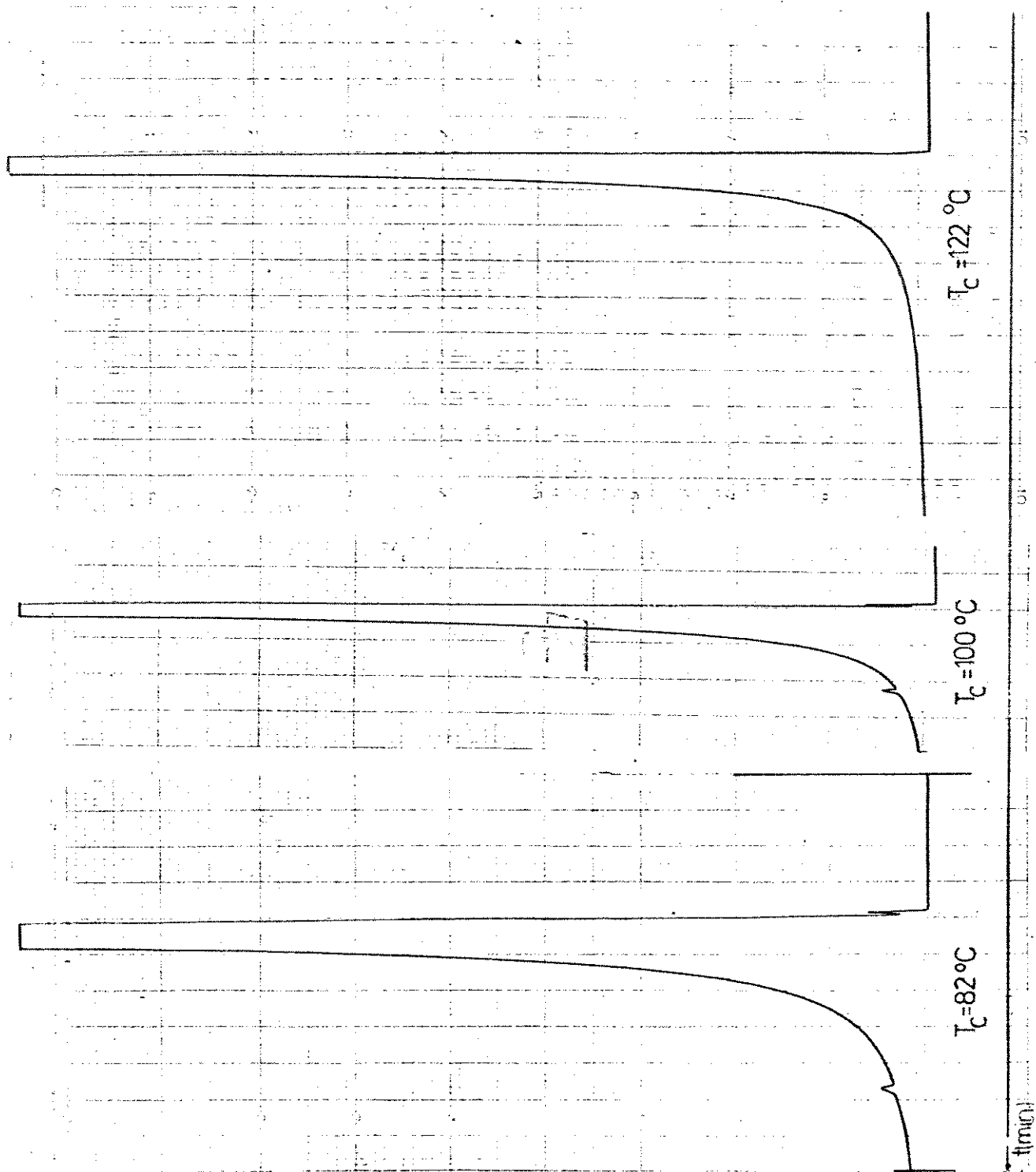


Figura 6.6 - Teste da variação da resolução do fenol da cauda do éter em função da temperatura da coluna. $T_V = 240^\circ\text{C}$, $T_V = 210^\circ\text{C}$, $a = 128 \cdot 10^{-12}$, R.D. = 1/30.

6.6 - Otimizações das condições de análises, utilizando a coluna capilar de sílica fundida, tipo "Megabore".

Foi adquirida uma coluna de sílica fundida de 10 metros de comprimento, 0,53 mm de diâmetro interno, e F.E. 5% fenilmetil silicone HP-5 (ligação cruzada) com uma espessura de filme de 2,23 mm, o que possibilitou o envio de massas maiores (até 5,0 µg) para o detector.

6.6.1 - Vazão dos Gases que Alimentam o Detector

Utilizando-se as vazões: 300 mL/min para o ar sintético, 30 mL/min para o nitrogênio e 30 mL/min para o hidrogênio (vazões ideais segundo o manual do cromatógrafo), obteve-se um deslocamento negativo da linha base. Variando-se a vazão de ar, o pico negativo ainda foi obtido, o mesmo acontecendo quando se mudava a vazão de nitrogênio. Mas, quando se aumentou a vazão de hidrogênio de 30 para 37 mL/min, o pico negativo desapareceu, obtendo-se picos maiores com maiores vazões de hidrogênio, como indicam a tab. 6.4 e a fig. 6.7.

Para evitar eventuais danos ao detector por excesso de aquecimento e como não há uma diferença considerável entre a altura do pico de fenol na vazão de 45 mL/min e sua altura na vazão de 49 mL/min, foi escolhida uma vazão de 45 mL/min de hidrogênio, na alimentação da chama, para ser usada

Tabela 6.4 - Altura do pico do fenol (h) em função da vazão do gás combustível

V_H (ml/min)	h (cm)
30,0	deflexão negativa
37,0	3,6
42,0	8,0
45,0	12,0
49,0	14,0

V_H = vazão de hidrogênio

h = altura média dos picos de fenol

Também foi observado que a estabilização da pena do registrador podia ser melhorada com vazões de nitrogênio inferiores a 30 mL/min. Após vários testes, a vazão de 23 mL/min demonstrou ser adequada, optando-se por usar esta vazão, a qual, somada à vazão de 5 mL/min da F.M. - H_2 (discutida no item seguinte) atinge 28 mL/min, que está próxima dos 30 mL/min usuais para soma da fase móvel e do gás de complementação, N_2 .

A vazão do ar sintético de 300 mL/min pareceu ser adequada, e foi usada em todas as análises.

6.6.2 - Vazão da Fase Móvel

A vazão da fase móvel, H_2 , é calculada pela razão entre o volume da coluna e o tempo morto (veja item 3.3.3 - pág. 31). O volume (V_C) da coluna é de 0,833 mL.

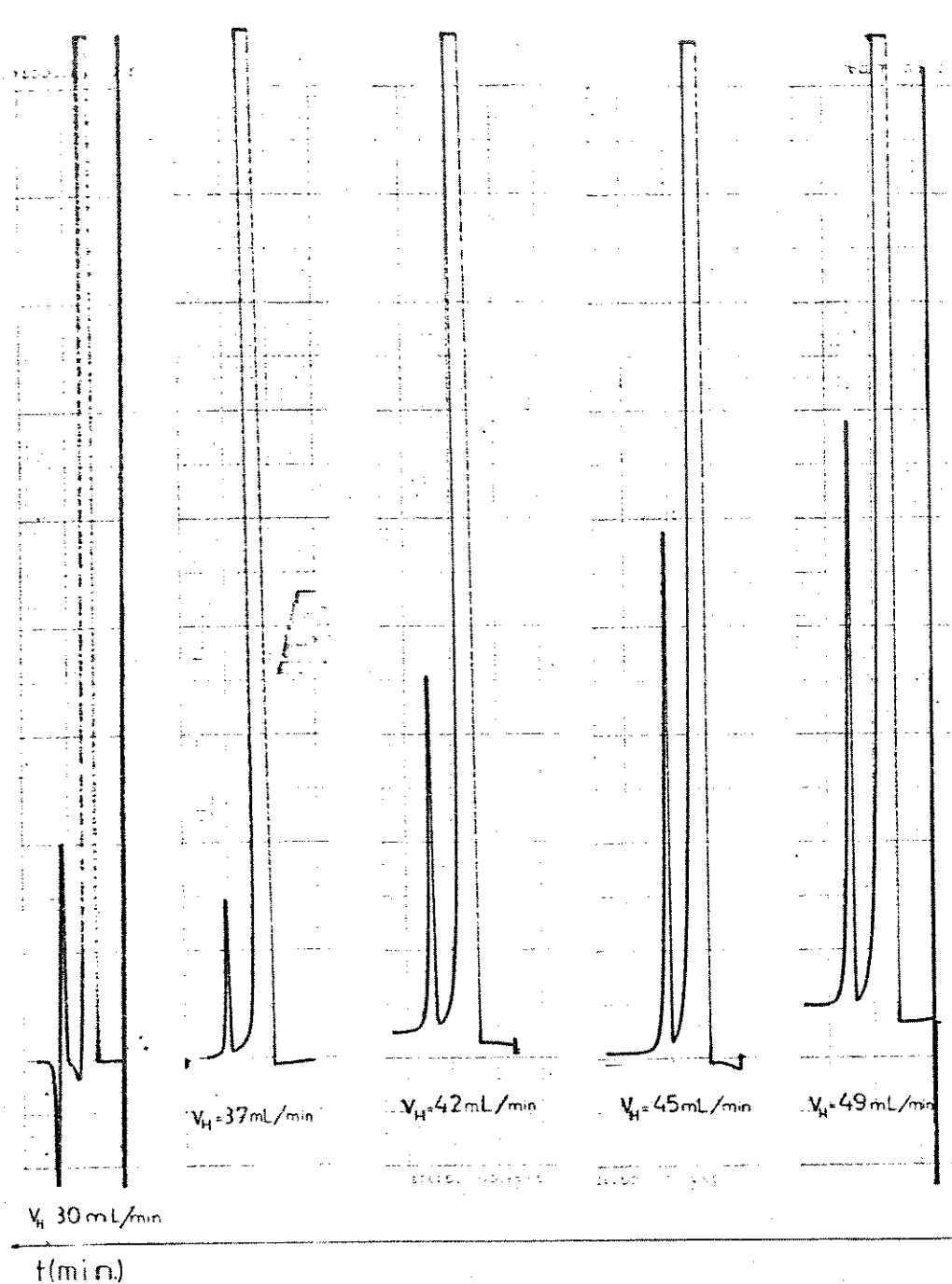


Figura 6.7 - Variação da sensibilidade do D.I.C. com a vazão do gás combustível, H_2 . Utilizou-se uma solução de fenol de 56,4 mg/L, $T_C = 100^\circ C$, $T_d = 210^\circ C$, $T_V = 240^\circ C$.

Para medida do tempo morto injetou-se 3,0 µL de butano. As temperaturas do detector e do vaporizador foram mantidas a 213°C e a temperatura da coluna a 100°C. O ganho do eletrômetro foi de 10^{-10} A/mv e o atenuador de 256. Foram usadas vazões de purga de divisão de 13,6 mL/min e 10,6 mL/min, que resultaram em vazões diferentes na coluna.

Na vazão de purga de 13,6 mL/min obteve-se um tempo morto de 0,143 min, portanto a vazão da fase móvel na coluna é de:

$$V_{FM} = \frac{0,833}{0,143} = 5,8 \text{ mL/min}$$

Na vazão de purga de 10,0 mL/min o tempo morto é de 0,159 min, obtendo-se :

$$V_{FM} = \frac{0,833}{0,159} = 5,2 \text{ mL/min}$$

Em cada uma dessas vazões da F.M. foi injetado 3,0 µL de uma solução de fenol em éter isopropílico, de concentração 56,0 mg/L, nas mesmas condições usadas para a determinação do tempo morto, mas com o ganho do eletrômetro em 10^{-12} A/mv e o atenuador em 128. Os resultados estão na tabela 6.5.

Tabela 6.5 - Comparação da variação do tempo de retenção e altura do pico de fenol com a variação da vazão da F.M., em três injeções realizadas.

$V_{FM} = 5,2 \text{ (ml/min)}$				$V_{FM} = 5,8 \text{ (ml/min)}$		
pico do fenol	t (min)	h		pico do fenol	t (min)	h
1	0,43	5,0		1	0,33	7,5
2	0,43	4,8		2	0,32	6,5
3	0,44	5,5		3	0,36	5,7

t = tempo de retenção ; h = altura em cm

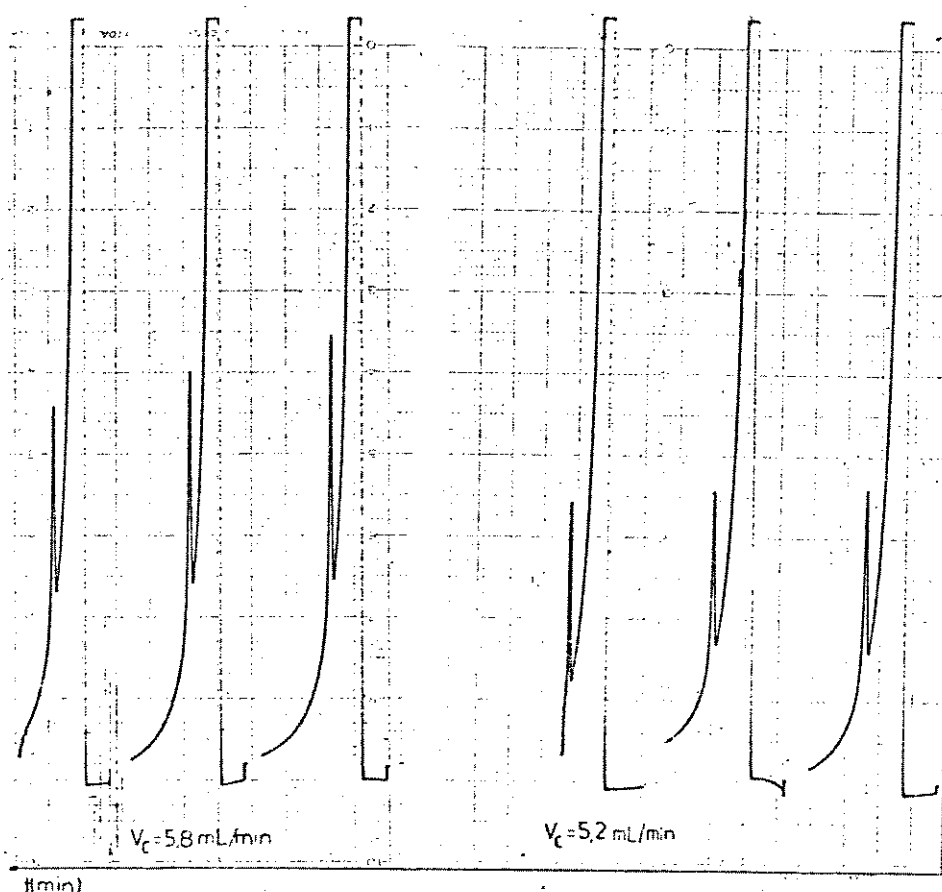


Figura 6.8 - Teste de resolução do fenol em função da vazão da F.M., coluna de sílica fundida

Como mostra a fig. 6.8, a vazão de 5,2 mL/min é a que possibilita a melhor separação do pico do fenol da cauda do éter isopropílico. Além disto, nesta vazão o desvio entre os tempos de retenção e entre as alturas dos picos de fenol é menor. Estes resultados concordam com as especificações do fabricante, de que a vazão de operação ótima desta coluna é de 5,0 mL/min. Foi utilizada a vazão de 5,2 mL/min para a fase móvel, nas análises realizadas.

6.6.3 - Temperatura da Coluna

Para verificar a separação do fenol do éter isopropílico preparou-se uma solução destes componentes de 56,4 mg/mL e fez-se injeções de 3,0 µL, nas mesmas condições cromatográficas do item 6.6.2, testando-se várias temperaturas da coluna: 150°C, 120°C, 100°C e 80°C (fig. 6.9).

Verificou-se que quanto menor a temperatura da coluna maior a separação entre o fenol e o éter, em concordância com a afirmação da referência 25, de que a separação é melhor em baixas temperaturas da coluna.

Foi utilizada uma temperatura da coluna de 100°C.

6.6.4 - Temperatura do Vaporizador

A temperatura do vaporizador deve ser suficientemente alta para garantir que a amostra injetada tenha sido vaporizada. Segundo o manual do cromatógrafo CG 370 a temperatura do

vaporizador deve ser mantida 30°C acima da temperatura de ebulição do componente menos volátil da mistura injetada.

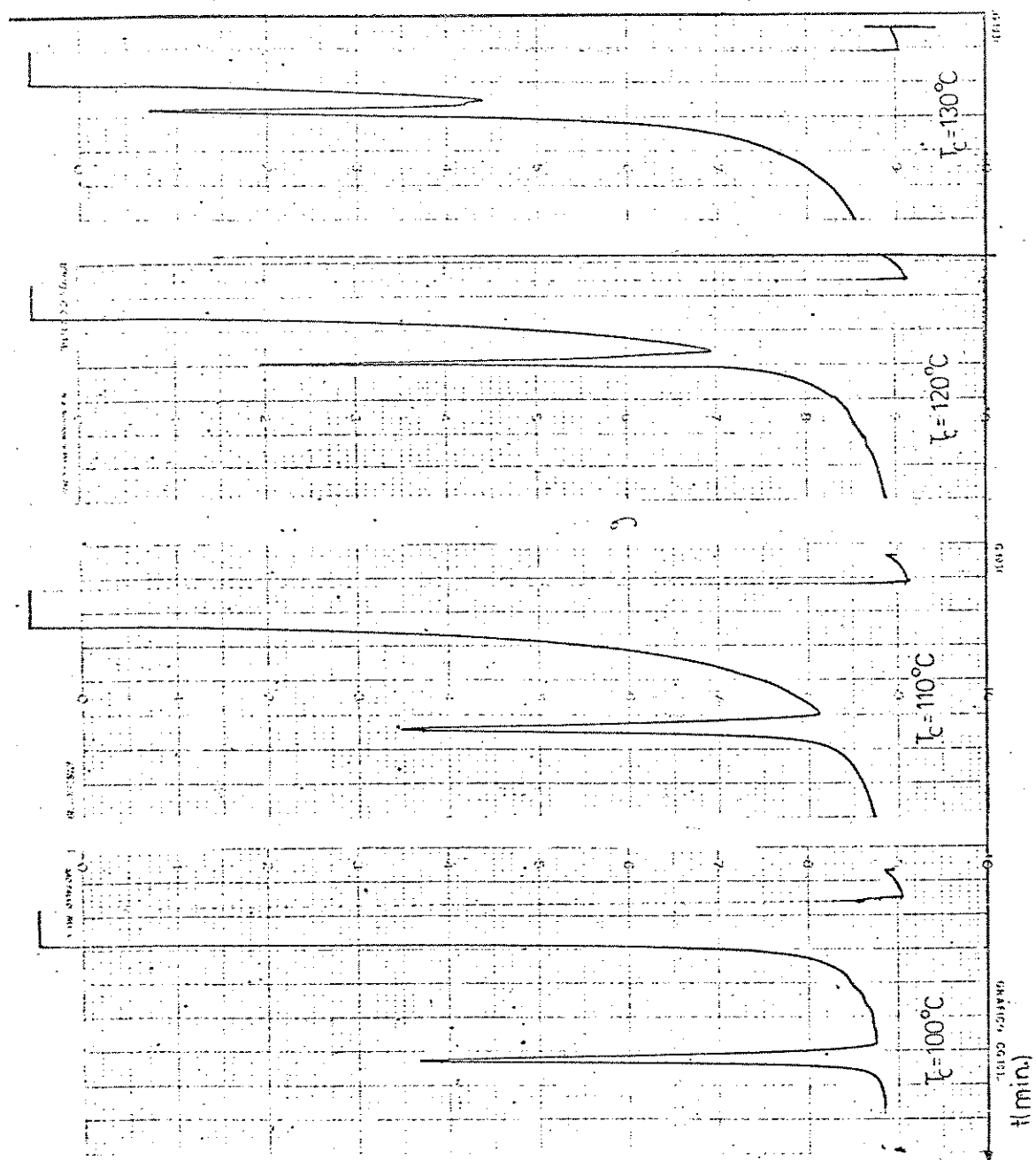


Figura 6.9 - Teste de resolução do fenol em diversas temperaturas da coluna. $T_v = 240^\circ\text{C}$, $T_d = 210^\circ\text{C}$, $a = 128 \cdot 10^{-12}$, R.D. = 1/30.

Nas análises que foram feitas o componente menos volátil é o nitrobenzeno de ponto de ebulição 210°C e, portanto, a temperatura do vaporizador foi mantida a 240°C . Foi constatado que não há diferença entre o cromatograma de fenol e nitrobenzeno obtidos tanto com a temperatura do vaporizador a 210°C como em 240°C , mantendo-se constantes as demais condições cromatográficas (fig. 6.10).

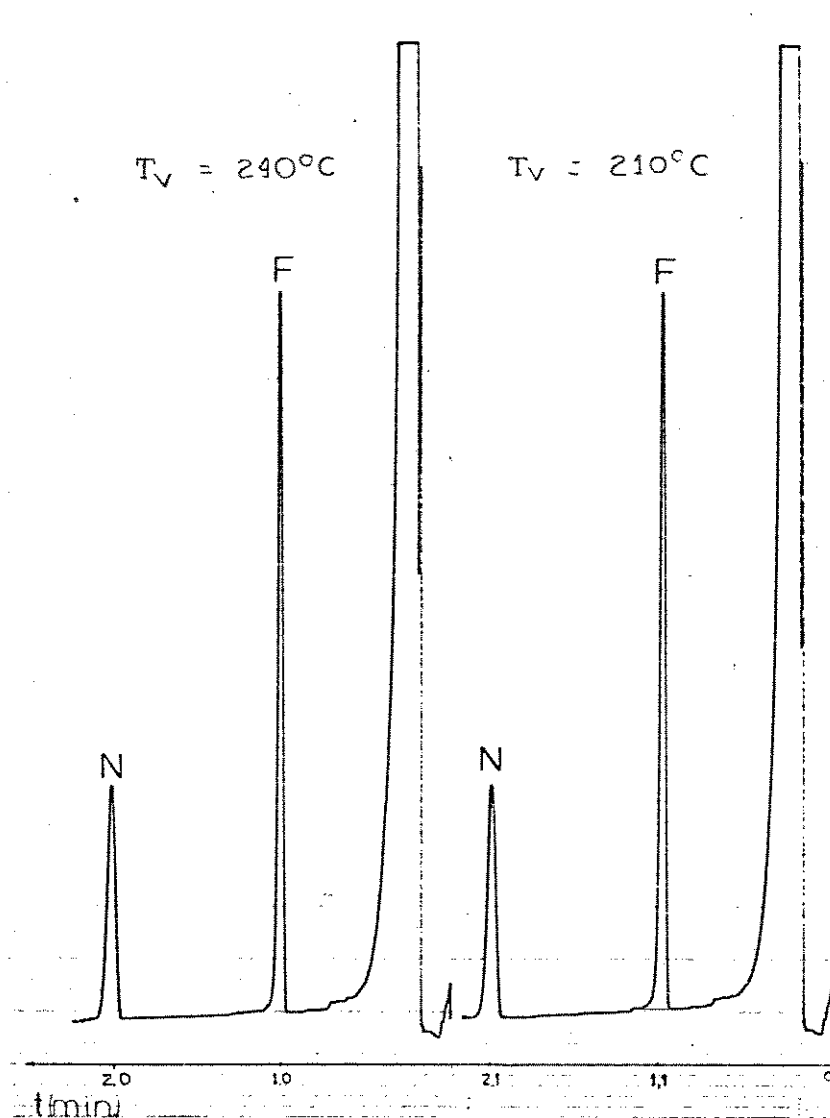


Figura 6.10 - Teste de resolução de fenol em diferentes temperatura do vaporizador.

6.6.5 - Temperatura do Detector

A temperatura do detector foi mantida a 210°C, esta escolha foi arbitrária, uma vez que no D.I.C. basta que a temperatura seja superior a 100°C, para não condensar água no detector. O valor escolhido não danifica o detector e possibilita larga margem de segurança contra eventuais condensações, tais como no caso da chama apagar e isto não ser imediatamente detectado.

6.7 - Análises Cromatográficas das Soluções de Fenol,

Nitrobenzeno e Cresóis, Utilizando Coluna Capilar de
Sílica Fundida.

Foram preparadas as seguintes soluções em éter isopropílico : fenol = 55,3 mg/L, nitrobenzeno = 46,0 mg/L, *o*-cresol = 61,3 mg/L, *m*-cresol = 61,4 mg/L e *p*-cresol = 61,8 mg/L.

Inicialmente foram feitas injeções de soluções individuais de cada substância, para verificar se os picos eram registrados. A seguir, para verificar se os picos eram obtidos, foram preparadas soluções de fenol e *o*-cresol, fenol e *m*-cresol, *meta* e *para*-cresol, nitrobenzeno e *o*-cresol. A temperatura do vaporizador foi de 240°C, a temperatura do detector de 210°C, a temperatura da coluna 100°C, o ganho do eletrômetro foi colocado em 10^{-12} A/mV e o atenuador em 128. A velocidade do papel foi de 6,3 cm/min.

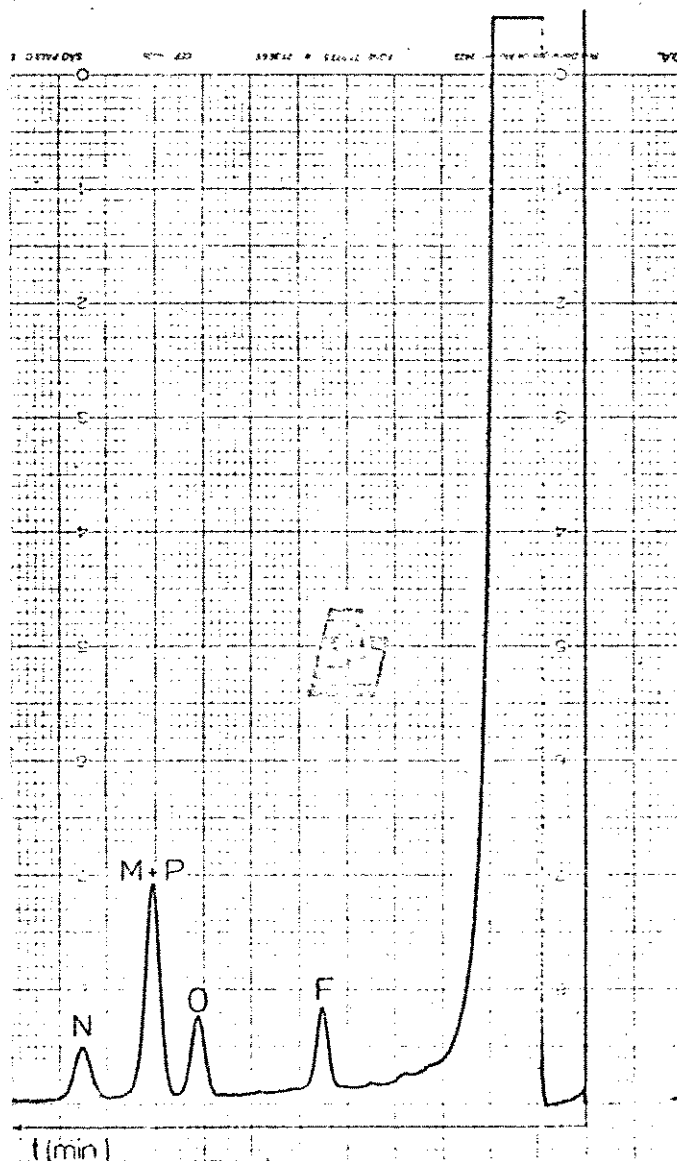


Figura 6.11 - Cromatograma da mistura contendo fenol, nitrobenzeno *o,m* e *p*-cresol. As condições cromatográficas estão no texto.

Como mostra a fig 6.11, pode-se concluir que:

- 1) o pico do fenol não interfere com os de nitrobenzeno e os dos *o*, *m* e *p*-cresóis;
- 11) *meta* e *p*-cresol eluem em um único pico;
- 111) o pico de nitrobenzeno não interfere com o do *o*-cresol;

em contraste com a literatura^{1, 7, 36} que indica que utilizando colunas recheadas o tempo de retenção do nitrobenzeno é idêntico ao do *o*-cresol. Esta informação inviabiliza o uso de nitrobenzeno como padrão interno nestes casos pois, segundo a ref. 27, o *o*-cresol é um dos metabólitos do tolueno e, geralmente, os trabalhadores expostos ao benzeno são também expostos ao tolueno. E quase sempre a concentração do tolueno é superior à do benzeno.

A separação do nitrobenzeno e o *o*-cresol na coluna capilar exemplifica um dos motivos da escolha da mesma.

6.8 - Construção da Curva de Calibração

Misturas de fenol e nitrobenzeno foram analisadas para possibilitar a construção de uma curva de calibração. Nas análises cromatográficas, fez-se para cada ponto cinco injeções de 3,0 μ L com R.D. = 1/30, e as razões de área foram selecionadas pelo teste Q de rejeição³. A temperatura do detector foi de 209°C, a temperatura do vaporizador 241°C, a temperatura da coluna 100°C, o ganho do eletrometro foi de 10^{-12} A/mV, e o atenuador de 32 para os pontos 1-5 e de 64 para os pontos 6-9.

Tabela 6.6 - Valores da Curva Padrão

no	C _F (mg/L)	S _R (mg/L)	A _F /A _N	S _{AF} /A _N	C _N (mg/L)	S _R (mg/L)	C _F /C _N
1	5,45	0,03	0,22	0,03	68,0	0,3	0,080
2	7,27	0,03	0,23	0,02			0,11
3	10,90	0,05	0,38	0,02			0,16
4	14,54	0,06	0,48	0,01			0,21
5	21,81	0,09	0,60	0,02			0,32
6	29,1	0,1	0,79	0,01			0,43
7	43,6	0,2	1,01	0,02			0,64
8	58,2	0,2	1,52	0,02			0,86
9	87,2	0,3	2,20	0,02			1,28

C_F = concentração de fenol

C_N = concentração de nitrobenzeno

S_R = estimativa do desvio padrão, calculada pelo critério de propagação de erros⁷².

A_F/A_N = valor médio obtido na relação entre área de fenol e área de nitrobenzeno

Os valores obtidos, que foram utilizados para a construção da curva de calibração, estão na tabela 6.6. A curva é mostrada na fig. 6.12.

O ponto nº 7 foi desprezado pelo critério dos mínimos quadrados⁴⁵. Depois disto, a reta obtida tem um coeficiente de correlação $r = 0,9992$ e pode ser descrita pela fórmula:

$$Y = 0,0908 + 1,6511 X$$

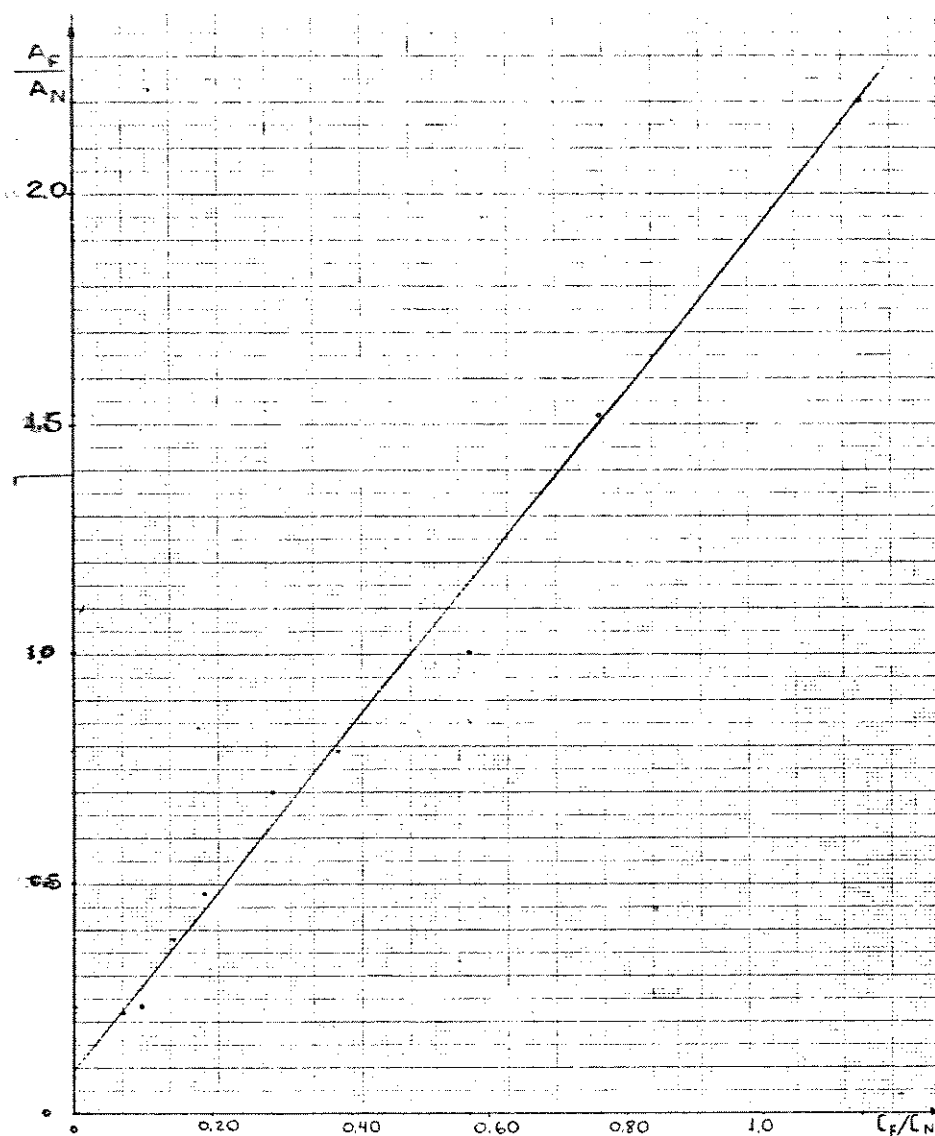


Figura 6.12 - Curva de Calibração do fenol em éter isopropílico usando nitrobenzeno como padrão interno.

6.9 - Extração por Solvente

6.9.1 - Extração em Tubo

Utilizando-se fenol em solução aquosa contendo $0,13 \text{ M}^-$ de NaCl e fazendo-se a extração como descrita no item 5.7.1, obteve-se os rendimentos de extração indicados na tab. 6.7.

Tabela 6.7 - Rendimentos obtidos na extração de soluções de fenol em solução aquosa 0,13 M de NaCl.

Concentração de Fenol Preparada (mg/L)	Concentração de Fenol Obtida na extração (mg/L)	Rendimento da Extração (%)
68,68	34,70	50
50,47	32,74	64
27,16	17,37	64

O rendimento da extração foi baixo, porém está em concordância com a literatura⁶⁴ a qual relata que neste tipo de extração o rendimento é de 50-60 %.

Para tentar aumentar o rendimento da extração as soluções aquosas de fenol foram saturadas com NaCl. Os resultados estão na tab. 6.8.

Tabela 6.8 - Rendimentos obtidos na extração de soluções de fenol em solução aquosa saturada com NaCl.

Concentração de Fenol Preparada (mg/L)	Concentração de Fenol Obtida na Extração (mg/L)	Rendimento da Extração(%)
24,86	14,69	59
59,47	32,97	65
12,59	8,72	69

Não houve acréscimo significativo no rendimento da extração, como era esperado (80%), ao contrário da literatura^{51,64}, que relatou um rendimento de até 80% em soluções saturadas.

Para verificar se a extração era completa, fez-se extrações sucessivas de uma mesma solução de fenol em água, de concentração 34,7 mg/L. Os resultados estão na tab. 6.9.

Tabela 6.9 - Extrações sucessivas de uma mesma solução de fenol em água (comparação relativa).

		área de fenol após extração (média de 4 injeções) (cm ²)
1ª	extração	2,28
2ª	extração	0,34
3ª	extração	0,083
4ª	extração	0,078
5ª	extração	0,050
6ª	extração	0,048
7ª	extração	0,045

Como mostram os resultados, nem mesmo em sete extrações sucessivas o fenol foi totalmente extraído.

Fez-se também análise de algumas urinas (tab. 6.10)

Tabela 6.10 - Extração de fenol em amostras de urina

Concentração de Fenol Adicionada à Urina (mg/L)	Concentração de Fenol Obtida na Extração (mg/L)	Rendimento da Extração %
32,86	15,10	46
65,93	26,57	40
0	2,62	--

A extração de fenol na urina tem um rendimento menor que a extração de fenol em solução aquosa.

Além de se verificar que o rendimento é baixo e que a extração não estava sendo completa, levou-se em consideração o fato de poder estar ocorrendo perdas por volatilidade e/ou arraste durante o aquecimento para se efetuar a hidrólise, como já foi discutido no item 6.2.

Então testou-se um outro método de hidrólise dos fenóis conjugados e liberação do fenol livre.

6.9.2 - Extração Contínua

Neste processo a hidrólise e a extração são efetuadas em sistema fechado (veja fig. 5.7 item 5.7.2), verificando-se que a possibilidade de perda de vapores durante a hidrólise e/ou extração é muito remota.

Para se obter as melhores condições de extração foram feitos alguns testes.

Tabela 6.11 - Rendimento da extração com variação do tempo de extração para fenol em solução aquosa 0,13 M de NaCl. Extração na presença de nitrobenzeno.

Concentração de Fenol (mg/L)	Tempo de Extração (min.)	Rendimento da Extração %
50,89	45	110
43,84	40	116
43,84	35	110

Tabela 6.12 - Extração de diferentes concentrações de fenol em solução aquosa 0,13 M de NaCl, durante 30 min. A extração foi feita na presença do nitrobenzeno.

Concentração de Fenol Preparada (mg/L)	Concentração de Fenol Obtida na Extração (mg/L)	Rendimento da Extração %
31,52	29,00	92
33,82	32,13	95
54,68	47,02	86
43,24	40,21	93
23,69	27,24	115
23,03	30,63	133

Tabela 6.13 - Variação do rendimento da extração com nitrobenzeno adicionado após a extração de 30 min. Fenol em solução aquosa 0,13 M de NaCl

Concentração de Fenol Preparada (mg/L)	Concentração de Fenol Obtida na Extração (mg/L)	Rendimento da Extração %
23,69	21,08	89
23,03	19,58	85
37,74	30,19	80
24,99	20,49	82

Tabela 6.14 - Rendimento da extração de fenol em solução aquosa saturada com NaCl. Nitrobenzeno adicionado após a extração de 30 min.

Concentração de Fenol Preparada (mg/L)	Concentração de Fenol Obtida na Extração (mg/L)	Rendimento da Extração %
40,01	30,00	75
36,37	25,10	69
26,23	19,41	74

A extração contínua tem um rendimento bem mais alto que a extração simples. O tempo ideal de extração foi de 30 min (tab. 6.11).

Os rendimentos acima de 100% da tab. 6.12 mostram que há perda de nitrobenzeno na extração, portanto o nitrobenzeno deve ser adicionado após a extração, apesar do rendimento da extração de fenol neste processo ser um pouco menor.

Tentou-se aumentar o rendimento da extração utilizando-se solução saturada com NaCl. Mas ao contrário do que se esperava o rendimento diminuiu (tab. 6.14). Isto porque quando se adicionava o ácido à solução ocorria uma precipitação de NaCl, que provavelmente arrastava alguns cristais de fenol.

Com os rendimentos obtidos na tab. 6.13, temos uma extração média de 84% com desvio padrão de 4%. Aplicando-se o parâmetro t de Student³, na equação $\mu = \bar{x} \pm t S / (n)^{1/2}$. Temos que a média das extrações deve estar entre os valores 78% e 90% com um grau de confiança de 95%.

6.10 - Determinação de Creatinina

Para determinação de creatinina urinária optou-se pela análise espectrofotométrica da solução alaranjada formada pela reação da creatinina com ácido pícrico em meio alcalino, a reação de Jaffé⁴⁸ :

Foram utilizados dois métodos de análise.

6.10.1 - Determinação de Creatinina Urinária pelo Método Espectrofotométrico Manual

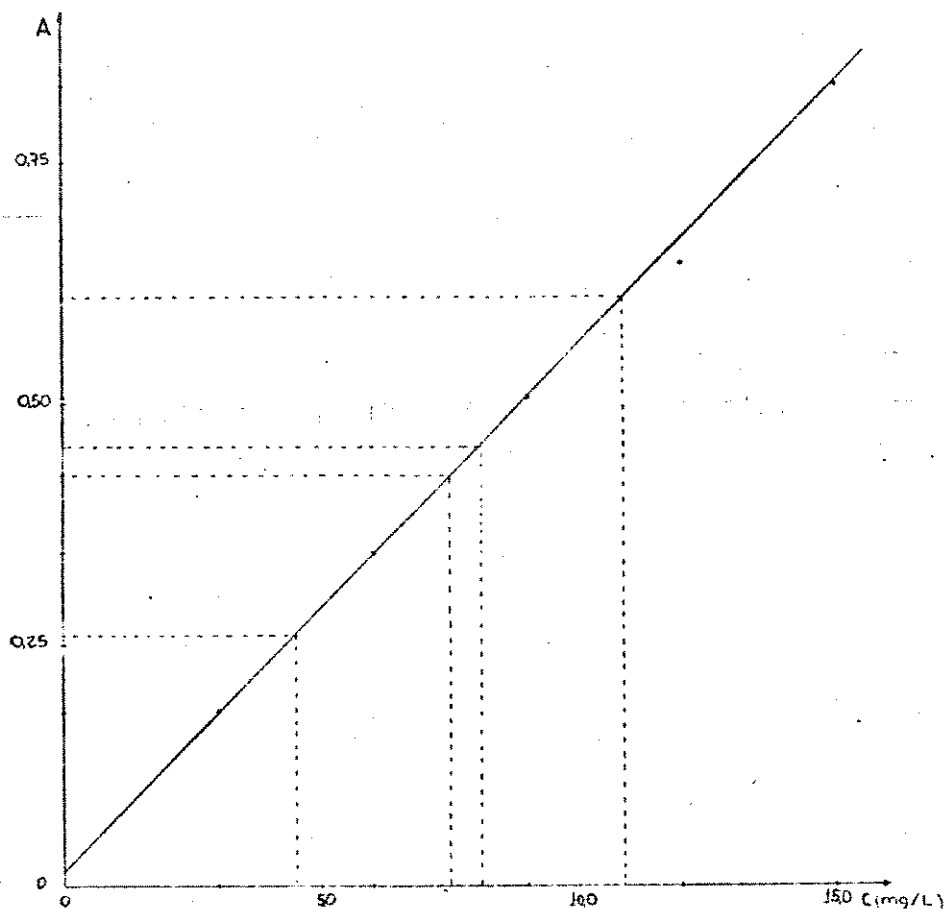


Figura 6.13 - Curva de calibração de creatinina pelo método manual

Como mostra a fig. 6.13 o método manual é adequado e pode ser utilizado para determinação de creatinina na urina para normalização da concentração de fenol. A equação da reta é:

$$y = 0,017 + 0,055 x, \text{ com } r = 0,9999$$

6.10.2 - Determinação de Creatinina em Urina pelo Sistema Monosegmentado em Fluxo Contínuo

Para se obter o sistema de fluxo mais adequado alguns parâmetros foram investigados.

Foi observado que a concentração de hidróxido de sódio afeta a absorbância da solução final medida a 500 nm. A absorbância aumenta com o acréscimo da concentração do hidróxido de sódio. Quando se aumenta a concentração do hidróxido de sódio de 0,75 a 2,0 M, há um acréscimo de aproximadamente 15% na altura do sinal analítico. Porém, a reprodutibilidade diminui com o acréscimo da concentração, e além disto, pode ocorrer precipitação de picrato de sódio, no ponto de confluência das soluções de hidróxido de sódio e ácido pícrico, em altas concentrações do hidróxido de sódio. Portanto, escolheu-se a concentração de 0,75 M de hidróxido como a ideal.

Verificou-se que quando se aumenta o comprimento da bobina de reação (I) há um acréscimo de sensibilidade, pois há um maior tempo de reação.

A distância de L_2 até o detector também influi na sensibilidade. Quando esta distância é aumentada de 20 a 50 cm a

sensibilidade tem um decréscimo de aproximadamente 20%. Entretanto, obtém-se uma melhor reprodutibilidade à medida que se aumenta esta distância. Então foi escolhida a distância de 40 cm entre L_2 e o detector para ser utilizada.

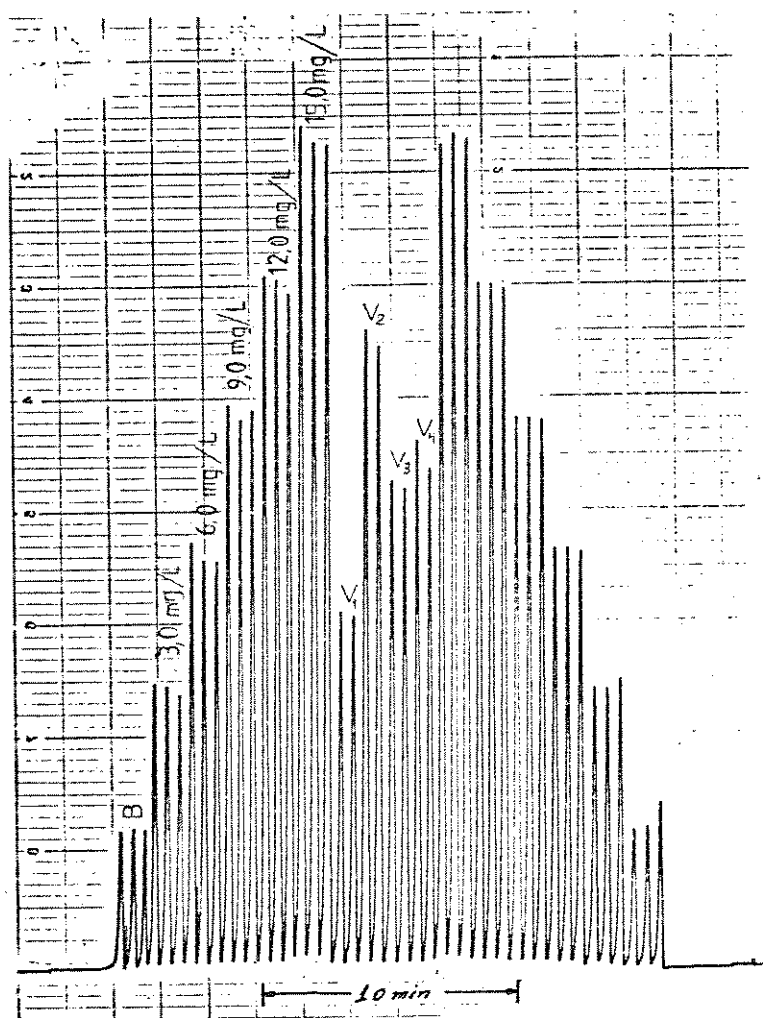


Figura 6.14 - Sinais de calibração e determinação de creatinina em urina. Da esquerda para a direita 6 soluções padrão de creatinina em água (0,0; 3,0; 6,0; 9,0; 12,0 e 15,0 mg/L), seguidas de 4 amostras de urina e as mesmas soluções padrão na ordem decrescente de concentrações. A velocidade do papel foi de 30 cm/h e a escala de 500 mV.

A fig 6.14 mostra que há uma boa reprodutibilidade entre as alturas dos picos e pode ser constatada uma velocidade analítica de até 130 determinações por hora.

Com os dados obtidos na fig. 6.14 construiu-se a curva de calibração da creatinina, fig 6.15.

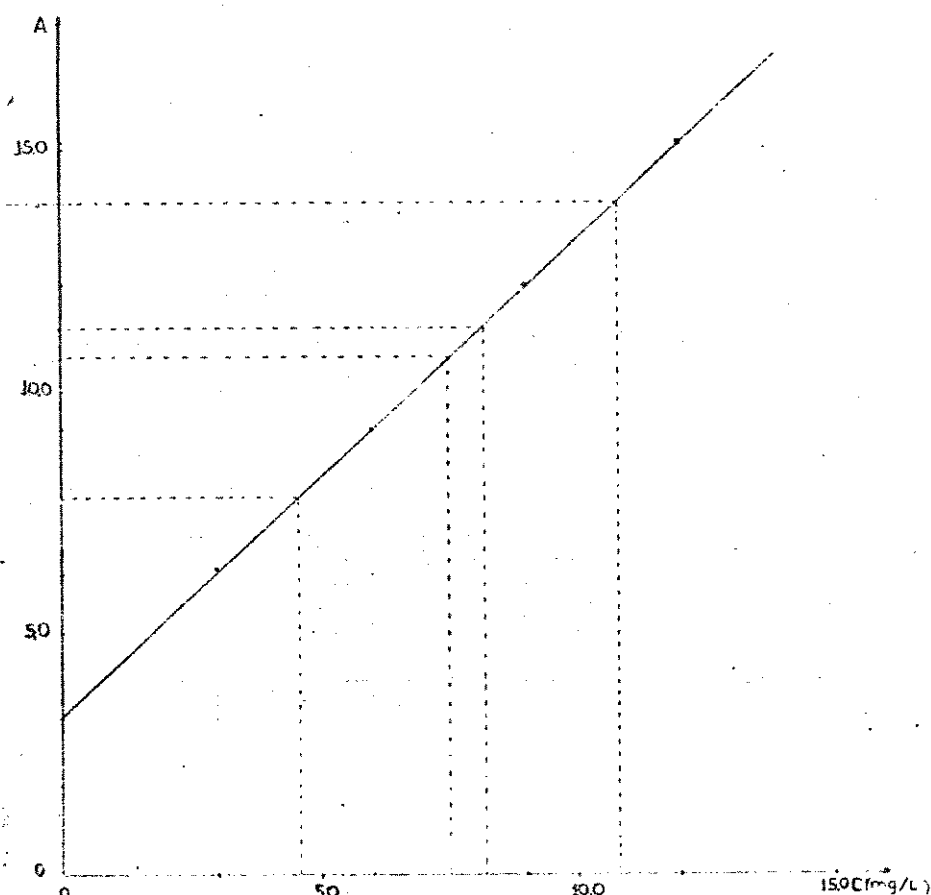


Figura 6.15 - Curva de calibração de creatinina com a técnica de fluxo contínuo monosegmentado

A reta obtida na fig. 6.14 tem coeficiente de correlação, $r = 0,9999$ e pode ser descrita pela equação :

$$y = 3,20 + 0,998 x$$

A tabela 6.15 compara os resultados obtidos nos métodos manuais e em fluxo contínuo.

Como mostram os resultados da tab. 6.15 não há diferença estatística entre os valores obtidos com as duas técnicas. Isto evidencia a validade do método monosegmentado para determinação de creatinina na urina.

Fazendo-se 10 determinações para cada padrão pelo método monosegmentado obteve-se uma estimativa do desvio padrão relativo menor que 1,6%, isto mostra a concordância dos resultados obtidos, implicando em um método relativamente preciso.

Tabela 6.15 - Comparação dos valores de creatinina em urina obtidos com a técnica de fluxo contínuo monosegmentado e o método espectrofotométrico manual.

amostras	método manual	método monosegmentado
1	4,49	4,62
2	10,88	10,76
3	7,53	7,51
4	8,09	8,15
5	8,04	8,56
6	14,71	16,00
7	3,40	3,44

6.11 - Análise de Amostras de Urina

Foi feita análise de algumas amostras de urinas, obtendo-se os resultados mostrados na tab. 6.16.

Tabela 6.16- Análise de urina com extração de 30 min. O nitrobenzeno foi adicionado após a extração

conc. de fenol adicionada à urina (mg/L)	concentração de fenol (mg/L) obtida no cromatograma	rendi- mento %	concentração de creatinina (g/L)	conc. de fenol normali- zada*
14,25	13,58	95	1,50	--
29,73	28,98	98	2,1	--
0	5,01	--	0,9	5,42

* mg de Fenol / g de creatinina

Nas determinações cromatográficas foram utilizadas as seguintes condições: temperatura da coluna 100°C, temperatura do detector 210°C, temperatura do vaporizador 241°C, R.D. = 1/30, ganho do eletrometro de 10^{-12} A/mV e atenuador de 16 ou 32.

O rendimento da extração foi superior ao obtido na extração simples em tubo, como esperado, indicando que este realmente é um método melhor de hidrólise e extração.

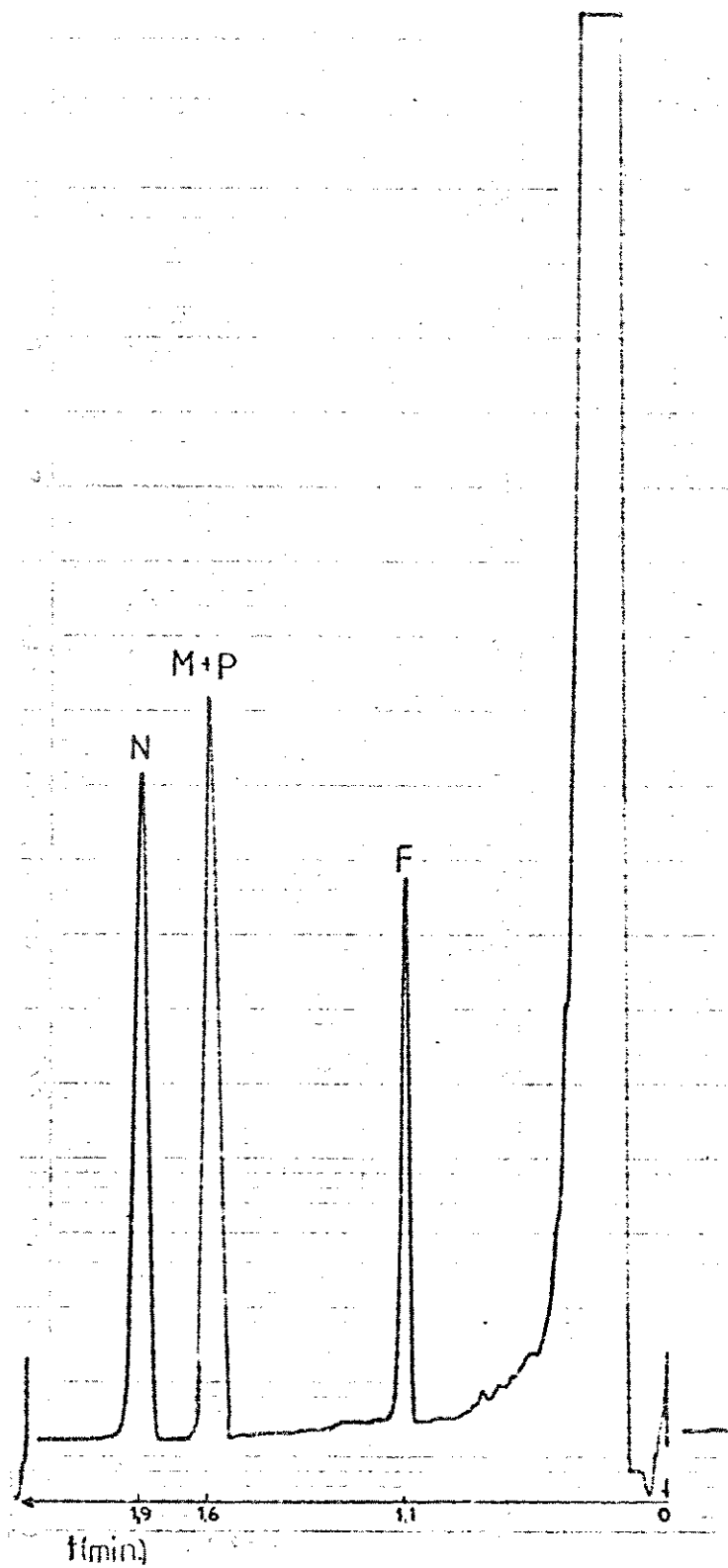


Figura 6.16 - Cromatograma de análise de fenol na urina

$T_c = 100^{\circ}\text{C}$, $T_d = 210^{\circ}\text{C}$, $T_v = 241^{\circ}\text{C}$, R.D. = 1/30

$A = 32 \cdot 10^{-12}$

CAPÍTULO 7

CONCLUSÃO

O fenol é muito volátil e higroscópico sendo necessário certos cuidados no seu manuseio, tais como a utilização de sistema fechado e gás inerte, isento de água, para se efetuar a pesagem dos cristais a serem utilizados na construção da curva padrão. Além disto, o teor de impurezas existentes no fenol deve ser verificado. Estes cuidados evitam a ocorrência de desvios na curva padrão, que poderiam acarretar grandes desvios nos resultados finais de determinação de fenol na urina.

O método de análise escolhido foi o de cromatografia gasosa porque esta técnica tem alta sensibilidade, permitindo a quantificação do fenol e sua completa separação dos demais componentes da urina, que são interferentes nos métodos colorimétricos. A coluna capilar de vidro era inadequada para quantificação de fenol na faixa de concentração de interesse, 5,0 a 50,0 mg/L, sendo que não foi possível estabelecer condições cromatográficas que resultassem na separação dos picos de fenol do solvente. Utilizou-se então uma coluna capilar de sílica fundida

tipo "Megabore", que por permitir o envio de massas maiores ao detector, possibilitou a quantificação de fenol na faixa de interesse.

A coluna capilar de sílica fundida possibilitou a utilização de nitrobenzeno como padrão interno, pois nesta há a separação de nitrobenzeno e orto-cresol, a qual não ocorre em colunas empacotadas.

Utilizando-se extração em tubo para efetuar a transferência do fenol da amostra de urina para uma solução de éter isopropílico, verificou-se que o rendimento é baixo (50-60%), e a extração não é completa em uma etapa. Além disto, pode ocorrer perda de fenol, devido à sua alta volatilidade, durante o aquecimento na hidrólise ácida, ou por arraste no momento de abertura dos tubos para se efetuar a extração. Optou-se, então, pelo uso de extração contínua onde a hidrólise e a extração são efetuadas simultaneamente, em sistema fechado. O rendimento foi bem maior (78-90%) que na extração em tubo. Verificou-se que o tempo ideal de extração é de 30 min. e que a solução de nitrobenzeno, padrão interno, deve ser adicionada após a extração.

O rendimento da hidrólise ácida, efetuada para liberação do fenol, que se encontra na urina como ácido fenil glicurônico ou ácido fenil sulfônico, não foi verificado pela dificuldade de obtenção destes ácidos no Brasil.

A quantificação de creatinina na urina foi escolhida para normalizar a concentração de fenol urinário, sendo o método de análise em fluxo contínuo monosegmentado uma boa opção para

laboratórios que precisam, diariamente, realizar um grande número de análises de creatinina.

Acoplando todas as etapas pesquisadas, determinou-se fenol em uma amostra de urina obtendo-se resultados confiáveis.

Algumas dificuldades técnicas impossibilitaram a análise de um maior número de amostras de urina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - ANAMI, D.; MARTINS, A., R. ; Nova Fase Estacionária Aplicada a Determinação de Fenol Urinário - Rev. Bras. Saúde Ocupacional, 13: 7 - 11, 1985.

2 - BAARSON, K., A.; SNYDER, C. A.; ALBERT, R. E.; Repeated Exposure of C57BI Mice to Inhaled Benzene at 10 ppm Markedly Depressed Erythropoietic Colony Formation - Toxicol. Letter., 20: 337-342, 1984.

3 - BACCAN, N.,; ANDRADE, I.C.; GODINHO, O.E.S; BARONE, J.S. - "Química Analítica Quantitativa Elementar". São Paulo. Ed. Edgar Blucher Ltda, 16-29, 1979.

4 - BAXTER, H.G; BLAKEMORE, R.; MOORE, J.P.; The Measurement of Airbone Benzene Vapour - Ann. Occup. Hyg., 23 : 117-132, 1980

5 - BIGGS, H.G.; COOPER, J.M.; Modified Folin Methods for the Measurement of Urinary Creatinine and Creatinine - Clin. Chem., 7: 655-664, 1961.

- 6 - BONATO, P.S.; Cromatografia Gasosa - In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. - "Introdução a Métodos Cromatográficos", Campinas, Editora da UNICAMP, 145-178, 1987.
- 7 - BRIEF, R.S.; LINCH, I.; BERNATH, T.; SCALA, R.A.; Benzene in the Workplace, Am. Ind. Hyg. Assoc. J., 41: 616-623, 1980.
- 8 - BUCHET, J.P.; LAUWERYS, R.; CAMBIER, M.; An Improved gas Chromatographic method for the determination of phenol in urine - I. Europ. Toxicol., 1: 27-30, 1972.
- 9 - CIOLA, R. - "Fundamentos da Cromatografia a Gás" - São Paulo. Ed. Edgar Blucher Ltda, 92-101, 1985.
- 10 - COLACIOPPO, S. - Noções de Toxicologia. In "Curso de Medicina do Trabalho". São Paulo, FUNDACENTRO, 4: 915, 1982.
- 11 - CONFERENCIA INTERNACIONAL DEL TRABAJO - Recomendacion sobre la Proteccion Contra los Riesgos de Intoxicacion por el Benceno, Genebra, 1971.
- 12 - COOPER, J.M.; BIGGS, J.M.; An Evaluation of Methods of Measuring Urinary Creatinine - Clinical Chemistry, 7: 665-673, 1961.
- 13 - DAVIDSOHN, I.; HENRY, J.B. - "Clinical Diagnosis". Philadelphia. W.B. Saunders, 594-596, 1974
- 14 - DIRMIKIS, S.M.; DARBRE, A.; Gas-Liquid Chromatography of Simple Phenols for Urinalysis - J. Chromatogr., 94 : 169-187, 1974.

- 15 - DOCTER, H.J.; ZIELHUIS, R.L.; Phenol Excretion as a Measure of Benzene Exposure - Am. Occup. Hyg., 4: 317-326, 1967.
- 16 - DUFEK, P.; PACAKOVA, V.; ZIVNY, K.; Gas Chromatographic Behavior of Mono and Dihydroxybiphenyls on Various Silicone Phases - J. Chromatogr. 211: 150-154, 1981.
- 17 - ETTINGER, M.B.; RUCHHOFT, G.C; LISHKA, R.J.; Anal. Chem., 23: 1783, 1951.
- 18 - FEIGL, F.; JUNGREIS, E.; Spot Tests for Phenol Vapors and for Aromatic Compounds Containing Oxygen - Anal. Chem., 31: 2099-2101, 1959.
- 19 - FELL, V.; LEE, C.R.; Determination of Urinary Monohydric and Dihydric Phenols by gas Chromatography of the Acetate and TMS Derivates - J. Chromatogr., 121: 41-47, 1976.
- 20 - FERNICOLA, N.A.G.G e COLAB., Excreção Urinária de Fenol em Trabalhadores de Indústria de Calçados Expostos ao Benzeno - Rev. Saúde Pública, 10: 327-33, 1976.
- 21 - FREEMAN, R.R. - "Higher Resolution Gas Chromatography", Palo Alto, Hewlett Packard Company, 1981.
- 22 - GIBBS, H.D.; Phenol Testes - J. Biol. Chem., 72: 649-663, 1927.
- 23 - GOREN-STRUL, S.; KLEIJN, H.F.W; MUSTAERT, A.E., Identification and Determination of Phenols and Chlorophenols in very dilute aqueous solutions by gas-liquid chromatography, paper

chromatography and spectrophotometry - Anal. Chim. Acta, 34: 332-336, 1966.

24 - GROB, R.L. - "Modern Practice of Gas Chromatography", 2a. edição, New York, John Wiley & Sons, capítulo 4, 1985.

25 - GUYTON, A.C. - "Tratado de Fisiologia Médica", México, Editorial Interamericana, S.A., 86, 1963.

26 - HAMMOND, J.W.; HERMAN, E.R.; Industrial Hygiene Features of a Petrochemical Benzene Plant Design and Operation - Ind. Hyg. J. 173-177, 1960.

27 - HASEGAWA, K.; SHIOJIMA, S. KOIZUMI, A.; IKEDA, M.; Hippuric Acid and o-cresol in Urine of Workers Exposed to Toluene - Int. Arch. Occup. Environ Health, 52: 197-208, 1983.

28 - HEISTAND, R.N.; TODD, A.S.; Automated Determination of total Phenol in Urine - Am. Ind. Hyg. Asso. J., 33: 378-381, 1972.

29 - HENRY, R.J.; CANNON, D.C.; WINKELMAN, J.W. - "Química Clínica" - Buenos Aires, Editorial JIMS, 546-556, 1980.

30 - HUNTER, C.G.; BLAIR, D.; Benzene: Pharmacokinetic studies in man - Am. Occup. Hyg., 15: 193-199, 1972.

31 - IARC - Benzene In: " Monographs on the Evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man"; Ottawa, Department of National Health and Welfare, 1978.

32 - ILO - "Benzene: Uses, Toxic effects and Substitutes", Geneva, International Labour Office, 1968.

- 33 - JIRKA, A.M.; BOURNE, S.; Gas-Chromatographic Analysis for Benzene in Blood - Clin. Chem., 28: 1492-1494, 1982.
- 34 - KALMAN, D.; Optimized Injection for Determination of Free Phenols by gas chromatography using Fused Silica Columns - J. High Resol. Chromatogr., 6: 564-569, 1980.
- 35 - KEULEMANS, A.I.M - "Gas chromatography" - Washington, Reinold Publishing Corporation, 22, 1966.
- 36 - LISI, R.A.; GROSSI, E.J.; Determinação de Fenol na Urina para Controle do Níveis de Exposição ao Benzol - Rev. Bras. Saúde Ocupacional, 12: 31-34, 1984.
- 37 - Manuais de Legislação Atlas - "Segurança e Medicina do Trabalho" - Editora Atlas S.A., NR-7-Anexo II, 74, 1984.
- 38 - McNair, H.M.; BONELLI, E.J. - "Basic Gas Chromatography", Palo Alto, Varian Associates, capítulo 11, 1968.
- 39 - MOHLER, E.F.; JABOC, L.N.; Anal. Chem., 29: 1369, 1957.
- 40 - NAKAJIMA, T.; TANOBE, C.; Determination of Weak and Very Weak acids in Bitumen and Similar materials - J. Inst. Petroleum, 59: 32-39, 1973.
- 41 - NARAYANAN, S.; APPLETON, H.D.; Creatinine: A Review - Clin. Chem., 26: 1119-1126, 1980.
- 42 - NATIONAL INSTITUTE OF SAFETY AND HEALTH - "Manual of Analytical Methods" - U.S. Dept. of Health, Education, and, Welfare, vol. II, 330, 1977.

- 43 - NOMYIYAMA, K., NOMYIAMA, H.; Gas-Liquid Chromatographic Determination of Benzene Metabolites - J. Chromatogr., 44 : 386-388, 1969.
- 44 - NOVAES, T.C.P.; GRUENZNER, G.; SOTO, J.M.O.; Determinação dos Teores de Benzeno em Solventes Orgânicos Industriais Comercializados no Brasil e Propostas para a Prevenção do Risco Potencial de Benzo lismo - Rev. Bras. Saúde Ocupacional, 66-70, 1975.
- 45 - OHLWEILER, O.A. - "Química Analítica Quantitativa", 3ª edição, Rio de Janeiro, Livros Téc. e Cient. Ed. S.A., 1, 1982.
- 46 - OSHA - "Occupational Exposure to Benzene", Docket No. H-059C, 21-24, 59-68, 131-139, 304, 320, 330-340.
- 47 - PAGNOTTO, L.D.; KEEMAN, R.G.; Sampling and Analysis of Gases and Vapors — In: NIOSH - The Industrial Environment - its Evaluation & Control, Washington, U.S. Government Printing Office 1971.
- 48 - PASQUINI, C.; OLIVEIRA, W.A.; Monosegmented System for Continuous Flow Analysis. Spectrophotometric Determination of Chromium (VI), Ammonia and Phosphorus - Anal. Chem. Society, 57:2575-2579, 1985.
- 49 - PIERCE, J.T.; McDONALD, S.M.; SCOING, M.S.; Experiments Integrating Evaluation of Chemical Hazards into the Chemistry Curriculum - J. Chem. Educ., 61:A83-A84, 1984.
- 50 - PROCTOR, N.; HUGHES, J.; Benzene - In: "Chemical Hazards of the Work Place", Philadelphia, J.B. Lippincott Co., 118-119, 1978.

- 51 - ROUSH, G.J.; OTT, M.G.; A Study of Benzene Exposure Versus Urinary Phenol Levels - Am. Ind. Hyg. Assoc., 13: 125-146, 1970.
- 52 - SHERWOOD, R.J.; Benzene: The Interpretation of Monitoring Results, Ann. Occup. Hyg., 15: 409-419, 1972.
- 53 - SHERWOOD, R.J.; CARTER, F.W.G.; The Measurement of Occupational Exposure to Benzene Vapour; Ann. Occup. Hyg., 13:125-146, 1970.
- 54 - SNYDER, C.A.; LASKIN, S.; GOLDSTEIN; A Extrative method for determination of benzene in blood by gas chromatography - Am. Ind. Hyg. Assoc. J., 36: 833-836, 1975.
- 55 - SNYDER, C.A.; Analytical Techniques - In: LASKIN, S.; GOLDSTEIN, B. - "Benzene Toxicity", Washington, Hemisphere Publishing Corporation, 5-36, 1977.
- 56 - SPIEGEL, H.E; OPAR G.E.; An Improved Method for determining total urinary phenol - J. Chromatogr., 155: 159-167, 1978.
- 57 - TEISINGER, J; FISEROVA-BERGEROVA; Valuer comparé de la détermination des sulfates et du phénol contenu dans l'urine pour l'évaluation de la concentration du benzène dans l'air - Arch. Mol. Prof. Med. Trav., 16: 221-232, 1955.
- 58 - TESAROVA, E.; PACAKOVA, V.; Gas and High Performance Liquid Chromatograph of Phenols - Chromatographia, 17: 269-284. 1983.
- 59 - THEIS, R.C.; BENEDICT, S.R.; The Determination of Phenols in the Blood - J. Biol. Chem., 67-71, 1924.

- 60 - TIETZ, N.W. - Fundamental of Clinical Chemistry, Philadelphia. W. B. Saunders Company, 722-726, 1970.
- 61 - VALENTE, A.L.P. - Desenvolvimento e Avaliação de Métodos Cromatográficos Para Compostos do Tipo $C_xCL_yBr_zH_n$, Campinas, 1984 (Dissertação de Doutorado - Instituto de Química da UNICAMP).
- 62 - VALLAUD, A. - L'Hygiene et la Sécurité dans L'Emploi des Hydrocarbures Benzeniques - Paris. Edition INRS, 1971.
- 63 - VAN HAAFTEN, A.B.; SIE, S.T.; The Measurement of Phenol in Urine by Gas Chromatography as a check on Benzene Exposure, Ind. Hyg. Jour., 52-58, 1965.
- 64 - VAN ROOSMALEN, P.B.; PURDHAM, J.; DRUMMOND, I.; An Improved Method for the Determination of Phenol in the Urine of Workers Exposed to Benzene or Phenol - Int. Arch. Environ. Health, 48 : 159-163, 1981.
- 65 - VAN STADEN, J.F.; Determination of Creatinine in Urine and Serum by Flow-Injection Analysis using the Jaffé Reaction, Anal. Chim. Acta., 141-144, 1983.
- 66 - WAKAMATSU, C.T.; - Contribuição ao Estudo da Exposição Profissional ao Benzeno em Trabalhadores de Indústria de Calçados - São Paulo, São Paulo, 1976. (Dissertação de Mestrado - Faculdade de Saúde Pública da USP).
- 67 - WAKAMATSU, C.T.; FERNICOLA, N.A.G.G.; Intoxicação Profissional por Benzeno - In: MENDES, R. - "Medicina do Trabalho - Doenças Profissionais", São Paulo, Sarvier, 479-488, 1980.

68 - WALKLY, .E.; PAGNATTO, L.D.; ELKINS, H.B.; Measurement of Phenol in Urine as an Index of Benzene Exposure - Am. Ind. Hyg. Assoc. J., 22: 362, 1961.

69 - WEXLER, .S.; Determination of Phenolic Substances by Ultraviolet Difference Spectrometry - Anal. Chem., 35:1936-43, 1963.

70 - WHITE, M. C.; LI, C.N.; Gas Chromatographic Retention Characteristics of Phenols With Superox-20 M - Anal. Chem., 54:1564-1570, 1982.

71 - WHITE, M. .; INFANTE, P.F.; WALKER, B.Jr.; Occupational Exposure to Benzene: A Review of Carcinogenic and Related Health Effects Following the U. S. Supreme Court Decision - Am J. of Ind. Med., 1: 33-243, 1980.

72 WILLIAMS, .T. - Detoxication Mechanism, London, Chapman & Hall, 36-41, 959.

73 - WORLD HEALTH ORGANIZATION - Early Detection of Health Impairment in Occupational Exposure to Health Hazards, Geneva, 10-21, 1975.

74 - ... Efectos adversos en la reproducción por exposición a productos químicos - Noticias de Seguridad, 5-46, 1985.

75 - ... "Estado sobre Leucopenia" - São Paulo. Gomes Editora e Consultoria de Comunicação Empresarial, 1986.