

Determinação simultânea dos ácidos hipúrico e metil-hipúrico urinários por métodos cromatográficos: comparação entre cromatografia líquida de alta eficiência e cromatografia gasosa capilar

Zelaine Lima Silva, Josianne Nicácio Silveira, Márcio Jacinto, Leiliane Coelho André Amorim, Edna Maria Alvarez-Leite*

Laboratório de Toxicologia Ocupacional, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais

O presente trabalho foi realizado objetivando-se comparar a eficiência de dois métodos analíticos, um por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e outro por cromatografia em fase gasosa com coluna capilar (CG), na determinação conjunta do ácido hipúrico (AH) e ácido metil-hipúrico (AMH) em urina de indivíduos expostos ocupacionalmente ao tolueno e xileno. Após a validação analítica foi observado que o método CLAE apresentou melhores precisão intra e interensaio, porcentagem de recuperação e sensibilidade. Amostras de urina de trabalhadores expostos aos dois solventes em fábrica de tintas-látex foram analisadas pelos dois métodos validados e os resultados avaliados estatisticamente. Não se encontrou diferença significativa entre os valores de AH superiores a 1,0 g/g de creatinina, quando determinados pelos dois métodos cromatográficos. Esta similaridade não foi repetida quando os níveis de AH eram inferiores a 1,0 g/g de creatinina. Os valores de AMH nas amostras analisadas estavam, na maioria das vezes, abaixo do limite de detecção, razão pela qual não foi realizada a comparação estatística entre os mesmos.

Unitermos:

- Ácido hipúrico
- Ácido metil-hipúrico
- Cromatografia de alta eficiência
- Cromatografia gasosa
- Amostra de urina

*Correspondência:

E. M. Alvarez-Leite
Depto. Análises Clínicas e
Toxicológicas
Faculdade de Farmácia da UFMG
Av. Olegário Maciel 2360
30350-120 - Belo Horizonte - MG -
Brasil.
E-mail: alem@dedalus.lcc.ufmg.br

INTRODUÇÃO

O tolueno e o xileno são, atualmente, dois dos hidrocarbonetos aromáticos mais utilizados no meio ocupacional (Wallen *et al.*, 1995).

Estudos têm demonstrado que a exposição conjunta a estes dois solventes pode resultar no aparecimento de interações toxicocinéticas importantes, uma vez que ambos são inibidores mútuos da biotransformação. Esta inibição poderá resultar em alterações nas concentrações urinárias dos metabólitos ácido hipúrico e metil hipúrico utilizados, respectivamente, como indicadores biológicos na exposição ocupacional ao tolueno e xileno (Alessio,

1996; Plaa *et al.*, 1992).

Assim, a utilização de métodos analíticos que permitam a identificação conjunta destes biomarcadores é de grande importância para a melhor interpretação dos resultados da monitorização biológica da exposição.

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a cromatografia em fase gasosa (CG) são, atualmente, os métodos mais utilizados para a determinação urinária destes metabólitos (Kira, 1977; Poggi *et al.*, 1982; Lundberg, Sollenberg, 1986; Ogata, Taguchi, 1988; Sakai *et al.*, 1989; Carvalho, 1991; Inoue *et al.*, 1991; Ukai *et al.*, 1994; Ikeda, 1995; Kawamoto *et al.*, 1995; Amorim, Alvarez Leite, 1997; Burini, 1998).

A cromatografia em fase gasosa (CG) foi a primeira a ser utilizada na determinação conjunta dos dois compostos (Buchet, Lauwerys, 1973; Kira, 1977). Estas determinações são feitas, geralmente, utilizando-se detector de ionização de chama (DIC), o que exige derivação prévia dos compostos a serem analisados, sendo as mais frequentes a metilação e/ou a esterificação. Trabalhos mais antigos (Buchet, Lauwerys, 1973; Kira, 1977) utilizavam o diazometano como metilante, mas esta substância, além de ser volátil, tóxica, carcinogênica e explosiva, produzia baixo rendimento analítico, o que determinou o estudo de metilantes alternativos.

Carvalho *et al.*, em 1991, realizaram a derivação do AH e AMH com metanol em meio ácido, num tempo de reação de 45 minutos. Após injeção dos compostos metilados em coluna empacotada SE 30 e detecção em DIC, os autores demonstraram ter obtido bom rendimento na etapa de metilação, boa precisão analítica e um processo menos dispendioso e mais seguro de análise.

Löf *et al.* (1993) propuseram um método de análise para AH e AMH utilizando uma esterificação com mistura de $\text{CHCl}_3/\text{SOCl}_2$. Os compostos esterificados (éster metil do AH e éster metil do AMH) apresentaram boa separação na coluna cromatográfica utilizada (CP-Sil 8 CB).

Alvarez Leite *et al.* (1994) propuseram o uso do hidróxido de trimetilfenil amônio (TMFA) como agente metilante. Os autores afirmaram que as principais vantagens do uso do TMFA foram o pequeno tempo necessário para metilação (1 minuto sob agitação), o baixo custo, a segurança da reação, a boa sensibilidade e a precisão.

A cromatografia líquida de alta eficiência vem sendo, nos últimos anos, cada vez mais indicada para esta determinação (Inoue *et al.*, 1991; Tardif *et al.*, 1991 e 1992b; Ikeda, 1995; Burini, 1998). Uma das vantagens dos métodos por CLAE é a não necessidade de derivar os compostos antes da análise cromatográfica, tornando-os mais rápidos, econômicos e precisos do que os métodos cromatográficos em fase gasosa.

O presente trabalho teve como objetivo comparar a eficiência de dois métodos analíticos, um por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e outro por cromatografia gasosa (CG), para a determinação conjunta dos ácidos hipúrico e metil hipúrico em urina de indivíduos expostos aos solventes.

Na seleção dos dois métodos cromatográficos a serem validados e comparados, buscou-se, além da capacidade de determinar simultaneamente os compostos de interesse, condições analíticas simplificadas, capazes de serem reproduzidas mesmo em laboratórios de toxicologia menos sofisticados. Nos métodos CLAE optou-se por sistema isocrático, coluna de fase reversa e detecção UV. Na escolha

do método CG, foram consideradas, principalmente, a eficiência e simplicidade da etapa de derivação prévia dos compostos e a detecção por ionização de chama.

Os métodos foram comparados considerando-se alguns parâmetros de validação analítica, tais como linearidade, sensibilidade, precisão, porcentagem de recuperação e rapidez. Amostras de urina de indivíduos expostos ocupacionalmente ao tolueno e xileno foram, então, analisadas pelos dois métodos validados e os valores de AH e AMH encontrados foram comparados estatisticamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Padrões

Foram utilizadas soluções metanólicas dos padrões de ácido hipúrico (Fluka®) e ácido *m*-metil hipúrico (Sigma®) em diferentes concentrações.

Equipamentos e acessórios

Cromatógrafo líquido de alta eficiência da Hewlett Packard modelo 1100 equipado com detector UV G1316 A, Chemstation software G2170AA Rev. A.04.02, coluna cromatográfica Lichrosorb RP18 (244 x 4) com partículas de 5 mm da Merck®. Cromatógrafo a gás da Hewlett Packard modelo 5890 Series II, equipado com detector de ionização de chama (DIC), coluna capilar HP-1 (12 m de comprimento; 0,2 mm de diâmetro interno; filme interno com espessura de 0,33 mm) e integrador modelo HP 3395.

Amostragem

As amostras destinadas à validação dos métodos analíticos foram preparadas a partir de *pool* de urina de indivíduos não expostos aos solventes orgânicos. Alíquotas das amostras colhidas e homogeneizadas foram enriquecidas com soluções padrão de ácido hipúrico e metil hipúrico, em diferentes concentrações. Alíquotas do *pool* de urina não adicionado de AH foram utilizadas como “branco”, objetivando eliminar a interferência quantitativa dos níveis basais de AH presente na matriz biológica.

As amostras de urina de indivíduos expostos aos solventes foram obtidas de trabalhadores (n=72) expostos a tolueno e xileno em uma indústria de tintas látex, da região metropolitana de Belo Horizonte. Não houve preocupação quanto à estratificação dos indivíduos selecionados em função de idade, hábitos individuais e fatores ambientais, uma vez que o objetivo era o de testar a aplicabilidade dos métodos otimizados e comparar os resultados obtidos.

Métodos

Determinação por CLAE

Após pequenas modificações, o método de Inoue *et al.* (1991), foi selecionado para a determinação do ácido hipúrico (AH) e ácido metil-hipúrico (AMH) urinários por CLAE, como se segue:

- 1 mL de urina foi transferido para tubos de centrifuga, acrescentado de 1 mL de metanol, os tubos foram vedados com Parafilm "M", agitados por 20 segundos e centrifugados a 3000 rpm por 7 minutos. Alíquota de 20 mL do sobrenadante foi injetada no aparelho CLAE.

A coluna cromatográfica utilizada foi a Lichrosorb RP18 (244 x 4) com partículas de 5 mm da Merck®.

A fase móvel utilizada foi a mistura de água:metanol:ácido acético (792:200:8 v/v), em fluxo de 1,3 mL/min. A temperatura do termostato da coluna foi mantida a 40 °C e a detecção realizada em $\lambda = 257$ nm.

Determinação por CG

O método descrito por Alvarez Leite *et al.* (1994), foi modificado e utilizado para esta determinação, como segue. Adicionar 100 mL de HCL 6 mol/L em 0,5 mL de urina e extrair com 4,0 mL de acetato de etila. Transferir 3,5 mL da fase orgânica e adicionar 200 mg de sulfato de sódio anidro. Após agitação, transferir 3,0 mL a fase orgânica para tubos de centrifuga e adicionar 0,5 mL de solução metanólica de ácido heptadecanóico (0,4 mg/mL, padrão externo). Evaporar até resíduo em banho de água a 70 °C, sob fluxo de nitrogênio, resfriar os tubos e adicionar 150 μ L de agente metilante (hidróxido de trimetilfenil amônio). Agitar os tubos por 1 min em agitador de tubos (3000 rpm) e injetar 1 μ L no aparelho CG.

As condições cromatográficas utilizadas foram: temperatura do injetor = 225 °C, temperatura do detector = 250 °C, programação da temperatura da coluna (temperatura inicial-TCi=200 °C por 3 min, rampa de aumento-Rp=25 °C/min até temperatura final-TCf =225 °C, mantida durante 0,5 min), fluxo do gás de arraste:0,2 mL/min, injeção no modo *split* (razão de divisão de 1/18).

Para cada um dos dois métodos estudados foram avaliados o limite de detecção, limite de quantificação, linearidade, porcentagem de recuperação e precisão intra e interensaio. Todas estas etapas da validação analítica foram realizadas utilizando-se amostras em quintuplicata.

A quantificação do AH e AMH nas amostras de urina dos indivíduos expostos foi realizada com o auxílio de curvas de calibração construídas plotando-se as áreas dos

picos cromatográficos em função das concentrações adicionadas. No caso específico do método CG foram utilizadas as áreas relativas dos picos (relações AH/PI e AMH/PI).

As concentrações dos compostos determinadas nas amostras de urina analisadas pelos dois métodos validados foram estudadas estatisticamente (grau de significância: $p < 0,05$). Foram utilizados os testes de Kolmogorov-Smirnov (para conhecer a distribuição dos dados) e Mann Whitney Sun Rank para verificar diferença significativa entre as médias dos dados experimentais. Estes estudos foram realizados com o auxílio do pacote estatístico SigmaStat® for Windows (versão 2.0), da Jandel Corporation®.

RESULTADOS

Nas condições CLAE estabelecidas, o AH e AMH apresentaram, respectivamente, tempo de retenção (t_r) igual a $6,5 \pm 0,17$ min e $13,0 \pm 0,44$ min, mostrando-se bem separados dos demais componentes presentes na urina (Figura 1).

O método otimizado no presente trabalho não possibilita a separação dos metabólitos dos isômeros do xileno, uma vez que os ácidos *m*- e *p*-metil hipúrico apresentam o mesmo tempo de retenção. Do ponto de vista da monitorização biológica este fato não é importante, considerando-se que os dois principais metabólitos são determinados (Carvalho, 1991).

Na análise realizada por CG, o tempo de retenção do AH relativo ao ácido heptadecanóico (t_{rr}) foi igual a $0,45 \pm 0,18$ min.. Considerando-se o AM, o t_{rr} foi de $0,57 \pm 0,2$ min.. Nestes casos, também, não foi observada interferência dos compostos fisiológicos da urina, nos cromatogramas obtidos (Figura 2).

A faixa de concentração na qual a resposta do detector UV do aparelho CLAE se mostrou linear variou de 0,09 a 3,0 mg/mL ($R^2=0,9999$) para o AH e de 0,032 a 3,0 mg/mL ($R^2=0,9999$) para o AMH. No método CG a resposta linear ocorreu na faixa de 0,25 a 3,0 mg/mL ($R^2=0,9933$) para o AH e 0,5 a 3 mg/mL ($R^2=0,9986$) para o AMH.

O método CLAE apresentou como limite de detecção (LD) para AH e AMH os valores de 0,046 mg/mL e 0,016 mg/mL, respectivamente. O método CG mostrou-se menos sensível, com LD de 0,125 mg/L (AH) e 0,250 mg/L (AMH).

As Tabelas I e II expressam os resultados obtidos no estudo de precisão e recuperação dos métodos.

Foi considerado como limite de quantificação (LQ) a menor concentração da curva de calibração que apresentou CV menor ou igual ao coeficiente de variação interensaio estabelecido para as menores concentrações de

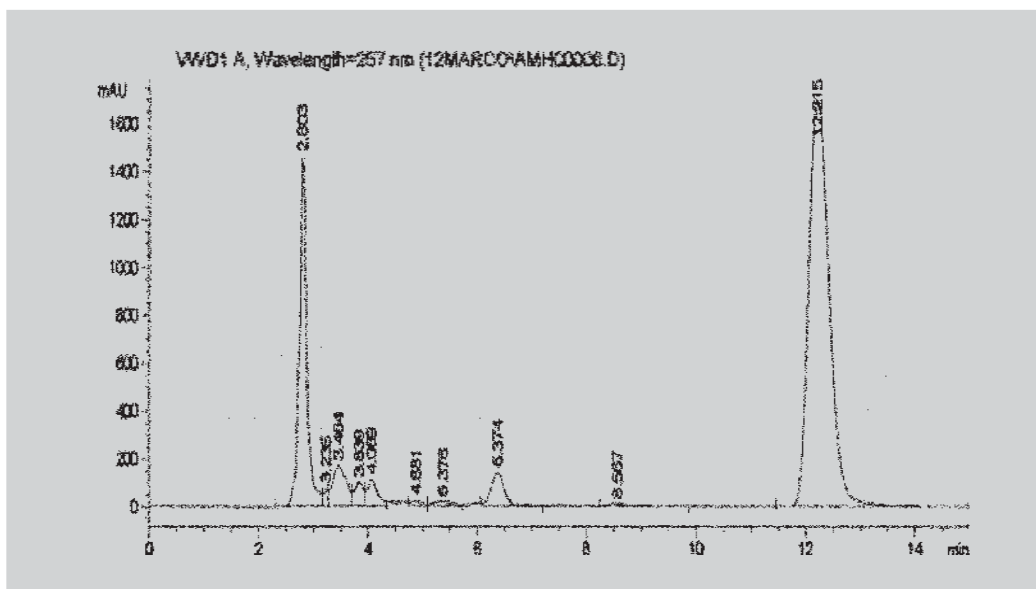


FIGURA 1 - Cromatograma obtido após injeção de 20 μ L de *pool* de urina de indivíduos não expostos, adicionado de ácido hipúrico (0,75 mg/mL) e ácido metil hipúrico (2,0 mg/mL). Cromatógrafo HP modelo 1100, coluna – Lichrosorb RP18 (244 x 4) 5 mm, fase móvel – água: ácido acético: metanol (792:200:8), detecção: U.V., $\lambda = 257$ nm, temperatura = 40 °C, (AH: $t_r=6,37$; AMH: $t_r=12,215$).

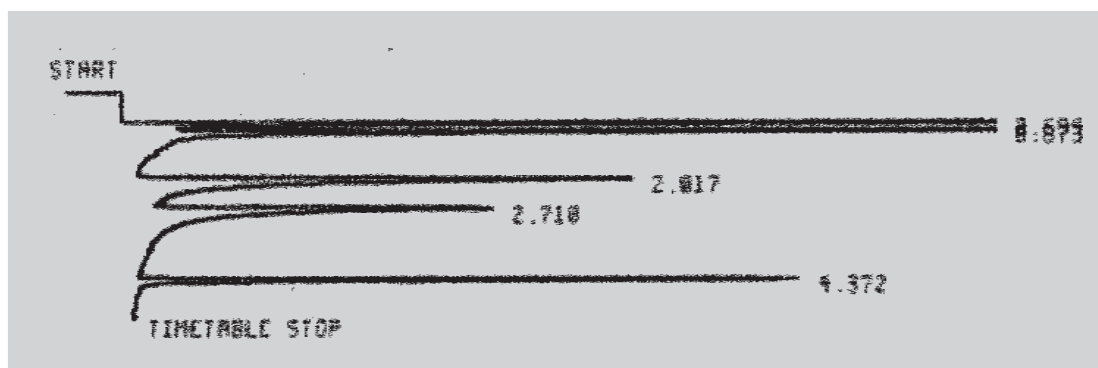


FIGURA 2 - Cromatograma obtido após injeção de 1 μ L do extrato de *pool* de urina de indivíduos não expostos aos solventes, adicionado de AH e AMH (2,0 mg/mL) e AHD (0,4 mg/mL) Cromatógrafo a gás HP 5890 Series II equipado com detector de ionização de chama e coluna capilar HP-1, $T_{Ci}=200$ °C/3 min, $R_p=25$ °C/min, $T_{Cf}=225$ °C/0,5 min; $T_V=225$ °C e $T_D=250$ °C. (AH: $T_r=1.999$; AMH: $T_r=2,688$; AHD: $T_r=4.372$)

TABELA I - Precisão dos métodos analíticos para determinação do ácido hipúrico (AH) e ácido metil hipúrico (AMH) urinários expressa em função dos coeficientes de variação (CV) intra e interensaio

Composto	Concentração (mg/mL)	CV intraensaio (%)		CV Interensaio (%)*	
		CLAE	CG	CLAE	CG
Ácido hipúrico (AH)	0,25	0,5	0,6	3,5	2,5
	2,0	6,4	4,3	16,9	6,4
Ácido metil hipúrico (AMH)	0,25	2,1	1,6	3,3	3,9
	2,0	6,4	6,2	17,2	4,2

*análise realizada em quintuplicata durante 4 dias consecutivos.

TABELA II - Porcentagem de recuperação dos métodos analíticos utilizados para a determinação do ácido hipúrico (AH) e ácido metil-hipúrico (AMH) urinários

Composto	Concentração (mg/L)	Recuperação (%)	CLAE CG
Ácido hipúrico (AH)	0,25	99,7	99,5
	2,0	76,3	91,7
Ácido metil hipúrico (AMH)	0,25	100,9	103,5
	2,0	96,5	96,6

TABELA III - Equação das retas obtidas das curvas de calibração do ácido hipúrico (AH) e ácido metil hipúrico (AMH)

Método	Composto	Equação da Reta	R ²
CLAE	Ácido hipúrico (AH)	$y=762,4x - 740,84$	0,9988
	Ácido metil hipúrico (AMH)	$y=899,85x + 876,73$	0,9997
CG capilar	Ácido hipúrico (AH)	$y=1,323x - 0,255$	0,9968
	Ácido metil hipúrico (AMH)	$y=1,217 - 0,166$	0,9990

AH e AMH estudadas, ou seja 4% para o AH e AMH na análise por CLAE e 17% para AH e AMH na determinação por CG. De acordo com este parâmetro, os limites de quantificação do AH e AMH no método CLAE foram, respectivamente, 0,09 mg/mL e 0,032 mg/mL. No método CG, os limites de quantificação apresentaram-se iguais aos limites de detecção anteriormente estabelecidos.

As equações das retas das curvas de calibração construídas para o AH e AMH urinários estão na Tabela III.

Determinação do AH e AMH em amostras de urina de trabalhadores expostos aos solventes

Os métodos analíticos validados foram utilizados para a determinação dos níveis de AH e AMH em amostras de urina de indivíduos expostos ocupacionalmente ao tolueno e xileno, em uma indústria de fabricação de tintas látex (n=72).

Os valores de AH e AMH encontrados foram corrigidos pela concentração de creatinina urinária, determinada através do kit Analisa® (todas as amostras foram analisadas em duplicata).

A Tabela IV apresenta as concentrações de AH determinadas por cromatografia líquida de alta eficiência e por cromatografia em fase gasosa, em amostras de urina dos trabalhadores expostos aos solventes. Das 72 amostras inicialmente selecionadas para o trabalho, 3 foram desconsideradas por apresentarem concentração de

creatinina fora da faixa considerada aceitável (concentrações < 0,3 g/L e > 3,0 g/L).

TABELA IV - Valores referentes à determinação do ácido hipúrico (AH) em amostras de urina de indivíduos expostos ocupacionalmente ao tolueno e xileno (n= 69), utilizando-se método CG e CLAE

AH (g/g creatinina)	Método	
	CG	CLAE
Média ± IC	0,76 ± 0,13	0,92 ± 0,12
MG ± DP	0,61 ± 0,53	0,76 ± 0,51
Mediana	0,6	0,8
Valor mín	0,1	0,1
Valor máx	2,2	2,3

IC= intervalo de confiança 95%, MG=média geométrica, DP=desvio padrão

Em relação à determinação do AMH urinário, a maioria das amostras selecionadas para o estudo apresentou concentrações quantificáveis pelo método CLAE, mas não por CG. Dentre todas as amostras analisadas, apenas 5 apresentaram níveis quantificáveis de AMH pelos dois métodos, razão pela qual o estudo comparativo não pode ser realizado. Os resultados quantificáveis de AMH pelos dois métodos otimizados estão expressos na Tabela V.

TABELA V - Concentração de ácido metil hipúrico (AMH) (g/g de creatinina) em urina de trabalhadores expostos aos solventes, determinada pelos métodos CLAE e CG

Amostra	CLAE	CG
1	0,10	0,20
2	0,02	0,08
3	0,10	0,15
4	0,21	0,33
5	0,10	0,18

Análise estatística dos resultados

Não foi encontrada uma distribuição normal para os valores de AH, determinados tanto por CLAE quanto por CG (Kolmogorov-Smirnov test). Por esta razão, a análise estatística dos dados foi realizada através do Mann Whitney Rank Sum Test.

Este estudo mostrou não existir diferença significativa entre os resultados, quando os níveis de AH são iguais ou maiores do que 1,0 g/g de creatinina ($p > 0,05$). Resultado oposto foi encontrado quando os níveis analisados estavam abaixo de 1,0 g/g, ou seja, foi encontrada diferença significativa entre as concentrações urinárias de AH determinadas por CLAE e CG ($p < 0,05$).

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O método CLAE otimizado no presente trabalho apresentou vantagens quando comparado com o método CG. A maior delas reside no fato de ser mais rápida e simples preparação da amostra, uma vez que o método CG exige extração prévia da urina com solvente orgânico, evaporação sob fluxo de nitrogênio e derivação dos metabólitos. Além disso, o método CLAE apresentou melhor precisão intra e interensaio, curva de calibração com intervalo dinâmico mais extenso e maior sensibilidade (expressa pelos limites de detecção e quantificação menores).

A aplicabilidade dos métodos analíticos otimizados foi testada utilizando-se amostras de urina provenientes de trabalhadores, do sexo masculino, expostos ocupacionalmente ao tolueno e xileno, em uma indústria de tintas látex.

O teste de Kolmogorov-Smirnov mostrou que os valores de AH não apresentavam distribuição normal e por isto foi utilizado, para a análise estatística dos resultados, o teste não paramétrico Mann Whitney Sun Rank. Consi-

derando que o número de amostras do grupo poderia ser pequeno para ter-se uma conclusão definitiva sobre a distribuição não normal dos dados utilizou-se, também, o teste t de Student na análise estatística dos dados. O resultado encontrado foi o mesmo daquele obtido com o teste não-paramétrico, ou seja, não foi encontrada diferença significativa entre os valores de AH (acima de 1,0 g/g de creatinina) quando determinados por CLAE ou CG.

Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados por Carvalho *et al.* (1991).

Alguns fatores poderiam explicar a diferença significativa encontrada entre os níveis de AH inferiores a 1,0 g/g de creatinina, quando determinados por CLAE e CG. Um deles poderia ser a maior perda durante as etapas de extração e derivação na determinação por CG, o que também explicaria o fato dos valores de AH obtidos após análise por CLAE terem sido, quase sempre, mais elevados do que aqueles obtidos por CG. Entretanto, é importante lembrar que estes valores discrepantes estão na faixa de valores basais do ácido hipúrico, o que não invalida o uso de um ou outro método na monitorização da exposição ocupacional aos solventes.

A menor sensibilidade do método CG, na determinação do AMH, resultou na impossibilidade de se quantificar os níveis deste metabólito na maioria das amostras de urina selecionadas para o trabalho, quando se utilizou o método CG. É importante considerar, entretanto, que o AMH não possui valor basal (ACGIH, 1998; Brasil, 1994) e que seu limite de exposição ocupacional (IBMP) é de 1,5 g/g de creatinina (Brasil, 1994) que apresentou-se como valor quantificável por ambos os métodos validados no presente trabalho.

Os dados apresentados neste estudo demonstram maior simplicidade, sensibilidade e precisão do método CLAE, quando comparado com o CG, na determinação simultânea dos ácidos hipúrico e metil-hipúrico urinários.

Importante ressaltar, entretanto, que os dados analíticos obtidos confirmam a viabilidade do uso da cromatografia em fase gasosa, utilizando-se coluna capilar, na determinação simultâneas dos dois compostos em urina.

Em relação ao método CG validado no presente trabalho é importante destacar a sua grande vantagem, em relação a outros citados na literatura, no que se refere a etapa de derivação dos compostos. O uso do hidróxido de trimetilfenil amônio diminuiu significativamente o tempo requerido para a metilação e aumentou a praticidade e segurança desta etapa, quando comparada com o uso do diazometano (Buchet, Lauwerys, 1973; Kira, 1977), metanol (Carvalho, 1991) ou agentes esterificantes (Löf, 1993).

ABSTRACT

Simultaneous determination of urinary hippuric and methylhippuric acids through chromatographic methods: comparison between high performance liquid chromatography and capillary gas chromatography

High performance liquid chromatography and capillary gas chromatography were compared for simultaneous measurement of hippuric and methyl hippuric acids in urine of workers co-exposed to toluene and xylene. Quantitative advantages offered by HPLC over capillary GC method are observed: better average recovery, wider dynamic interval in calibration curve and lower detection and quantification limits mainly when MHA measurement was performed. No significant difference was found between the values of HA higher than 1.0 g/g creatinine measured by the two chromatographic procedures. Regarding to MHA concentration the methods gave similar results and there was no significant difference between the values.

UNITERMS: Hippuric acid. Methyl hippuric acid. High performance liquid chromatography. Capillary gas chromatography. Urine samples.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALESSIO, L. Multiple exposure to solvents in the workplace. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v.69, p.1-4, 1996.
- ALVAREZ-LEITE, E. M., FRANÇA, L. S., MONTEIRO, R. B. *et al.* Gas-liquid chromatography determination of urinary hippuric acid after trimethyl phenylammonium derivation. *Toxicorama*, Paris, v.6, n.3, p.5-8, 1994.
- AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENIST - ACGIH. *Threshold limit values for chemical substances and physical agents and biological exposure indices*. Cincinnati, 1998. 192 p.
- AMORIM, L. C. A., ALVAREZ-LEITE, E. Determination of o-cresol by gas chromatography and comparison with hippuric acid levels in urine sample of individuals exposed to toluene. *J. Toxicol. Environ. Health*, New York, v.50, p.401-407, 1997.
- BRASIL. Ministério do Trabalho. Secretaria de Relações do Trabalho. Portaria no 24 de 29 dez. 1994. *Diário Oficial*, Brasília, 30 dez. Seção 1, p. 21278-21279.
- BUCHET, J. P., LAUWERYS, R. R. Measurement of urinary hippuric and m-methyl-hippuric acids by gas chromatography. *Brit. J. Ind. Med.*, London, v.30, p.125-128, 1973.
- BURINI, C. The simultaneous determination of acid hippuric, o, m, p-methylhippuric acids, mandelic acid and phenylglyoxylic acid in urine by HPLC. *J. Chromatogr.*, Amsterdam v.89, p.404-411, 1998.
- CARVALHO, D., LANCHOTE, V. L., BONATO, P. S. *et al.* A new derivatization procedure for analysis of hippuric acid and m-methyl-hippuric acid by gas chromatography. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v.62, p.33-37, 1991.
- IKEDA, M. Exposure to complex mixtures implications for biological monitoring. *Toxicol. Lett.*, Amsterdam, v. 77, p.85-91, 1995.
- INOUE, O., KAZUNORI, S., TOSHINI, S. *et al.* Simultaneous determination of hippuric acid, o-, m-, and phenylglyoxylic acid, and mandelic acid by HPLC. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, New York, v.47, p.204 - 210, 1991.
- KIRA, S. Measurement by gas chromatography of urinary hippuric acid and methylhippuric acid as indices of toluene and xylene exposure. *Brit. J. Ind. Med.*, London, v.34, p.305-309, 1977.
- LÖF, A., HJELM, E. N., COLMSJO, A. *et al.* Toxicokinetics of toluene and urinary excretion of hippuric acid after human exposure to 2H8 - toluene. *Brit. J. Ind. Med.*, London, v.50, p.55-59, 1993.
- LUNDBERG, I., SOLLENBERG, I. Correlation of xylene exposure and methyl hippuric acid excretion in urine among paint industry workers. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, v.12, p.149-153, 1986.
- OGATA, M., TAGUCHI, T. Simultaneous determination of urinary creatinine and metabolites of toluene, xylene, styrene, ethylbenzene and phenol by automated high performance liquid chromatography. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v.61, p.131-140, 1988.

- OYAMA, T., MITSUDOMI, T., KAWAMOTO, T. *et al.* Detection of CYP1A1 gene polymorphism using designed RFLP and distributions of CYP1A1 genotypes in Japanese. *Int. Arch. Occup Environ. Health*, Berlin, v.67, p.253-256, 1995.
- POGGI, G., GIUSIANNI, M., PLAGI, U. *et al.* High performance liquid chromatography for the qualitative determination of the urinary metabolites of toluene, xylene, and styrene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v.50, p.25-31, 1982.
- SAKAI, T., TAKEUCHI, Y., IKEDA, Y. *et al.* Method for simultaneous determination of six metabolites of toluene, xylene and ethylbenzene, and its application to exposure monitoring of workers in a printing factory with gravure machines. *Jpn. J. Ind. Health, Tokyo*, v.31, p.9-16, 1989.
- TARDIF, R., LAPARÉS, S., PLAA, G. L. *et al.* Effect simultaneous exposure to toluene and xylene on their respective biological exposure indices in humans. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, v.63, p.279-284, 1991.
- TARDIF, R., PLAA, G. L., BRODEUR, J. Influence of various mixtures of inhaled toluene and xylene on the biological monitoring of exposure to these solvents in rats. *J. Physiol. Pharmacol.*, Krakow, v.70, p.385-393, 1992.
- UKAI, H., TAKADA, S., INUI, S. *et al.* Occupational exposure to solvent mixtures: effects on health and metabolism. *Occup. Environ. Med.*, London, v.51, p.523-529, 1994.
- WALLEN, M., HOLM, S., NORDQVIST, M. B. Co-exposure to toluene, and p-xylene in man; uptake and elimination. *Brit. J. Ind. Med.*, London, v.42, p.111-116, 1995.

Recebido para publicação em 12 de junho de 2001.