

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Curso de Pós-graduação em Farmácia

Área de Análises Toxicológicas

**DETERMINAÇÃO POR CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA
DE ALTO DESEMPENHO DE ÁCIDO MANDÉLICO EM URINA
DE TRABALHADORES EXPOSTOS AO ESTIRENO**

GISELE DE FRANÇA OLIVEIRA

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

PROF. DR. HENRIQUE VICENTE DELLA ROSA

São Paulo

1991

12554

Não basta abrir a janela
Para ver os campos e o rio.
Não é bastante não ser cego
Para ver as árvores e as flores.
É preciso também não ter filosofia nenhuma.
Com filosofia não há árvores: há idéias apenas.
Há só cada um de nós, como uma cave.
Há só uma janela fechada, e todo o mundo lá fora;
E um sonho do que se poderia ver se a janela se abrisse,
Que nunca é o que se vê quando se abre a janela.

Poemas Inconjuntos - Alberto Caetano

10/03/2016 - 26/03/19

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente aos Professores Titulares Ester de Camargo Fonseca Moraes e Robert Wasicky, que semearam e cultivaram com muita garra e criatividade a semente da Toxicologia e da Cromatografia em nosso país;

Ao Prof. Dr. Henrique V. Della Rosa pelo desafio necessário à realização desta dissertação e ao pessoal da Toxikón;

À amiga de muito brilho profissional, Alice da Matta Chasin, que me ajudou pra valer;

À Sônia M.H. Salcedo pela inestimável colaboração e ao pessoal da CG Instrumentos Científicos;

Carinhosamente, ao Dr. Abílio J. Adelino, Teixeira, Malú e Zé Carlos pela sensacional ajuda durante as visitas à indústria. Aos operadores, PT saudações;

Ao Prof. Dr. Sergio Colacioppo e à Profa Dra Maria Elisa P.B. de Siqueira, que muito contribuíram para a minha formação acadêmica;

Ao Prof. Dr. Carlos A.C. Sanassaro e às farmacêuticas-bioquímicas Marilice Friedrich, Marta R. Juncioni, Míriam F. Casado e à Regina L. Gonçalves pela colaboração amiga durante as determinações realizadas no laboratório de Bioquímica Clínica do Hospital Universitário;

À Francesca Theobaldo pelas infundáveis sessões tira-dúvidas sobre o h.p.l.c.;

À Maria de Fátima M. Pedroso, Ana Cristina G.C. Malheiro, Lousã Lopes, Carlos A. Tagliati e ao Renato Lieber pelos momentos de discussão e reflexão indispensáveis;

À Profa. Dra. Yara A.C. Cretella que possibilitou o empréstimo dos programas aplicativos e ao pessoal do CCE-USP;

Ao coordenador do curso Prof. Livre-Docente Antonio Flávio Mídio e aos queridos professores da Toxicologia pelos valiosos ensinamentos;

Às *meninas da Toxicologia*, Luísa, Helena, Dalva, Rosely, Joyce, Yumiko, Lusia, Dona Lourdes, Mônica, Sílvia e Ana Cristina;

Ao Prof. Dr. Roberto Tokoro pelos incríveis artigos da *Talanta* e por aquela portaria em Qualitativa, que me fez gostar de Química Analítica;

Ao super Prof. Mário José Politi que já me tirou de 2 sufocos: exercícios de Cálculo e este *abstract*;

Às bibliotecárias do meu coração Moema Rodrigues dos Santos, Ana Assami e Maria Inês dos Santos, e à Yumiko Ota, essas fadas-madrinhas que tornaram tudo possível;

À Kátia S.A.M. Nascimento e seu divã compreensivo, e ao Paulinho Pires;

Ao CNPq pela bolsa de estudo concedida, sem a qual...

Muito obrigada.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus amigos que tornaram suportável esse verdadeiro exercício de sobrevivência, que é o *fazer a tese*: Beth e Stan (*pis bellos*), Marcinha e Acauã, Julião e Kátia e ao Álvaro, Solange e Mário, pelas inúmeras viagens;

Ao Éder, meu companheiro, que me mostrou que *tudo vale a pena se a alma não for pequena*;

E à minha mãezinha Lú, paiê Euro, heavy brother Eurinho, Vó Cristina, Benhê e tia Deisinha, que me ensinaram a ser uma pessoa simples e feliz.

Um beijo bem vermelho.

RESUMO

O estireno é uma importante matéria-prima extensamente empregada na fabricação de plásticos e elastômeros. Durante a sua utilização, a emissão dos vapores para o ambiente de trabalho pode ser significativa. Considerada uma substância química reconhecidamente tóxica, a monitorização biológica da exposição ocupacional constitui-se um procedimento indispensável para uma avaliação do risco, através da quantificação do ácido mandélico urinário, seu principal produto de biotransformação, e posterior comparação a valores de referência. Foi padronizado o método analítico de Poggi et al que se utiliza da cromatografia em fase líquida de alto desempenho (*HPLC*), obtendo-se resultados de boa precisão (coeficientes de variação intra-ensaio e interensaio menores que 2%) e recuperação média de $98 \pm 5\%$. Foi determinada a concentração deste ácido presente em amostras de urina de indivíduos ocupacionalmente expostos (Grupo Exposto) e não expostos (Grupo Controle) de uma indústria de produção do monômero de estireno. No Grupo Exposto foi realizada uma estimativa da exposição com o uso de amostradores por difusão passiva, e foram encontradas concentrações inferiores a $1,2 \text{ mg/m}^3$ ($0,3 \text{ ppm}$) de estireno. A concentração média de ácido mandélico encontrada no Grupo Exposto foi de $0,0239 \pm 0,0037 \text{ g/L}$ ($0,0136 \pm 0,0019 \text{ g/g}$ de creatinina); e a encontrada no Grupo Controle, de $0,0133 \pm 0,0024 \text{ g/L}$ ($0,0073 \pm 0,0011 \text{ g/g}$ de creatinina).

ABSTRACT

Styrene is an important raw material often employed in the manufacture of plastic and elastomers. During its manipulation, styrene vapours emission to the work environment can be significant. Being a well established toxic chemical compound, biological monitoring of the occupational exposure is an indispensable strategy for risk assessment. This can be done by the quantification of the urinary mandelic acid - styrene main metabolite - and comparison with reference values. Poggi's et al analytic method, which makes use of the high performance liquid chromatography (*HPLC*) was standardized resulting in good precise data (variation coefficients intra and inter-assays lower than 2%) and average recovery of $98 \pm 5\%$. Urine concentration of this acid was determined in exposed (Exposed Group) and non-exposed (Control Group) workers from a styrene monomer production plant. In the Exposed Group an exposure estimative by the use of passive diffusive samplers was performed and styrene concentrations below $1,2 \text{ mg/m}^3$ ($0,3 \text{ ppm}$) were found. The average mandelic acid concentration of the Exposed Group was determined as $0,0239 \pm 0,0037 \text{ g/L}$ ($0,0136 \pm 0,0019 \text{ g/g}$ of creatinine) whereas $0,0133 \pm 0,0024 \text{ g/L}$ ($0,0073 \pm 0,0011 \text{ g/g}$ of creatinine) was found in the Control Group.

CONTEÚDO

1.	INTRODUÇÃO	1
2.	GENERALIDADES	5
2.1.	Aspecto toxicológico	5
2.1.1.	Propriedades físico-químicas, usos e fontes de exposição	5
2.1.2.	Toxicocinética	11
2.1.3.	Toxicodinâmica	25
2.1.4.	Alterações biológicas produzidas pela exposição ao estireno	28
2.2.	Aspecto analítico	34
3.	OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO	38
4.	MATERIAL E MÉTODO	39
4.1.	Local de trabalho e população estudada	39
4.2.	Padronização das técnicas de extração e quantificação do ácido mandélico em urina	42
4.2.1.	Material	42
4.2.1.1.	Reagentes e solventes	42
4.2.1.2.	Soluções-padrão	42
4.2.1.3.	Aparelhos e acessórios	43
4.2.1.4.	Amostras de urina para a padronização do método analítico	44
4.2.2.	Método	45
4.2.2.1.	Otimização do sistema cromatográfico para a separação do ácido mandélico e do padrão interno	45
4.2.2.2.	Preparo da curva de calibração do ácido mandélico	45

BIBLIOTECA
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas
 Universidade de São Paulo

4.2.2.3. Procedimento analítico para a determinação do ácido mandélico urinário por cromatografia em fase líquida de alto desempenho	46
--	----

5. RESULTADOS	48
5.1. Padronização das técnicas de extração e quantificação do ácido mandélico em urina	48
5.1.1. Curva de calibração do ácido mandélico	48
5.1.2. Estudo da recuperação	53
5.1.3. Estudo da precisão	54
5.2. Aplicação do método analítico para a determinação do ácido mandélico em urina de trabalhadores de uma indústria de produção do monômero de estireno	55
5.2.1. Determinação da densidade e creatinina urinárias	55
5.2.2. Determinação do ácido mandélico em urina	58
5.2.3. Determinação do estireno em amostrador por difusão passiva	61
6. DISCUSSÃO	62
7. CONCLUSÕES	76
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78

1. INTRODUÇÃO

O estireno foi isolado pela primeira vez por Bonastre em 1831, após a destilação de resina balsâmica de árvores da família das estiracáceas, mas só começou a ser produzido comercialmente a partir de 1925, pela *Farbenindustrie* alemã, e em 1930, pela *Dow Chemical* norte-americana. Foi muito utilizado, durante a Segunda Guerra Mundial, como matéria prima na produção da borracha sintética de butadieno-estireno ^{107 153 164 221}.

Atualmente, o estireno é amplamente usado na fabricação de polímeros orgânicos sintéticos, os plásticos e os elastômeros. Os plásticos são compostos por resinas termoplásticas e pela resina termorrígida de ftalato-maleato de etileno estirenizada ou poliéster insaturado (Tab. I). O elastômero de SBR (Tab. I) tem a maior produção industrial entre as borrachas sintéticas em nosso país ^{2 11 152} :

TABELA I - Plásticos e elastômeros compostos por estireno ² .

Sigla	Polímeros
<u>RESINAS TERMOPLÁSTICAS</u>	
PS	poliestireno
ABS	poli(acrilonitrila-butadieno-estireno)
SAN	poli(estireno-acrilonitrila)
ASA	poli(acrilonitrila-estireno-acrilato de metila)
MBS	poli(metacrilato de metila-butadieno-estireno)
<u>ELASTÔMEROS</u>	
SBR	poli(butadieno-estireno)
<u>RESINA TERMORRÍGIDA</u>	
UP	poliéster insaturado

O consumo de estireno para as diversas finalidades, de acordo com a produção nacional, é mostrado na Fig. 1 ¹¹.

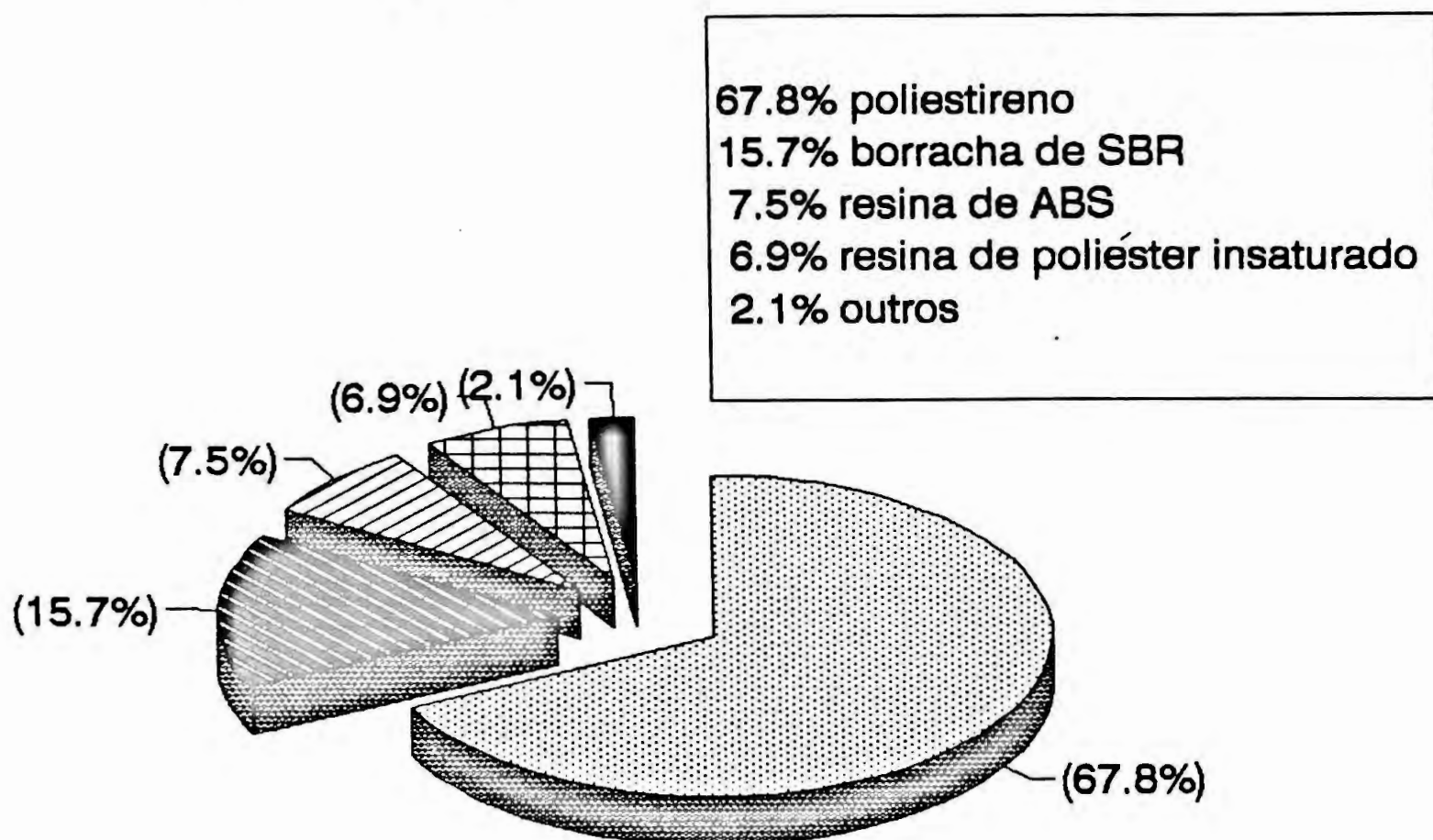


FIGURA 1 - Consumo da produção nacional do monômero de estireno ¹¹.

A produção mundial do monômero de estireno para o ano de 1990 foi estimada em 14 milhões de toneladas, conforme projeções econômicas realizadas pelo *Chemical Market Review* ²⁵⁸. Segundo a Associação Brasileira da Indústria Química e de Derivados (ABIQUIM), a produção nacional foi de 290 mil toneladas em 1988, entre as empresas mostradas na Tab. II ¹¹.

O *National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH)* estima que nos Estados Unidos, em 1982, pelo menos 30 mil trabalhadores estavam potencialmente expostos ao monômero durante a jornada de trabalho, e que outros 300 mil estavam envolvidos em operações com compostos que contêm o estireno ¹⁶⁴. Não foi encontrado qualquer levantamento estatístico que fornecesse uma estimativa do número de trabalhadores expostos a esse agente químico em nosso país.

TABELA II - Produção nacional do monômero de estireno ¹¹.

Empresas produtoras	Localização	Capacidade instalada (em t)	
		1988	Futura
CBE	SP	80.000	110.000 (2 ^o sem/89)
EDN	BA	150.000	150.000
PETROFLEX	RJ	60.000	60.000
PROQUIGEL	RS	0	125.000
TOTAL		290.000	445.000

CBE = Companhia Brasileira de Estireno

EDN = Estireno do Nordeste

Pelas projeções econômicas de crescimento da produção, podemos inferir que um maior número de trabalhadores estará potencialmente exposto ao estireno, exigindo-se medidas de ordem administrativa e técnico-científica para o controle da exposição.

Muitas hipóteses têm sido levantadas sobre a associação causal entre a exposição ocupacional e o efeito nocivo nos sistemas biológicos. Especulou-se que o estireno seja capaz de reduzir a concentração de dopamina de neurônios intra-hipotalâmicos, ocasionando transtornos ao sistema nervoso central ^{107 109 136 137 196 208 209 218} e neuroendócrino ^{8 162}. Intermediários reativos, possivelmente óxidos de areno, são formados durante a biotransformação desse toxicante, podendo levar à injúria do tecido hepático ^{14 54 63 89 111 117 143 146 234}. Suspeita-se que o estireno exerça uma ação danosa sobre os cromossomas ^{56 84 155 219} e possa estar associado ao desenvolvimento de câncer ^{50 115 153 172}.

Frente a tais evidências, faz-se necessária a aplicação de procedimentos para a prevenção de moléstias profissionais relacionadas ao estireno. Entre esses procedimentos, destacam-se a monitorização ambiental e a biológica ^{13 22 28 29 31 66 94 126 147 190 193 194 259}. Esta última foi definida como *uma avaliação sistemática e periódica do toxicante*

ou de seus produtos de biotransformação, em material biológico, para estimar a exposição e o risco à saúde do trabalhador, por comparação dos resultados com um valor de referência apropriado ²⁶⁰.

Entre as condições necessárias para a realização de uma monitorização biológica, destacam-se: a existência de um indicador biológico de exposição, métodos analíticos simples, sensíveis e específicos; facilidade de se obter e analisar prontamente a amostra biológica e conhecimento das relações dose/efeito e dose/resposta.

Sendo assim foi realizada a padronização de método de análise do ácido mandélico urinário, para a monitorização biológica da exposição ocupacional ao estireno, visando uma contribuição aos profissionais envolvidos com programas de Saúde do Trabalhador.

2. GENERALIDADES

2.1. Aspecto toxicológico

2.1.1. Propriedades físico-químicas, usos e fontes de exposição

O estireno, derivado vinílico do benzeno, encontra-se no estado líquido à temperatura e pressão ambientes. É viscoso, incolor, inflamável e de limite de odor abaixo de 1 ppm. Tem por sinonímia os termos monômero de estireno, etenil benzeno [CAS 100-42-5] * , feniletileno, fenileteno, fenetileno, vinil benzeno, vinil benzol, estírol, estíroleno, estíropor, cinameno e cinamol 68 148 164 258.

A existência da dupla ligação vinílica na cadeia lateral confere ao estireno grande reatividade, sendo passível de reações de hidrólise, oxidação e halogenação 68.

Esse agente químico polimeriza-se espontaneamente à temperatura ambiente, especialmente na presença de oxigênio e de luz ou em contato com peróxidos, ácidos fortes e cloreto de alumínio. Por este motivo, deve ser armazenado e transportado após a adição de um inibidor desse processo (t-butil catecol ou hidroquinona), pois a reação é exotérmica e o risco de explosão é iminente. Abaixo estão relacionadas algumas das suas propriedades físico-químicas 68 148 156 164 258 :

- fórmula molecular: C_8H_8 ;
- peso molecular: 104,16 ;
- ponto de ebulição: 145,2°C a 760 mm Hg ;

* *Chemical Abstracts Service Registry*

- ponto de congelamento: $-30,6^{\circ}\text{C}$;
- densidade específica: $0,90\text{ g/m}^3$ a 25°C (água = 1,0) ;
- densidade do vapor no ponto de ebulição: $3,6\text{ g/m}^3$ (ar = 1,0) ;
- pressão de vapor: $4,50\text{ mm Hg}$ a 20°C e
 $8,31\text{ mm Hg}$ a 30°C ;
- concentração no ar saturado pelos vapores: 8500 ppm ;
- fatores de conversão (25°C e 760 mm Hg): $1\text{ ppm} = 4,26\text{ mg/m}^3$ e
 $1\text{ mg/m}^3 = 0,235\text{ ppm}$;
- ponto de fulgor: $34,4^{\circ}\text{C}$ (tubo fechado) e
 $36,7^{\circ}\text{C}$ (tubo aberto) ;
- ponto de ignição: 490°C ;
- limites de inflamabilidade: $1,1$ a $6,1\%$ (a 20°C).

O estireno é praticamente insolúvel em água e muito solúvel em éter de petróleo, benzeno, éter etílico, metanol, tolueno, etanol, acetona, n-heptano, tetracloreto de carbono e dissulfeto de carbono ^{68 148 164 258}.

O poliestireno é utilizado para a obtenção de laminados e filmes ou soprado para formar recipientes através de moldagem por injeção ou extrusão ¹⁵². Com esta finalidade foi desenvolvido um tipo de poliestireno de alto peso molecular resistente ao calor e ao impacto, para a fabricação de jarras, copos, garrafas para bebidas, cabides, placas de petri, caixas transparentes, transformadores de frequência, brinquedos e embalagens para gêneros alimentícios. É vendido comercialmente com o nome de Lustrex[®], Styron[®] e Styropon[®] ^{11 152}.

A resina de SAN é extensamente utilizada na fabricação dos tipos da máquina de escrever, utensílios de cozinha e pincéis. A resina de ABS, na fabricação de engrenagens, tanques para ácido, pára-choques de automóveis

que podem ser recobertos por galvanoplastia, capacetes de proteção, injetores de fertilizantes, caixas de rádio e de máquinas fotográficas e portas de geladeira ^{11 152}.

A resina de poliéster insaturado é utilizada em solução no monômero de estireno ^{*}, na fabricação de telhas de grandes dimensões, tanques, piscinas, bandejas, cadeiras, artigos esportivos, cascos de barco e carrocerias de carro esporte ^{152 164}. É vendida comercialmente com os nomes de Paraflex[®]; Polylite[®] e GR-P[®] ¹⁵².

Em escala industrial, o estireno pode ser obtido através de desidrogenação catalítica do etilbenzeno ou pela oxidação deste a hidroperóxido, seguida de reação com propileno e desidratação do α -metil-fenil carbinol formado a estireno. O primeiro processo parece ser o mais utilizado e são encontradas desde concentrações inferiores a 1 ppm até 20 ppm de estireno no ar geral do ambiente de trabalho (concentração média ponderada no tempo). São encontrados também benzeno e tolueno como produtos intermediários obtidos com o primeiro processo, em concentrações até 1 ppm ^{164 165 173 219 221}.

Nos países industrializados, os processos de purificação do monômero e de polimerização são semi-automatizados em sistemas fechados. Entretanto, a emissão dos vapores desse agente químico pode ocorrer durante:

- adição dos reagentes aos reatores;
- colheita de amostras para o controle de qualidade do produto;
- limpeza e manutenção do equipamento;

* conteúdo na resina é de 40 % m/m

– degradação térmica do polímero de poliestireno 134 146 182 255 256 258.

Para que se tenha uma visão das condições de exposição na produção de copolímeros, é importante citar o trabalho de Samini & Falbo ¹⁹⁹ que analisaram 106 amostras de ar colhidas com tubos de carvão ativado, contendo os monômeros de acrilato de etila, metacrilato de metila, acrilato de n-butila, estireno, α -metil estireno e acrilato de 2-etil-hexila. Encontraram as concentrações de 89; 66; 49; 120; 41 e 1 ppb, respectivamente, na zona respiratória dos trabalhadores (média ponderada no tempo). Em amostras do ar geral do ambiente de trabalho, foram encontradas respectivamente as concentrações de 1 ppm; 169; 36; 54; 10 e 30 ppb para os monômeros mencionados acima (média ponderada no tempo).

Durante a síntese da borracha sintética de butadieno e estireno, várias substâncias químicas são usadas, como vinil piridina, etilbenzeno, hexano, metil etil cetona, amônia, tiocarbamatos, mercaptanas e β -fenil naftilamina ^{44 153 154 173}. No Brasil é vendida com o nome comercial de SBR[®], GR-S[®], BUNA-S[®], Cariflex[®], Petroflex[®] e Polysar S[®] ¹⁵². As condições de exposição foram verificadas por Checkoway & Williams ⁴⁴, que coletaram 157 amostras de ar com tubos de carvão ativado e amostradores por difusão passiva na indústria de borracha sintética. E obtiveram as concentrações de butadieno, estireno, benzeno (impureza do estireno e tolueno) e tolueno (limpeza periódica dos tanques ou como impureza do estireno) de até 20; 14; 0,10 e 0,90 ppm, respectivamente, na zona respiratória dos trabalhadores da área de descarregamento de matérias-primas e transferência dos monômeros para o reator de síntese.

A resina de poliéster insaturado é misturada às fibras de vidro,

impregnando-as para formar o chamado plástico reforçado (*fiberglass-reinforced plastic*), muito utilizado na fabricação de barcos quando ocorrem situações de exposição ocupacional a concentrações elevadas. Durante os processos de laminação do casco, convés e cobertura com a resina no estado de gel, são obtidas concentrações do vapor de estireno no ar geral do ambiente de trabalho de 10 a 174 ppm (média ponderada em 8 horas de exposição) ^{17 51 107 120 132 172 208 222} e de 20 a até 300 ppm na zona respiratória (pico de concentração) ^{109 121 222}. Além do estireno, são usados acetona como solvente de limpeza e peróxido de metil-etil cetona como acelerador de polimerização ^{120 172}. Malek et al ¹⁵⁰ observaram que também são gerados aerossóis que representam 30% da concentração total do estireno no ar.

Para minimizar a exposição ocupacional a esse agente químico podem ser aplicadas medidas preventivas, tais como o uso de resinas de baixa emissão de estireno (*LSE*), geralmente um sistema de ventilação geral diluidora ou local exaustora ^{120 124 208 220}.

Há também fontes de exposição não ocupacional e as indústrias petroquímicas são um exemplo disso, onde a emissão dos vapores de estireno provêm das colunas de destilação fracionada, perdas dos tanques de armazenamento ou vazamentos, entre outras causas. Esse agente químico já foi detectado entre os gases expelidos por motores convencionais (0,76 % dos hidrocarbonetos totais) e na fumaça do cigarro (18 a 48 $\mu\text{g}/\text{cigarro}$) ^{15 205}. Todavia, o hábito de fumar parece não ter influência sobre as concentrações de estireno presentes no ar alveolar ou no sangue ³⁴.

A migração do monômero de estireno para os alimentos, a partir de embalagens de poliestireno e da resina ABS, é motivo de preocupação entre

os bromatologistas. Em amostras de creme de leite fermentado, acondicionadas em recipientes rígidos de poliestireno, foi encontrado o valor de 245 ppb de estireno, porém sua presença não foi verificada nas de leite armazenadas por até 8 dias ⁸⁰ ²⁵². A menor concentração residual do monômero em recipiente de isopor foi de 87 ppm ²⁵⁰. Com o uso de água, chá e café, Varner et al ²²⁹ ²³⁰ conseguiram extrair 0,0077; 0,0078 e 0,0078 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, respectivamente, do estireno residual de copos descartáveis de plástico. O mesmo experimento foi repetido com etanol a 8% como substituto de bebidas alcoólicas e foram extraídos 0,21 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ do monômero. De uma maneira geral, a concentração do xenobiótico nos alimentos é da ordem de 3 a 4 vezes menor do que na embalagem ²⁵⁸.

2.1.2. Toxicocinética

Durante a fase toxicocinética, a fração de estireno presente no organismo é modulada pelos processos que envolvem a absorção, distribuição, biotransformação, acumulação e excreção 10 125 211 .

A exemplo do que ocorre com outros toxicantes, os fenômenos biológicos relacionados a esses processos são descritos, para o estireno, matematicamente através da teoria compartimental. Esta teoria divide organismo humano em unidades representativas de grupos de tecidos homogêneos quanto à função, solubilidade dos vapores e perfusão sanguínea, possuindo características comuns em relação à biodisponibilidade do xenobiótico 9 58 59 125 178 180 201 257 .

A maioria dos modelos fisiológico-matemáticos para a simulação desses processos toxicocinéticos, durante exposições repetidas, considera a divisão do organismo humano em 5 compartimentos teciduais: (i) tecido pulmonar; (ii) tecidos muito vascularizados, incluindo órgãos como o coração, cérebro e rins; (iii) tecidos pouco perfundidos, incluindo os músculos e pele; (iv) tecidos fracamente perfundidos como o tecido adiposo e (v) tecido hepático. São feitas algumas suposições para a validação do modelo fisiológico em relação à ventilação pulmonar, difusão alveolar, biotransformação e depuração (*clearance*) 5 59 83 178 180 .

Nas situações de exposição ocupacional, a introdução do estireno na corrente sanguínea se dá, preferencialmente, pela via respiratória, uma vez que a emissão de seus vapores é favorecida pelos processos industriais relacionados à sua utilização 9 104 164 180 258 .

Em estudos experimentais realizados com voluntários submetidos a exposição controlada em câmaras especiais e com trabalhadores expostos, a absorção dos vapores desse toxicante é medida através da relação entre as concentrações estimadas na zona respiratória e ar exalado, considerando-se a duração e frequência da exposição, o volume da ventilação alveolar e o esforço físico exercido durante a exposição (*workload*) 7 18 33 58 59 60 78 107 145 218 240 242.

A retenção alveolar de 60 a 90% dos vapores do xenobiótico relatada por vários autores é calculada pela expressão $[1 - C_a / C_i] \times 100$ (onde C_a = concentração alveolar e C_i = concentração na zona respiratória). A concentração alveolar do estireno é estimada em 10 a 16% da presente na zona respiratória 7 18 32 33 78 107 142 240.

A difusão dos vapores do estireno dos alvéolos para o sangue é rápida e ocorre de acordo com a pressão parcial exercida (Lei de Henry) e com a lipossolubilidade, caracterizada pelos elevados valores dos coeficientes de partição sangue-ar alveolar e tecido-sangue 93 125 145 200 201. A Fig. 2 mostra uma representação esquemática dos processos envolvidos na transferência do estireno pelo organismo humano 201.

A absorção percutânea dos vapores de estireno, estimada em 2 a 5% dos vapores absorvidos pela via pulmonar em situações de exposição semelhantes, é considerada desprezível 192 239.

Dutkiewicz & Tyras (1968) 62 evidenciaram experimentalmente com voluntários que o contato dérmico com o estireno, na forma líquida durante 10 minutos, corresponderia à uma exposição a 425 mg/m^3 (100 ppm) por 8 horas, resultando em uma taxa de absorção percutânea de 9 a $15 \text{ mg/cm}^2 \cdot \text{h}$.

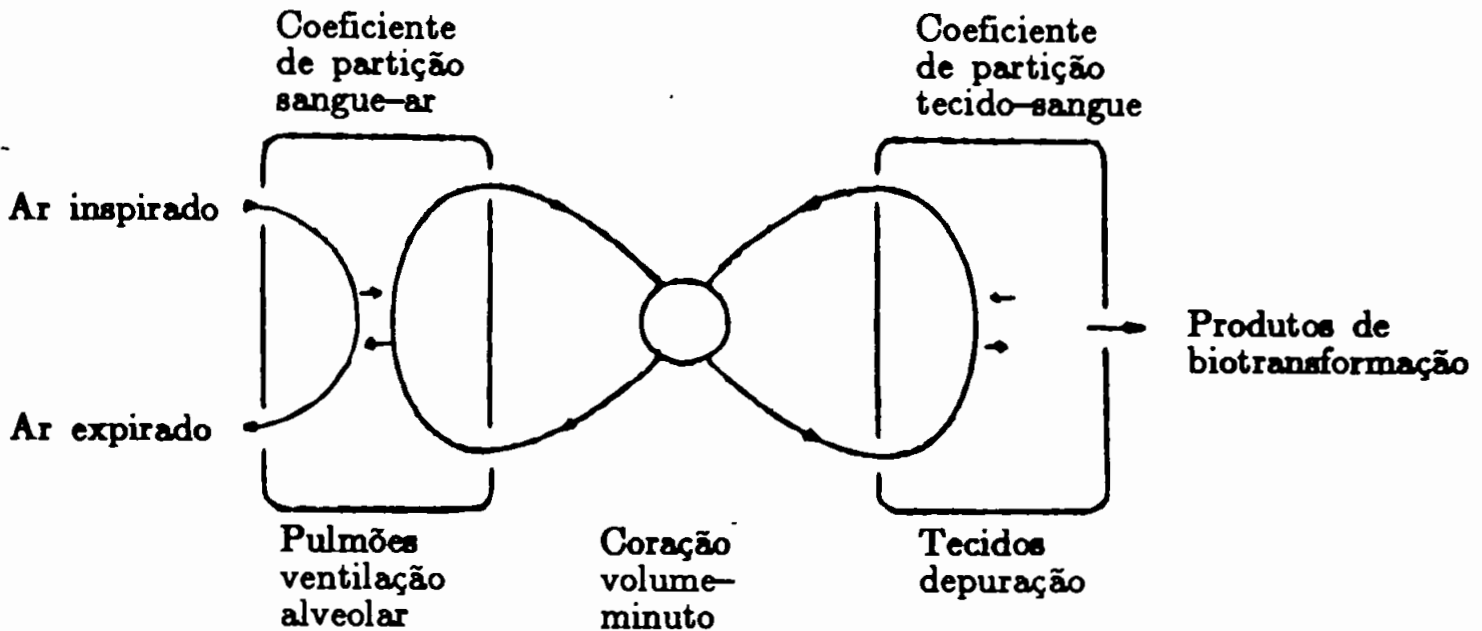


FIGURA 2 - Representação esquemática da transferência do estireno pelo organismo humano ²⁰¹.

Entretanto, Berode et al (1985) ²³ consideraram essa taxa como sendo apenas de desaparecimento do líquido da superfície da pele. Estes pesquisadores verificaram que após o contato dérmico durante 30 minutos, a velocidade de absorção era de $60 \mu\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$, equivalente a apenas 4% da concentração absorvida pela inalação dos vapores durante exposição experimental a $215 \text{ mg}/\text{m}^3$ (50 ppm) por 8 horas.

Essa baixa absorção foi corroborada por Brooks et al (1980) ³⁰ que não observaram diferença significativa entre a concentração de estireno e dos seus produtos de biotransformação em fluidos biológicos de trabalhadores expostos, que utilizavam luvas impermeáveis de álcool polivinílico, quando comparada à obtida dos trabalhadores sem o uso das referidas luvas.

Foi observado em vários trabalhos que após os primeiros 75 minutos de exposição, a concentração de estireno presente no sangue arterial mantém-se praticamente constante, aproximando-se de um estado de equilíbrio com a

concentração nos tecidos (*steady-state*). A curva de decaimento biexponencial, expressa pelo logaritmo da concentração no sangue em função do tempo (Fig. 3), sugere uma distribuição em um sistema linear aberto de 2 compartimentos e eliminação pela cinética de 1ª ordem 142 175 187 188 189 242 257 258 .

A meia-vida biológica ($t_{1/2}$) de 2 minutos da fase de distribuição α ; a meia-vida de 41 minutos da fase de eliminação β ; o volume de distribuição de 99 litros (1,4 L/kg) e a taxa de depuração de 1,7 L/min foram calculadas a partir da curva de eliminação pelo método dos mínimos quadrados 59 78 142 242 .

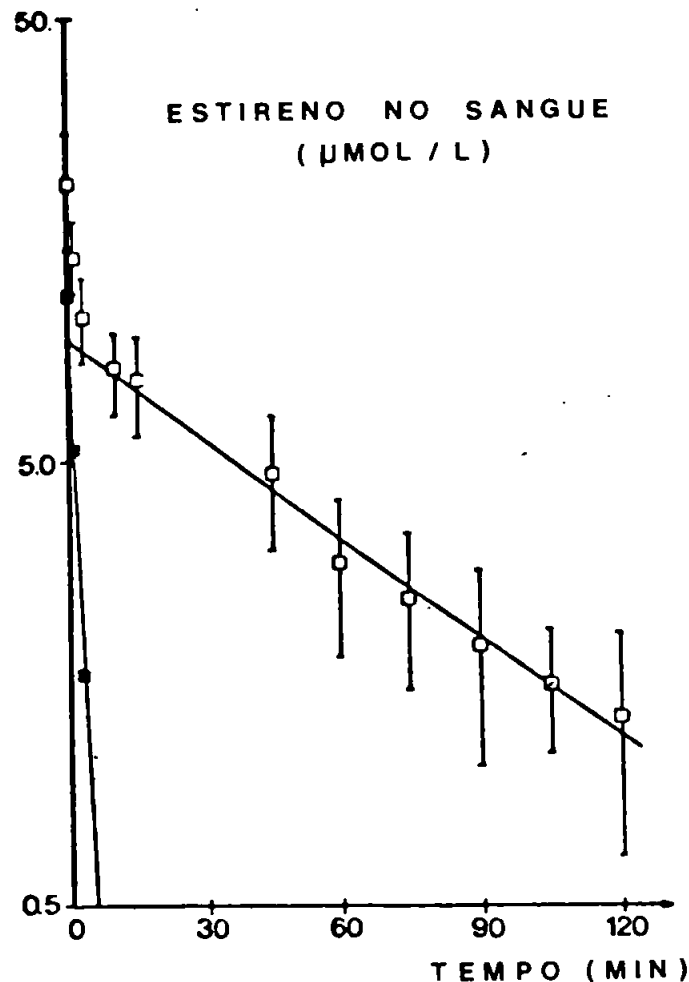


FIGURA 3 - Curva semilogarítmica da concentração de estireno no sangue arterial pelo tempo. (\square) parte linear da curva - fase final; e (\blacksquare) parte linearizada da curva - fase inicial 242 .

A biotransformação do estireno tem sido extensamente estudada e acredita-se que ocorra no fígado, embora também haja evidência experimental de sua ocorrência em tecidos extra-hepáticos, tais como o renal e o pulmonar 39 133 140 142 197 198 242 .

A formação do óxido de 7,8 estireno (feniloxirana) ² tem sido sugerida como sendo a principal via de biotransformação, uma reação preferencialmente catalizada pelo sistema de monoxigenases dependentes do citocromo P-450. Esse epóxido é hidratado a estireno glicol (1-fenil-1,2-etanodiol) pela epóxido hidrolase [EC 3.3.2.3.] * e finalmente convertido a ácido mandélico e ácido fenilgloxílico, principais produtos de biotransformação quantitativamente presentes na urina (Fig. 4) 17 18 41 98 104 107 139 142 145 174 242 251 .

Embora tenha sido observada a ocorrência, em roedores, da reação de descarboxilação do ácido mandélico a álcool benzílico, precursor do ácido hipúrico, acredita-se que apenas em situações de exposição acima de 640 mg/m³ (150 ppm) de estireno haveria a estimulação desta etapa de biotransformação, no homem, e nesse caso a contribuição do ácido hipúrico presente na urina seria de 0 a 5% da quantidade absorvida do toxicante 70 79 98 104 218 .

Estudos realizados com roedores demonstram que o estireno glicol tanto pode ser conjugado com o ácido β -glicurônico ¹⁷⁵ como oxidado a ácido mandélico, fenilgloxílico ou benzóico 139 140 . Outras vias de biotransformação seriam a conjugação do óxido de estireno com a glutatona, excretados como ácidos mercaptúricos ^{197 217} e a hidroxilação do estireno, resultando em feniletanóis 139 140 .

* *Enzyme Classification (International Union of Biochemistry).*

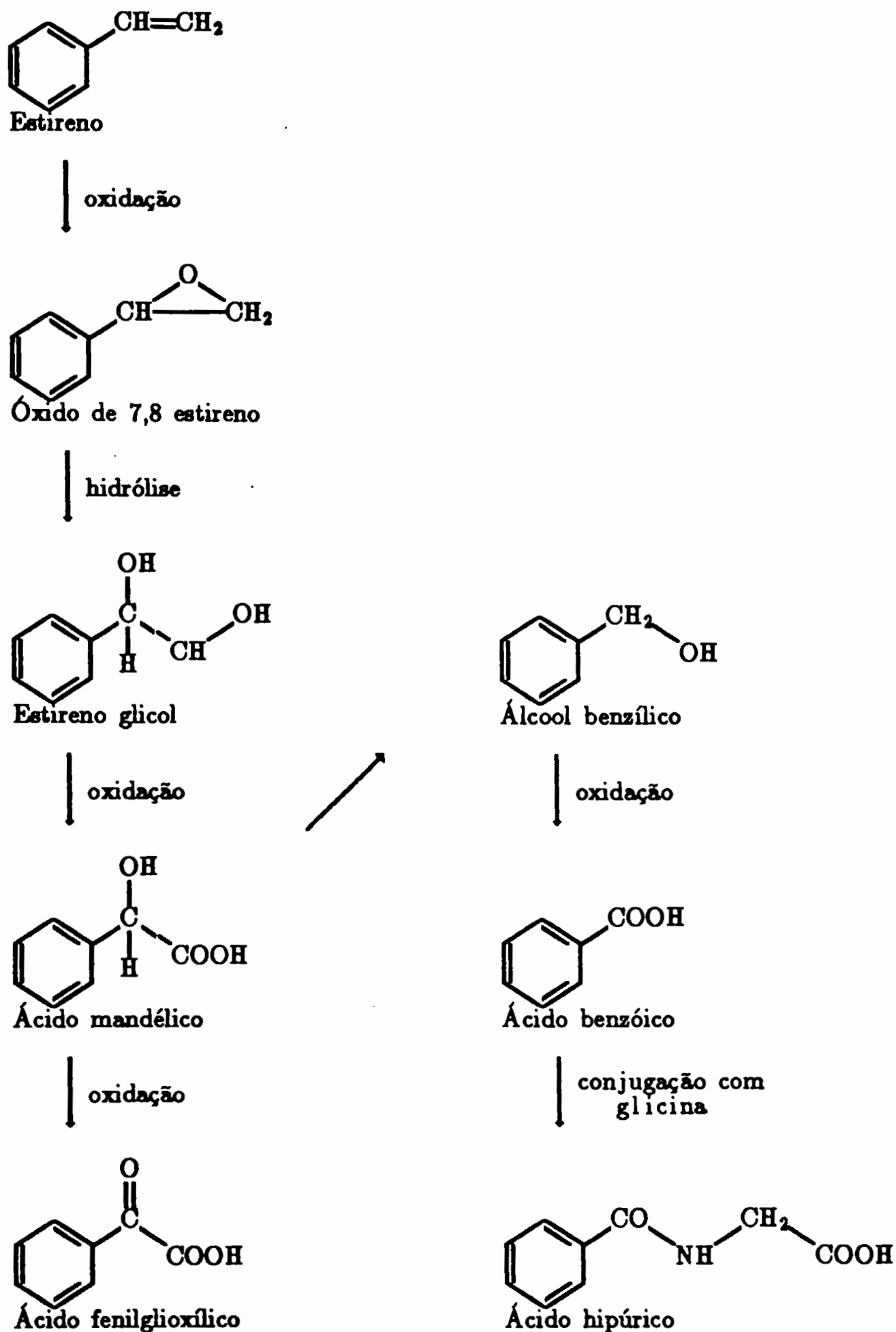


FIGURA 4 - Representação esquemática da principal via de biotransformação do estireno no homem.¹⁰⁴

Foi relatado por diversos autores que aproximadamente 90% da quantidade de estireno absorvida é biotransformada, mais da metade é excretada como ácido mandélico (57%), um terço como ácido fenilglioxílico (33%) e há consenso que estes ácidos sejam excretados na forma livre ^{41 101}
104 127 181 188 .

O ácido mandélico é também o principal produto de biotransformação do etilbenzeno, solvente orgânico usado na fabricação do monômero de estireno ^{72 76 96} .

Sedivec et al ²⁰⁷ observaram que após as principais refeições, ocorria um aumento na quantidade do ácido fenilglioxílico presente na urina.

Existem fatores que interferem na biotransformação do estireno, como a ingestão de etanol, que inibe a oxidação do estireno glicol. Especulou-se sobre tal influência e concluiu-se que a concentração de estireno glicol no sangue venoso estava 15 vezes mais elevada que a do ácido mandélico, em relação às concentrações anteriores à ingestão. A concentração de ácido mandélico no sangue venoso correspondeu a apenas 56% do valor anterior à mesma. A cinética de eliminação do ácido mandélico é mais influenciada pelo etanol que a do ácido fenilglioxílico ^{24 248 249} .

Segundo Lof et al ¹⁴², a exposição a longo prazo aos vapores de estireno, na indústria de plásticos reforçados, poderia facilitar a biotransformação e excreção do xenobiótico, tornando-as mais rápidas. Porém, esta suposição tem sido alvo de poucos estudos sistemáticos, bem como a de possíveis interações com outros solventes orgânicos ^{119 243} .

Não relacionado à exposição ocupacional, o ácido mandélico pode estar

presente em fluidos biológicos pela sua utilização e de seus sais no tratamento de infecções da via urinária (Mandelium[®]; Mandryl[®]) ou na forma de benzilésteres do ácido mandélico, na composição de medicamentos analgésicos e antiespasmódicos (Spasmolyt[®] e Melabon[®]). Há ainda medicamentos em que o ácido mandélico é um produto de biotransformação, tais como o psicofármaco pemolina (Tradon[®]) e o relaxante muscular feniramidona (Cabral[®])²⁰³. Estas informações são relevantes para a interpretação dos resultados da monitorização biológica.

Acredita-se que a concentração de estireno presente no tecido adiposo represente de 10 a 15% da quantidade total absorvida. Em função da longa meia-vida de eliminação no tecido adiposo subcutâneo, de 2 a 5 dias, seriam necessários de 7 a 10 dias para a completa remoção do toxicante deste compartimento, após uma única exposição^{69 70 71 142 242 253 254}.

A quantidade total do xenobiótico no organismo (*body-burden*) alcança um estado de equilíbrio entre os tecidos em 2 dias, não se observando, após este tempo, aumento na carga corpórea⁷⁴.

O período de eliminação do estireno não biotransformado caracteriza-se por um declínio acentuado da concentração presente no ar alveolar. Foi relatado que $2,6 \pm 0,9\%$ da quantidade absorvida é excretada pela via respiratória e há evidência experimental que no intervalo de exposição estudado, isto é, de 301 a 886 mg/m³ (70 a 206 ppm) durante 4 ou 8 horas, esse valor não parece ser influenciado pela concentração ou duração da exposição^{71 78 101 104 107 181 188}.

Não foram encontrados trabalhos que abordassem considerações sobre a variação rítmica (circadiana) da excreção dos ácidos mandélico e

fenilglioxílico, embora eventos cronobiológicos relacionados à função renal tenham sido objeto de recente revisão ³⁸.

Na literatura especializada, são citados vários relatos sobre a cinética de eliminação de 1ª ordem dos ácidos mandélico e fenilglioxílico, em situações de exposição controlada ou em campo, descrita matematicamente através das curvas de decaimento monoexponencial ^{17 18 41 65 79} ou biexponencial ^{74 101 104 180 207 241 242} (Tab. III) . Há evidência experimental, porém, que o modelo bicompartimental seja o mais adequado, devido ao armazenamento do estireno no tecido adiposo ^{42 70 71 187 202} .

Esses produtos de biotransformação podem ser encontrados na urina dentro de 1 hora após o início da exposição, supondo-se, portanto, que os processos de eliminação sejam muito rápidos ^{78 99 101 133}.

TABELA III - Valores de meia-vida da eliminação ($t_{1/2}$) dos ácidos mandélico e fenilglioxílico ¹⁰¹.

exposição		Período de observação pós-exposição (h)	$t_{1/2}$ (h)		Cinética de eliminação	Refs.
intensidade (ppm)	tempo (h)		ácido mandélico	ácido fenilglioxílico		
50	8	-	4-7	-	monoexponencial	18
103		20-200	22,9	21,5		41
206		2-200	26,5	26,7		
23(4-94)		0-18	9,4	-	biexponencial	74
23(4-94)		19-64	16,6	-		
248(155-291)		0-15	6,4	-		
50-200	4 e 8	0-20	3,9	-		99 101
100	8	30-60	24,7	-		79
		0-50	-	10,5		
70		0-20	3,6	8,8		242
50-150		0-15	6,4	-		207

Caperoes et al ⁴¹ observaram em voluntários expostos a 443 mg/m³ ou 886 mg/m³ (103 ou 206 ppm) durante 8 horas, que 50% do ácido mandélico é excretado durante a exposição, e o processo se completa após 4 ou 5 dias. No que concerne ao ácido fenilgloxílico, 25% é excretado durante a exposição e o restante, após 3 ou 4 dias.

O *clearance* renal mais rápido do ácido mandélico em relação ao do ácido fenilgloxílico sugere que ele tenha, de fato, duas vias de eliminação: uma direta e outra pela biotransformação a ácido fenilgloxílico ^{104 164 258}.

Em situações de exposição acima de 215 mg/m³ (50 ppm) de estireno, foi verificado que o quociente entre as concentrações urinárias desses ácidos, determinadas no final da exposição, evidenciava uma predominância do ácido mandélico (ácido mandélico/ácido fenilgloxílico igual a 3,5). No período após a exposição (16 horas do início da mesma), os valores da relação entre os ácidos decresce até que a excreção do ácido fenilgloxílico predomine (ácido mandélico/ácido fenilgloxílico igual a 0,6) ^{101 184}.

Há controvérsias quanto ao momento de excreção máxima desses ácidos, após um período de 8 horas de exposição, controlada ou em campo. Alguns autores relataram que este momento seria no final da exposição ^{7 74 79 95 101 102 107 120 184 207 241}, de 1 hora até 2 horas após ^{19 30 41 65 233} ou ainda de 4 a 8 horas após o final da mesma ^{248 256}.

Em duas situações de exposição, a 215 mg/m³ (50 ppm) e 640 mg/m³ (150 ppm) durante 8 horas, as curvas de eliminação desses ácidos forneceram meias-vidas e coeficiente angular idênticos, confirmando a hipótese de que o processo de eliminação é pouco influenciado pela

intensidade de exposição, no intervalo de concentrações estudado (Fig. 5)²⁰⁷, hipótese corroborada por Guillemin & Bauer⁹⁹.

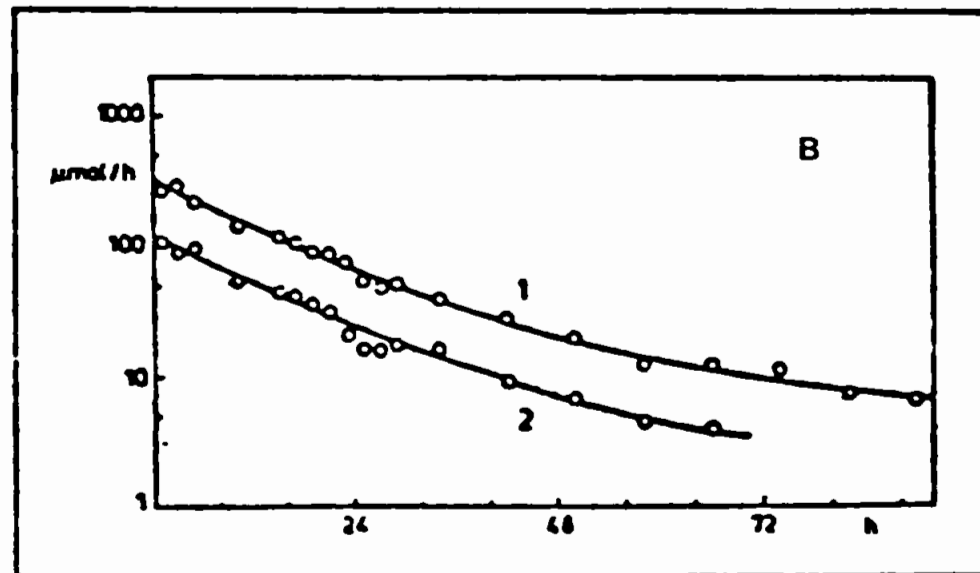
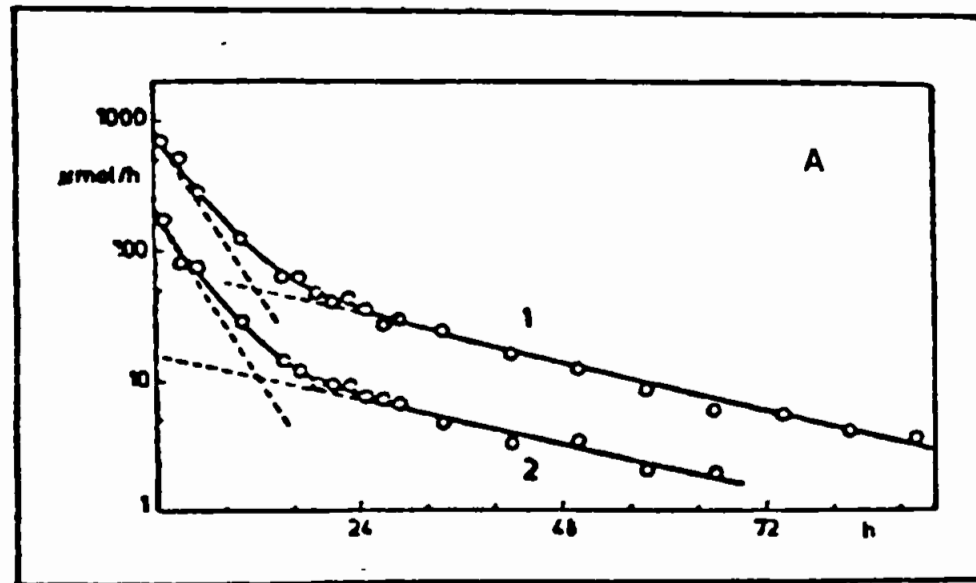


FIGURA 5 - Curvas biexponenciais A e B de eliminação dos ácidos mandélico e fenilglioixílico. (1) indivíduo exposto a 215 mg/m^3 (50 ppm) e (2) indivíduo exposto a 640 mg/m^3 (150 ppm), ambos por 8 horas²⁰⁷.

O artigo publicado por Droz & Guillemin (1983) ⁵⁹ mostra uma representação gráfica dos processos de distribuição do estireno obtida através de modelo fisiológico-matemático, simulando uma exposição a 215 mg/m³ (50 ppm) durante 8 horas, que é apresentada na Fig. 6. Nessa figura, observa-se que o compartimento dos músculos exerce papel importante durante a exposição e o compartimento do tecido adiposo contém praticamente todo o estireno após a exposição. Quantidades maiores de ácido mandélico estão presentes no organismo durante a exposição. Após 15 horas, a quantidade de ácido mandélico torna-se desprezível. O mesmo processo geral é observado para o ácido fenilglioxílico, mas a quantidade máxima permanece menor que a do estireno não biotransformado.

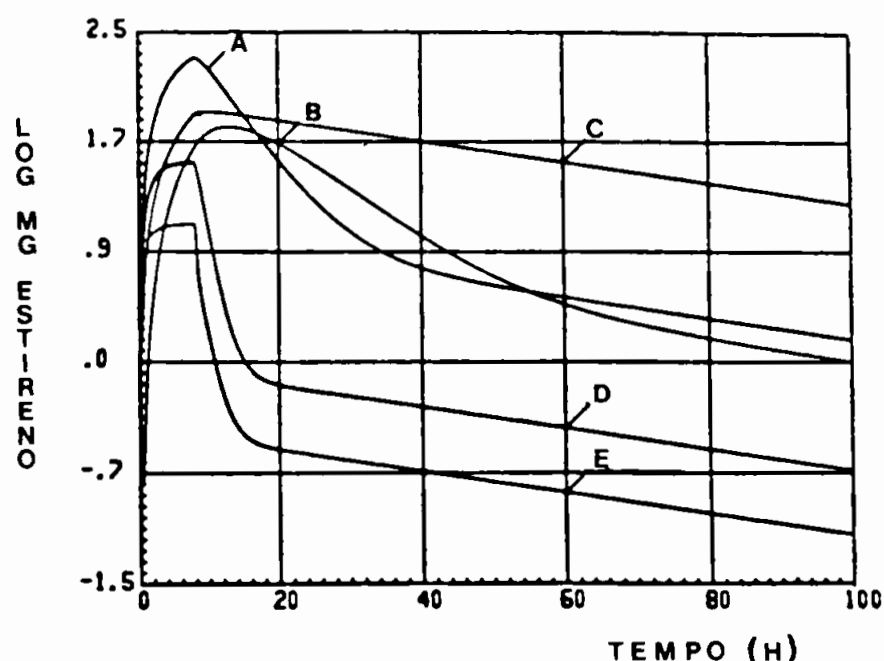


FIGURA 6 - Modelo fisiológico-matemático de distribuição do estireno após exposição simulada a 215 mg/m³ (50 ppm). (A) ácido mandélico; (B) ácido fenilglioxílico; (C) tecido adiposo; (D) músculos e (E) tecidos muito vascularizados ⁵⁹.

Ainda em Droz & Guillemin ⁵⁹, há uma representação gráfica, também obtida por simulação, da relação entre as concentrações de estireno

no ar e dos ácidos mandélico e fenilglioxílico na urina, em 3 situações de exposição:

- 215 mg/m³ (50 ppm) durante toda a semana;
- 215 mg/m³ (50 ppm) durante a semana com apenas 1 dia (4ª feira) a 425 mg/m³ (100 ppm);
- 215 mg/m³ (50 ppm) durante a semana com apenas 1 dia (5ª feira) a 425 mg/m³ (100 ppm).

A variabilidade observada na excreção urinária do ácido mandélico sugere não ocorrer acumulação significativa deste produto de biotransformação no decorrer da semana (Fig. 7) ⁵⁹ .

Para o ácido fenilglioxílico, o efeito da exposição a 425 mg/m³, em um dos dias da semana, parece persistir até o momento da próxima exposição. Um aumento de aproximadamente 15% em relação ao primeiro dia da semana é esperado. Entretanto, o estireno pode ser considerado como um toxicante que não sofre apreciável acumulação no organismo ^{59 180 187 242} .

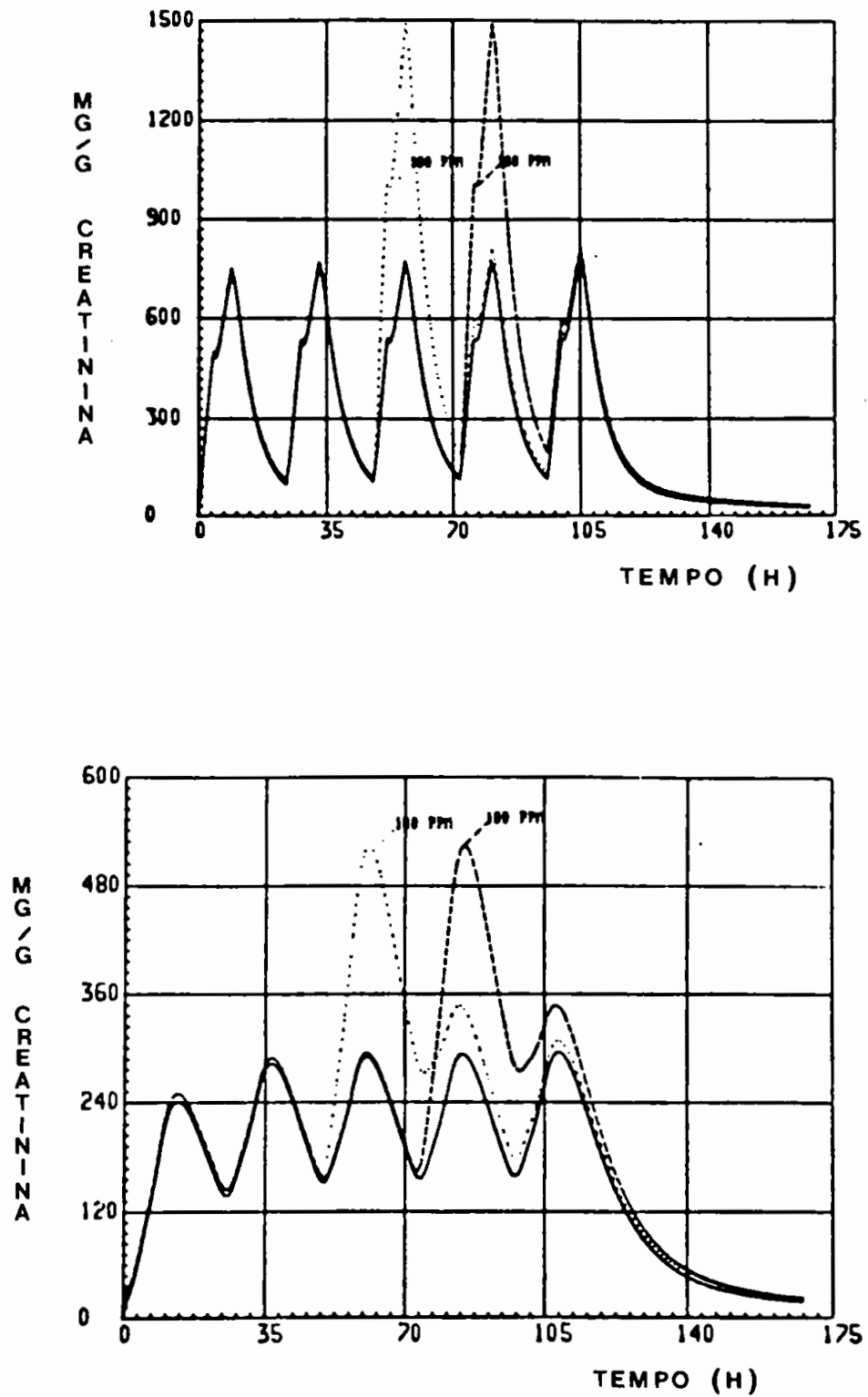


FIGURA 7 - Representação gráfica da concentração urinária dos ácidos mandélico (A) e fenilgloxílico (B) durante uma semana de exposição constante a 215 mg/m^3 (50 ppm) e com 2 dias a 425 mg/m^3 (100 ppm) ⁵⁹.

2.1.3. Toxicodinâmica

A fase toxicodinâmica compreende a interação entre as moléculas do estireno e os sítios-alvo de ação ¹⁰. A transformação química desse toxicante em produtos hidrossolúveis nem sempre resulta numa diminuição da toxicidade, pois intermediários reativos podem ser formados. A Fig. 8 representa um esquema de 2 mecanismos genéricos da ação tóxica que envolvem a biotransformação a intermediários capazes de (A) ligarem-se covalentemente a macromoléculas ou (B) gerarem espécies reativas de oxigênio. Devido à intervenção dos mecanismos de defesa do organismo, a presença do intermediário reativo pode não resultar, necessariamente, em injúria tecidual ^{10 36}.

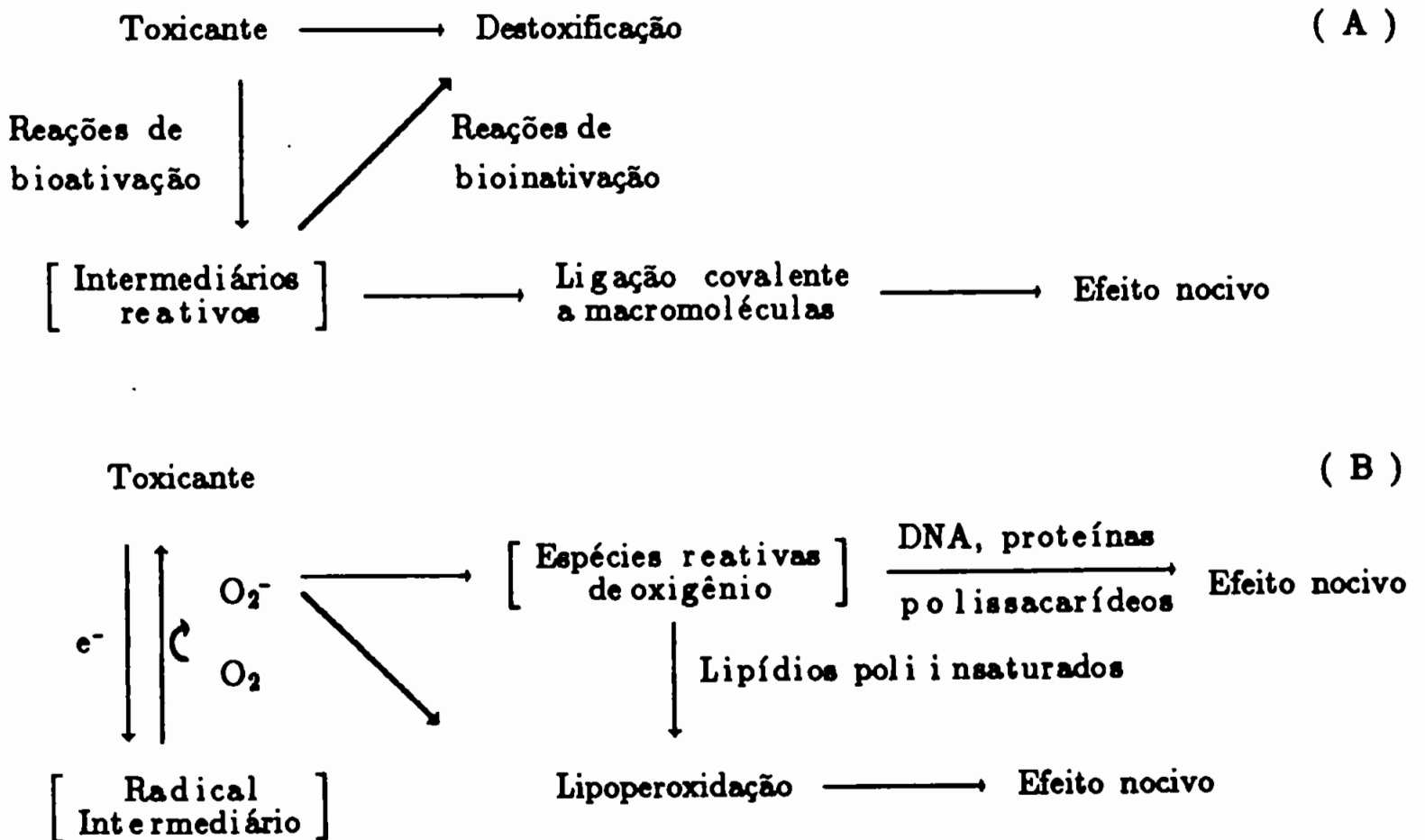


FIGURA 8 - Representação esquemática dos prováveis mecanismos de ação tóxica, A e B, envolvendo intermediários reativos. Adaptada de Bus ³⁶.

Os mecanismos da ação tóxica do estireno têm sido alvo de poucos estudos. Supõe-se que exista um composto estruturalmente semelhante às catecolaminas, que poderia ser o ácido fenilglicólico aminado a fenilglicina, que compete com as aminas biogênicas pela capacidade de armazenamento nas vesículas sinápticas. Mutti et al ¹⁶³ realizaram um experimento com coelhos expostos a vapores de estireno e perceberam um decréscimo dose-dependente da quantidade de dopamina do sistema intra-hipotalâmico de neurônios dopaminérgicos (sistema tuberoinfundibular), e um aumento de ácido homovanílico nesta mesma região anatômica do sistema nervoso central. Husain et al ¹¹⁸, entretanto, encontraram valores elevados de norepinefrina e serotonina, atividade enzimática reduzida de monoamino oxigenase e nenhum efeito na concentração de dopamina, em experimento com ratos aos quais foram administradas doses de estireno por via oral.

Arfini et al ⁸ tentaram corroborar a hipótese da ação depletiva do estireno sobre a dopamina, que modula a secreção da prolactina. Estes autores observaram que após a administração do hormônio liberador da tireotropina (TRH), que estimula a secreção da prolactina, a concentração desta em soro de trabalhadoras expostas estava significativamente maior que a presente em soro de mulheres do grupo controle. Isto sugere que a quantidade de dopamina estaria de fato diminuída, uma vez que o efeito da estimulação do TRH foi mais acentuado entre as mulheres do grupo das expostas.

Mutti et al ¹⁶² procederam à determinação da concentração dos hormônios secretados pela pituitária anterior: prolactina, de crescimento, estimulante da tireotropina (TSH), folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) em soro de trabalhadoras expostas e de não expostas. Verificaram que apenas os valores da prolactina estavam mais elevados. Porém, é necessário

um número mais expressivo de trabalhos para inferir que a elevação da quantidade de prolactina sérica possa estar relacionada a distúrbios do sistema neuroendócrino, causados por um produto de biotransformação do toxicante (possivelmente uma feniletilamina).

A hepatotoxicidade do estireno tem sido evidenciada em estudo com roedores ^{52 140 175 176 177 195 224 225 226 261}. Alterações histológicas caracterizadas por degenerações parenquimais hidrópicas, esteatose e congestão, e uma elevação de atividade da alanina aminotransferase (EC 2.6.1.2.) foram encontradas ^{176 225}. Um possível mecanismo de hepatotoxicidade seria a ligação covalente do estireno, estireno glicol ou óxido de 7,8 estireno a proteínas, supondo-se que ocorram rearranjos moleculares para formar óxidos de areno instáveis, os quais seriam os intermediários reativos possivelmente envolvidos ^{174 176 183 226}. Acredita-se que o estireno seja um indutor enzimático durante a biotransformação de outros xenobióticos ^{177 195 224} e exerça ação depletiva sobre a quantidade de glutathione na forma reduzida ^{52 176 261}.

Desgagne & Belanger ⁵² obtiveram evidência experimental de variação circadiana na atividade enzimática da alanina aminotransferase e lipoperoxidase da fração microsômica hepática, além de variação na concentração de glutathione na forma reduzida, após injeção intraperitoneal de estireno, o que corrobora a hipótese da cronotoxicidade do estireno.

2.1.4. Alterações biológicas produzidas pela exposição ao estireno

Alguns trabalhos versam sobre a escolha de parâmetros biológicos que poderiam expressar um efeito nocivo nos hepatócitos, decorrente da exposição crônica ao toxicante. Para a estimativa da intoxicação ainda na fase prodrômica têm sido propostas as determinações do ácido D-glicárico, 6 β -hidróxi-corticosteróides e 17-hidróxi-corticosteróides, além da depuração da antipirina e a determinação dos ácidos biliares séricos. Porém, são inespecíficos, relativamente de baixa sensibilidade e há fatores que influem na interpretação dos resultados analíticos obtidos, como a exposição simultânea a outros xenobióticos, ingestão de bebidas alcoólicas, hábito de fumar e a falta de valores *normais* de referência para estes parâmetros 54 57 63 89 111 143 234 .

O aumento da atividade das seguintes enzimas hepáticas : aspartato aminotransferase [EC 2.6.1.1], alanina aminotransferase [EC 2.6.1.2], λ -glutamilttransferase [EC 2.3.2.2] e ornitina carbamoiltransferase [EC 2.1.3.3], após a exposição ao toxicante, tem sido considerado um sinal para detectarem-se distúrbios hepáticos crônicos 14 57 63 100 111 117 145 .

Em vários trabalhos, o objetivo presente é o de estabelecer uma associação causal, através de dados experimentais e de inferências estatísticas, entre a exposição ocupacional ao estireno e danos ao sistema nervoso central e periférico 46 47 48 64 107 109 134 136 137 161 196 208 209 218 222. Esses estudos podem ser divididos em 3 categorias: (i) estudos experimentais controlados; (ii) estudos experimentais em campo e (iii) estudos epidemiológicos seccionais (transversais) e longitudinais (de coortes) retrospectivos ou prospectivos; e de casos-controle 45 77 87 92.

Em situações de exposição aguda, muitos solventes orgânicos, incluindo os hidrocarbonetos aromáticos como o estireno, causam narcose e podem levar o indivíduo a óbito por parada respiratória ou cardíaca. São comuns a muitos solventes sinais, tais como conjuntivite, irritação da pele, nariz e garganta e os sintomas, cansaço, redução da memória, dor de cabeça, tontura, parestesia nos dedos das mãos e dos pés e sensação de fraqueza nos braços e pernas ¹⁶.

Baterias de testes psicométricos têm sido usadas durante as investigações dos efeitos nocivos no sistema nervoso. O uso destes testes tornou possível relacionar o comprometimento da performance comportamental dos indivíduos à inalação dos vapores do toxicante ^{6, 46, 92, 136}. A escolha do teste é dependente da hipótese a ser testada relativa ao transtorno biológico (Tab. IV) ⁶.

TABELA IV - Sintomatologia e testes comumente utilizados para avaliar os efeitos comportamentais produzidos pela exposição a solventes orgânicos ⁶.

Sintomatologia	Testes psicométricos
sensorial - parestesia, diminuição da capacidade visual e auditiva	exame neurológico, oftalmológico e da capacidade auditiva
cognitiva - memória (curta e a longo prazo) confusão e desorientação	escala de memória de Wechsler escala de inteligência adulta de Wechsler (WAIS)
afetiva - nervosismo, irritabilidade, depressão, apatia e comportamento compulsivo	teste de Rorschach teste de vigilância de Bourdon-Wiersma teste de substituição dígito-símbolo teste <i>finger tapping</i>
motora - fraqueza nas mãos, incoordenação motora, fadiga e tremores	exame neurológico teste de destreza manual de Sant'Ana teste de Mira teste do tempo de reação simples

No estudo experimental clássico de Stewart ²¹⁸ sobre sinais e sintomas da intoxicação, diferentes grupos de voluntários estiveram expostos a 50, 100, 200 ou 375 ppm de estireno durante 1, 2 ou 7 horas, em câmara especial. Nenhum dos indivíduos expostos a 50 ppm durante 1 hora, 100 ppm por 2 e 7 horas ou a 200 ppm por 1 hora relatou sintomas. Os resultados do teste de destreza manual e de coordenação motora não diferiram dos valores anteriores à exposição. Entretanto, em exposição a 375 ppm por 50 minutos, os resultados do teste de coordenação estavam 10% abaixo dos valores esperados e a maioria dos indivíduos pareceu ter sintomas relacionados a distúrbios neuropsicológicos.

Os resultados de estudos experimentais de campo sugerem a ocorrência de distúrbios neuropsicológicos após a exposição crônica. Estes foram evidenciados pela baixa acuidade visual e performance psicomotora de trabalhadores, associados à excreção urinária média de 1,8 g/L de ácido mandélico ^{136 137}.

Especulou-se também sobre anormalidades no padrão rítmico do eletrencefalograma correlacionadas tanto à excreção média de 0,7 g/L de ácido mandélico ^{208 209} quanto à exposição no intervalo de 5 a 175 ppm de estireno ¹⁹⁸.

Triebig et al ²²⁰ realizaram um estudo prospectivo para investigar se a exposição a longo prazo ao toxicante estaria associada a distúrbios funcionais no sistema nervoso periférico. A frequência de episódios de hipestesia distal entre os trabalhadores variou de 4% a 9% ¹³⁴. Não foi encontrada diferença nos valores da velocidade de condução nervosa dos nervos tibiais posteriores (mediano, ulnar e o peroneal) de indivíduos expostos a mais de 50 ppm de estireno, em relação aos do grupo

controle ¹⁹⁶.

Os resultados de exames oftalmológicos de 300 trabalhadores expostos a pelo menos 8 anos ao estireno a concentrações de 50 a 100 ppm não revelaram nenhum sinal de neurite óptica ¹⁴⁵, embora um caso de neurite retrobulbar em operário envolvido com a produção de barcos de plástico reforçado tenha sido descrito por Mosconi et al ¹⁵⁹. O limiar auditivo a altas frequências também parece ser afetado pela exposição a concentrações inferiores a 35 até 164 ppm ¹⁶⁰.

Em estudo transversal sobre a prevalência de efeitos nocivos no sistema hematopoiético, em indústria de produção da borracha de estireno-butadieno, foram encontrados níveis ligeiramente menores de eritrócitos circulantes, hemoglobina, plaquetas e neutrófilos ⁴⁴. Porém, outros autores não encontraram correlação entre a duração da exposição e a concentração de hemoglobina, número de leucócitos e de plaquetas, quando comparadas a um grupo controle ^{145 146 219}.

Há relativamente poucos estudos sobre os efeitos nocivos do estireno no sistema respiratório. Os resultados de alguns trabalhos sugerem que a exposição ao toxicante, a concentrações superiores a 50 ppm, possa causar irritação ao trato respiratório e obstrução das vias aéreas ^{49 53 123 158}.

Estudos sobre os distúrbios da função renal associados à exposição ao estireno também são poucos. Algumas determinações bioquímicas têm sido empregadas na tentativa de detectar-se uma manifestação subclínica de injúria renal ^{88 235}. Nesses estudos foram determinadas as concentrações urinárias de proteínas totais, albumina, β_2 -microglobulina, proteína ligada ao retinol, glicose, lactato desidrogenase [EC 1.1.1.27], lisozima [EC

3.2.1.17] e de β -glicuronidase [EC 3.2.1.31], não se obtendo, todavia, evidência da correlação entre a exposição e estes parâmetros biológicos relacionados à integridade morfológica e funcional dos glomérulos ou dos túbulos.

Vários são os trabalhos sobre os danos ao material genético produzidos pelo estireno e óxido de estireno, em sistemas experimentais. As investigações frequentemente são realizadas com *Salmonella typhimurium* e *Schizosaccharomyces pombe*, ambas *in vivo* e *in vitro*; e com células de camundongos e hamsters *in vitro* (*host-mediated assay*)^{21 144 151 167 175 186 237}. Os estudos *in vitro* têm sido desenvolvidos na presença de um sistema de ativação metabólica obtido da fração microssômica do *homogenato* de fígado de camundongo.

O óxido de estireno é um mutagênico ativo, independentemente do sistema genético considerado, ao contrário do estireno que necessita de ativação metabólica^{144 167 223 237}. Quanto à mutagenicidade, Dolara et al⁵⁵ não observaram nenhum aumento na atividade do estireno, presente em urina de trabalhadores expostos, sobre cepas de *Salmonella typhimurium*.

Em estudo com cultura de células, a morfologia dos cromossomas durante a metáfase foi fortemente afetada pelo tratamento das células de *Allium cepa L.* com o óxido de estireno¹³⁸. Outros autores observaram, pelos dados laboratoriais obtidos da cultura de linfócitos do sangue periférico de trabalhadores da indústria de plástico reforçado, uma incidência significativa de anomalias cromossômicas, principalmente quebras^{58 84 155 219}. Hogstedt et al¹¹⁶ e Norderson & Beeckman¹⁶⁶ corroboraram a hipótese que ocorra um aumento de micronúcleos em linfócitos e células com aneuploidia, porém não observaram um aumento de anomalias

cromossômicas estruturais. Em estudos mais recentes, observa-se que a relação entre a exposição e os efeitos nos cromossomas ainda não está totalmente esclarecida. Esta impossibilidade de caracterizar a associação causal provavelmente dependa da baixa precisão das técnicas analíticas utilizadas ou do próprio parâmetro biológico pesquisado 105 122 149.

Suspeita-se que mulheres ocupacionalmente expostas ao estireno levem a termo um menor número de gestações, possivelmente devido a abortos clinicamente espontâneos mais frequentes 110 135.

Em investigações epidemiológicas sobre os casos de óbito entre indivíduos ocupacionalmente expostos a pelo menos 5 anos ao estireno, alguns autores vislumbraram que o número de mortes por câncer ou outras causas não foi maior que o esperado quando comparado a um grupo de referência 90 154 164 173.

Para testar a hipótese que casos de leucemia e de linfomas pudessem estar associados à exposição ao estireno, outros autores procederam a estudos retrospectivos de coorte. O número de mortes por linfomas e leucemia foi significativamente maior no grupo dos expostos que no grupo de referência pareado. Estes achados não excluem a possibilidade do estireno ser um carcinógeno humano, porém não corrobora a hipótese de que o xenobiótico seja efetivamente o fator etiológico, pois em muitos processos industriais ocorre a exposição concomitante ao benzeno e a outros xenobióticos 50 115 153 172.

2.2. Aspecto analítico

Uma estimativa da dose interna, na exposição ocupacional ao estireno, é possível pela quantificação dos ácidos mandélico e fenilgloxílico em amostras de urina pelas técnicas colorimétrica ¹⁷¹, isotacoforética ²¹⁵, fluorimétrica ⁴³, cromatográficas em camada delgada ²⁵, em fase gasosa ^{20 35 40 73 85 98 212 228 233} e em fase líquida de alto desempenho, ^{91 168 169 170 185}. Há outros métodos analíticos que por serem publicados em países do Leste Europeu, Escandinávia e Japão em seu idioma de origem, tornam-se de difícil acesso.

Em 1970, Ohtsuji & Ikeda ¹⁷¹ descreveram a reação quantitativa dos ácidos mandélico e fenilgloxílico com o agente cromogênico composto por ácido sulfúrico concentrado/formalina 100:1 (v/v) e leitura das absorvâncias a 450 nm e a 350 nm, respectivamente.

Em anos seguintes, Engstrom & Rantanen (1974) ⁷³ e Chakrabarti (1979) ⁴³ observaram que compostos fenólicos de origem endógena presentes na urina, como colesterol e os ácidos fenilacético, vanílico e ferrúlico, entre outros, também reagiam com esse agente cromogênico, produzindo um intervalo de concentrações de 0,022 a 0,698 g/L em urina de indivíduos não expostos ocupacionalmente ao estireno.

A isotacoforese é uma técnica de separação baseada na mobilidade elétrica das substâncias em um sistema eletrolítico, e com posterior leitura das bandas em densitômetro a 254 nm. Necessita de uma fonte que proporcione alta diferença de potencial (5 a 20 Kv) para a migração diferencial dos componentes da amostra ²¹⁵.

Slob (1973) ²¹² usou a técnica cromatográfica em papel para a separação do ácido mandélico em amostras de urina, com o sistema-solvente composto por

n-butanol saturado com amônia e revelação com cloreto férrico.

Chakrabarti (1979) ⁴³ procedeu à separação do ácido mandélico por cromatografia em camada delgada, com o desenvolvimento em sistema-solvente composto por n-butanol/etanol/amônia/água 4:1:1:1 (v/v) e identificação do ácido mandélico sob luz ultravioleta a 254 nm. A quantificação foi realizada pela leitura da intensidade de fluorescência (excitação a 395 nm e emissão a 480 nm).

Segundo Bieniek et al (1982) ²⁵, a separação dos ácidos de interesse é satisfatória pela cromatografia em camada delgada com o desenvolvimento em n-butanol/clorofórmio/ácido acético/água 5:2:1:4 (v/v) e a revelação com solução de p-dimetil-amino benzaldeído (reagente de Ehrlich) a 4% em ácido acético.

Embora os ácidos carboxílicos possam ser analisados diretamente por cromatografia em fase gasosa, prefere-se a determinação de seus derivados, menos polares e mais voláteis. Isto se deve principalmente aos problemas relacionados à adsorção pelos grupos silanol do suporte, estabilidade térmica e temperatura de trabalho.

A derivação química necessária dos ácidos mandélico (α -hidroxiácido) e fenilglioxílico (α -cetoácido) é conseguida através da esterificação com diazometano ^{20 35 85 233} ou 3-metil-p-toliltriazeno ⁴⁰ e da formação de éteres trimetilsilícicos ^{73 98 212 228 248} com agentes silanizantes. A presença do grupo carbonílico, além da fotossensibilidade, dificulta a quantificação de α -cetoácidos.

Verificou-se experimentalmente que o ácido fenilglioxílico encontra-se na forma tautomérica e que quantidades excessivas de diazometano ou agentes silanizantes favorecem a formação de vários produtos intermediários ⁹⁸. Como consequência desse fato, a relação entre as concentrações do ácido com os correspondentes picos

do cromatograma não é linear. Para minimizar esse problema, Guillemin & Bauer⁹⁸ propuseram a prévia redução do ácido fenilglioxílico a mandélico com zinco em pó, em meio fortemente ácido, ao abrigo da luz e posterior quantificação do ácido mandélico *total*.

De fundamental importância aos métodos cromatográficos em fase gasosa é a escolha da coluna, sendo comumente utilizadas as empacotadas com fase estacionária apolar ou pouco polar, tais como OV-1, OV-17 ou SE-30, temperatura da coluna de 130° a 200°C e detector por ionização em chama.^{20 35 40 73 85 98 212 228 233}

Mais recentemente, observa-se uma tendência ao desenvolvimento de métodos analíticos que contenham a técnica cromatográfica em fase líquida de alto desempenho. Foram encontrados na literatura científica métodos cromatográficos de partição (líquido-líquido) de *fase reversa* (fase estacionária lipofílica e fase móvel aquosa)^{168 169 185} e de *fase reversa* de par iônico (fase estacionária lipofílica e a adição de um *counter-ion* à fase móvel aquosa)^{91 170}, para a quantificação sem derivação química dos ácidos de interesse.

As colunas cromatográficas são compostas por cadeias lineares de hidrocarbonetos de 8 ou 18 carbonos, covalentemente ligados à superfície do suporte via pontes de siloxano, que conferem um caráter hidrofóbico à superfície da sílica (colunas *bonded phase*): LiChrosorb RP-8, Nucleosil 5C-18 ou ODS-Sil X^{91 168 185}.

Os eluentes são de alta transmitância, baixa viscosidade e de pH acima de 2,0 para que seja evitado o ataque às ligações silício-carbono da fase estacionária. Constituem as fases móveis: água/acetona/ácido acético 95:5:0,02 (v/v)^{168 185}; solução de KH₂PO₄ (pH = 2,5)/acetona 90:10 (v/v)¹⁶⁹; tampão fosfato sódico

0,02M (pH = 8,2) a 0,01M em cloreto de tetrabutílamônio/acetoneitrila 90:10 (v/v) ⁹¹ e solução de KH₂PO₄ 20 mM (pH = 3,3), contendo decanossulfonato de sódio 3 mM/acetoneitrila 85:15 (v/v) ¹⁷⁰, todas usadas no modo isocrático de eluição.

Entre os detectores existentes na cromatografia em fase líquida de alto desempenho, o de escolha é o espectrofotométrico com lâmpada de emissão na região do ultravioleta, cujo sinal elétrico é proporcional à concentração dos solutos no eluente ^{91 168 169 170 185}.

O procedimento de extração comumente presente nesses métodos realiza-se em meio ácido (pH ao redor de 2,0), o que facilita a migração dos ácidos de interesse para o solvente orgânico, uma vez que geralmente esses encontram-se na forma protônica ^{25 35 40 43 73 85 98 168 171 185 212 215 228 233 248}. Acredita-se que a adição de sais às amostras de urina, como (NH₄)₂SO₄ ou preferencialmente um sal neutro como NaCl, favoreça a partição dos ácidos para o solvente orgânico devido ao aumento da força iônica do meio aquoso, e conseqüente diminuição da solubilidade neste, fenômeno conhecido como *salting out* ^{43 73 85 98 215 228}.

Os solventes extratores utilizados com mais frequência são o éter etílico ^{35 43 73 215 233 248}; acetato de etila ^{40 85 98 212 228}; éter etílico/metanol 9:1 (v/v) ¹⁶⁸ e cloreto de n-butílica/isopropanol 9:1 (v/v) ¹⁸⁵.

Os reagentes encontrados como padrão interno da técnica de extração, nos métodos cromatográficos em fase gasosa e em fase líquida de alto desempenho, são os ácidos heptadecanóico ^{35 228}, mirístico ⁴⁰, o-metilhipúrico ¹⁶⁸, fenilacético ⁹¹, 4-hidróxi-benzóico ¹⁸⁵, α-fenilático ²⁴⁸ e fluoreno ⁸⁵.

3. OBJETIVO E PLANO DE TRABALHO

A monitorização biológica da exposição ocupacional ao estireno proporciona uma avaliação da *dose interna* deste toxicante. O acompanhamento periódico e sistemático da concentração do ácido mandélico urinário ao longo do tempo é uma estratégia de inegável valia, pois uma exposição excessiva pode ser detectada antes que ocorram alterações biológicas significativas à saúde do trabalhador.

Não foi encontrado em nosso meio, qualquer trabalho que apresentasse um método analítico para a determinação do ácido mandélico em urina de trabalhadores expostos ao estireno; e que fornecesse resultados de boa precisão e exatidão mesmo próximos ao limite de quantificação. Então, considerou-se oportuna a padronização de método analítico que pudesse ser aplicado durante a monitorização biológica da exposição ocupacional a este toxicante, idealizando-se para atingir tal objetivo, o seguinte plano de trabalho:

- proceder à busca minuciosa, em publicações científicas, de um método que apresente uma técnica analítica simples e específica, e que forneça resultados precisos e exatos;
- uma vez seleccionada a técnica analítica, padronizar os procedimentos de extração e quantificação do método;
- aplicar o método analítico padronizado para a determinação de ácido mandélico em urina de trabalhadores expostos e não expostos ao estireno;
- proceder à análise estatística dos resultados obtidos com a aplicação do método analítico padronizado.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Local de trabalho e população estudada

Os trabalhadores envolvidos na monitorização biológica planejada neste trabalho eram de uma indústria de produção do monômero de estireno. Foi realizada a coleta de urina de um grupo de 10 trabalhadores não expostos ao estireno pertencentes à Divisão de Saúde Ocupacional, que relataram não terem tido qualquer contato com este toxicante (Grupo Controle). Paralelamente, procedeu-se à colheita de amostras de urina de 8 trabalhadores lotados pela indústria na área de fabricação do monômero de estireno (Grupo Exposto).

As Tabs. V e VI mostram algumas informações sobre as duas populações estudadas, obtidas pela aplicação de questionário com os quesitos:

- dados antropométricos;
- local de trabalho e tipo de operação;
- tempo de trabalho na área;
- doenças pré-existentes ou queixas recentes em relação ao estado de saúde;
- medicamentos ingeridos nos 15 dias que precederam a aplicação do questionário;
- hábito de ingerir bebidas alcoólicas e frequência;
- uso de equipamentos de proteção individual (EPIs).

TABELA V - Domicílio, uso de medicamentos e bebidas alcoólicas (etanol) de trabalhadores do Grupo Controle de uma indústria de produção do monômero de estireno.

Trabalhador	Idade (anos)	Município de residência	Uso de medicamentos	Consumo de etanol
1. A.C.P.S.	36	Rio de Janeiro	haloperidol e biperideno	não bebe
2. O.P.L.	42		-	bebe 2 ou 3x/sem.
3. M.D.	35		-	bebe raramente
4. A.M.S.	37	Duque de Caxias	femproporex	não bebe
5. A.C.M.	47	Rio de Janeiro	-	bebe 2 ou 3x/sem
6. G.L.C.	30		diazepan	bebe 1 ou 2x/mês
7. J.C.T.	36	Campo Grande	-	bebe 2 ou 3x/sem
8. L.R.F.	33	Rio de Janeiro	-	bebe 1 ou 2x/mês
9. J.E.O.	46		-	bebe raramente
10. J.B.O.	37	Petropolis	biperideno	não bebe

TABELA VI - Domicílio, uso de medicamentos e bebidas alcoólicas (etanol) de trabalhadores do Grupo Exposto de uma indústria.

Trabalhador	Idade (anos)	Município de residência	Uso de medicamentos	Consumo de etanol
1. J.D.G.L.	42	Rio de Janeiro	vitaminas A, B ₆ e C	bebe raramente
2. D.A.B.J.	42		-	bebe 1 ou 2x/mês
3. J.L.G.H.	31		-	bebe 2 ou 3x/sem
4. E.M.M.	43		-	bebe raramente
5. J.B.W.	28	Petropolis	-	bebe 2 ou 3x/sem
6. G.G.	39	Duque de Caxias	clorpropamida	não bebe
7. A.G.	30	Rio de Janeiro	-	não bebe
8. A.C.M.S.	26	Niterói	-	bebe raramente

Para o Grupo Controle, a colheita das amostras de urina foi realizada antes e após a jornada de trabalho de 8 horas, no vestiário, em frascos de polietileno limpos e secos, em uma única vez. Para o Grupo Exposto, a coleta de urina foi realizada antes e após três jornadas consecutivas de 6 horas.

As amostras foram mantidas em geladeira, sem a adição de conservantes, até o momento da remessa para São Paulo, ao término do experimento. Foram transportadas em caixa de isopor com gelos seco e comum, mantendo-se a temperatura em seu interior próxima a 4°C.

A densidade e a concentração de creatinina urinárias foram determinadas dentro de 2 a 4 dias úteis após a colheita, respectivamente, com o refratômetro Uricon (Atago[®]) e em Auto Analyzer II Technicon[®], através da reação de Jaffé com picrato alcalino, no Laboratório de Bioquímica Clínica do Hospital Universitário. Após as determinações da densidade e da creatinina, as amostras foram mantidas em freezer durante um mês até o momento da análise cromatográfica.

Foi também realizada uma estimativa da exposição, através da utilização de amostradores por difusão passiva para solventes orgânicos OV-3500 da 3M[®], colocados na zona respiratória dos trabalhadores. A estratégia foi a seguinte:

- um amostrador colocado em trabalhador do Grupo Controle, durante 1 jornada de trabalho;
- 2 amostradores para cada jornada de trabalho colocados em 2 trabalhadores do Grupo Exposto, um em cada, durante 3 jornadas consecutivas.

Foi realizado também um controle positivo forçado com a colocação de um amostrador próximo à tampa aberta de um caminhão-tanque, durante 2 operações de carregamento de estireno.

Após a coleta, os amostradores foram fechados e conservados sob refrigeração a 4°C até serem enviados em caixa de isopor, contendo gelo seco, para o Laboratório Toxikón em São Paulo, onde foram analisados.

4.2. Padronização das técnicas de extração e quantificação do ácido mandélico em urina

4.2.1. Material

4.2.1.1. Reagentes e solventes

Os reagentes e solventes utilizados foram de grau de pureza para análise:

- ácido mandélico racêmico (Fluka[®]);
- ácido o-metilhipúrico (J.T.Baker[®]);
- solução de ácido clorídrico 6N (Merck[®]);
- éter etílico (Merck[®]);
- metanol (Merck[®]);
- metanol LiChrosolv[®] (Merck[®]);
- solução de dihidrogenofosfato de potássio (KH_2PO_4) a 5mM e ácido fosfórico 85% (Merck[®]);
- acetonitrila LiChrosolv[®] (Merck[®]).

4.2.1.2. Soluções-padrão

A partir de alíquotas de uma solução metanólica de ácido mandélico de concentração 6250 mg/L, transferidas para balões volumétricos posteriormente completados com metanol, foram preparadas as soluções-padrão de concentrações 2,5; 12,5; 25; 125; 250 e 625 mg/L. A partir de alíquotas de uma solução aquosa de ácido mandélico de concentração 50 g/L, transferidas para balões volumétricos posteriormente completados com água destilada ou urina, foram preparadas as soluções-padrão de concentrações

0,010; 0,050; 0,10; 0,50; 1,0 e 2,5 g/L.

Foi preparada uma solução aquosa de ácido o-metilhipúrico de concentração 1,5 g/L (padrão interno). As soluções-padrão aquosas e metanólicas de ácido mandélico, e a aquosa de o-metilhipúrico são estáveis por vários meses a 4°C e em frasco âmbar.

4.2.1.3. Aparelhos e acessórios

- balança analítica (E.Mettler[®]);
- potenciômetro digital modelo 601 (Orion[®]);
- agitador mecânico tipo *vortex* (Leucotron[®]);
- suporte para filtração a vácuo;
- membranas hidrofílicas com poros de 0,22 μm de diâmetro interno (tipo GVWP, Millipore[®]);
- microsseringa de 100 μL (Hamilton[®]);
- cromatógrafo de fase líquida de alto desempenho modelo CG 480 (Instrumentos Científicos CG Ltda) equipado com:
 - . válvula injetora de 20 μL ;
 - . coluna de aço inoxidável $\mu\text{BondaPak}^{\bullet}$ C₁₈ (Waters[®]), de 3,9 mm de diâmetro interno e 300 mm de comprimento, composta por partículas irregulares de sílica ($\mu\text{Porasil}$ de 10 μm) covalentemente ligadas em 10% da superfície total à fase estacionária hidrofóbica de octadecilsilano;
 - . coluna de proteção da CG[®] de 4,0 mm de diâmetro interno e 40 mm de comprimento, composta por material similar ao da coluna;
 - . forno da CG[®] com ajuste de temperatura para a coluna e coluna de proteção;

- . detector espectrofotométrico modelo CG 435 B com lâmpada de deutério de emissão na região do ultravioleta (195 a 350 nm), caminho ótico de 10 mm e volume da célula de 8 μL ;
- . integrador e processador de cromatogramas modelo CG 300, de faixa dinâmica linear de 1 μV a 1 V e com saída de 0,8 V/UAFS;
- . programas aplicativos para o tratamento estatístico dos resultados, MicroStat[®] e StatGraphics[®].

4.2.1.4. Amostras de urina para a padronização do método analítico

Foram preparados vários *pools* de amostras de urina obtidas de alunos, estagiários e funcionários que exercem atividades nos laboratórios do Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Foram colhidas e homogeneizadas em cada um dos dias da execução da técnica de extração.

4.2.2. Método

4.2.2.1. Otimização do sistema cromatográfico para a separação do ácido mandélico e do padrão interno

Foi utilizada a fase móvel composta pela solução de dihidrogenofosfato de potássio a 5 mM de pH = 3,0/acetonitrila 90:10 (v/v). A fase móvel foi previamente filtrada através de membrana hidrofílica Millipore[®] e desgasada pelo ultra-som durante 20 minutos, antes do uso. O pH da solução de dihidrogenofosfato de potássio 5 mM foi ajustado com a adição de gotas de ácido fosfórico 85% e a água utilizada na sua preparação foi purificada através do sistema Milli-Q (Millipore[®]), cedida pelo Instituto de Química. Estabeleceu-se para o uso do cromatógrafo:

- vazão da fase móvel = 1,5 mL/min;
- pressão resultante = 1030 psi (lb/pol²);
- temperatura = 30° C;
- comprimento de onda = 225 nm;
- atenuação = 0,16 UAFS;
- fundo de escala = 128 mV;
- velocidade do papel = 2 mm/min.

4.2.2.2. Preparo da curva de calibração do ácido mandélico

Após a preparação das soluções-padrão de ácido mandélico em água e em urina, nas concentrações de 0,010; 0,050; 0,10; 0,50; 1,0 e 2,5 g/L (descrita em 4.2.1.2.), submeteu-se o volume de 1,0 mL dessas soluções às técnicas de extração e quantificação, de acordo com o descrito em 4.2.2.3., em

triplicata, juntamente com um *branco de reagentes* analisado de modo idêntico, também em triplicata.

4.2.2.3. Procedimento analítico para a determinação do ácido mandélico urinário por cromatografia em fase líquida de alto desempenho

- em um tubo de ensaio de 15 mL, com tampa de Teflon[®], adicionar 1,0 mL de urina, 0,5 mL da solução de ácido o-metilhipúrico 1,5 g/L e 0,2 mL da solução de HCl 6N;
- a seguir, proceder à extração com 4,0 mL da mistura extratora éter etílico/metanol 9:1 (v/v), agitando o tubo durante 10 minutos no *vortex* e com posterior centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos (se necessário);
- transferir 0,5 mL da camada orgânica para um béquer afunilado de 5,0 mL e levar à *secura*, em banho de água a 30°C;
- ao resíduo obtido, adicionar 0,5 mL de metanol LiChrosolv[®], no momento da injeção;
- transferir 100 µL do extrato metanólico, com uma microsseringa, para a válvula injetora do cromatógrafo de fase líquida de alto desempenho de detecção a 225 nm. O fluxograma do procedimento é mostrado na Fig. 9.

Nota : Os béqueres afunilados de 5,0 mL foram previamente *silanizados* com solução de dicloro-dimetilsilano a 10% em tolueno anidro (imersão por 60 minutos) e metanol anidro (por 15 minutos). Após o uso, ficaram imersos em etanol comercial durante 18h antes da lavagem com detergente neutro.

1,0 mL de URINA

+ 0,5 mL de ácido o-metilhipúrico 1,5 g/L
 + 0,2 mL de HCl 6N
 + 4,0 mL de éter etílico/metanol 9:1 (v/v)
 agitar no *vortex* por 10 min
 centrifugar a 3000 rpm por 5 min

FASE AQUOSA

descartar

FASE ORGÂNICA

0,5 mL do EXTRATO ETÉREO

levar à secura em banho de água a 30°C

RESÍDUO

retomar o resíduo com 0,5 mL de metanol
 LiChrosolv[®]

EXTRATO METANÓLICO

transferir 100 μ L para a válvula injetora

COLUNA CROMATOGRÁFICA

KH₂PO₄ 5mM (pH=3,0)/acetonitrila 90:10

DETECTOR ESPECTROFOTOMÉTRICO

comprimento de onda em 225 nm

FIGURA 9 – Fluxograma do procedimento analítico para a determinação do ácido mandélico urinário por cromatografia em fase líquida de alto desempenho.

5. RESULTADOS

5.1. Padronização das técnicas de extração e quantificação do ácido mandélico em urina

5.1.1. Curva de calibração do ácido mandélico

Na Fig. 10 estão representadas as curvas de calibração em água destilada e em urina do *pool*. Os pontos assinalados representam os valores de sinal analítico por concentração obtidos em determinado ensaio.

Nas Figs. 11, 12 e 13, podem ser respectivamente visualizados os cromatogramas relativos ao *branco de urina*, à concentração de 0,010 g/L da solução-padrão em água, e à concentração de 0,010 g/L da solução padrão em urina do *pool*.

Considerou-se a concentração de 0,004 g/L do ácido mandélico como o limite de detecção do método analítico; e a de 0,006 g/L como o limite de quantificação do método analítico.

BIBLIOTECA
faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Universidade de São Paulo

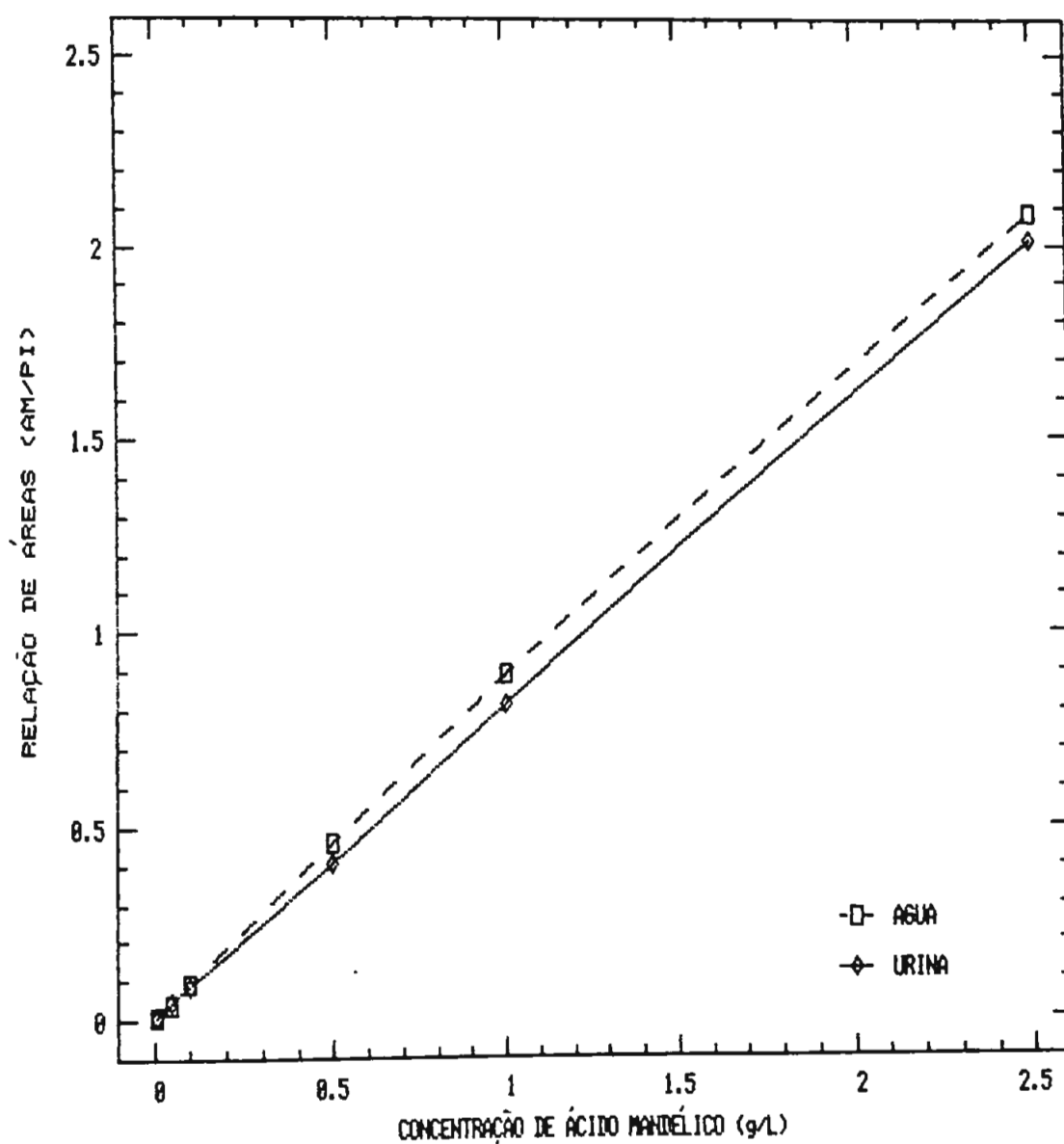


FIGURA 10 - Curvas de calibração do ácido mandélico determinado por cromatografia em fase líquida de alto desempenho, em água e em urina: 0,010; 0,050; 0,10; 0,50; 1,0 e 2,5 g/L. AM = ácido mandélico e PI = padrão interno.

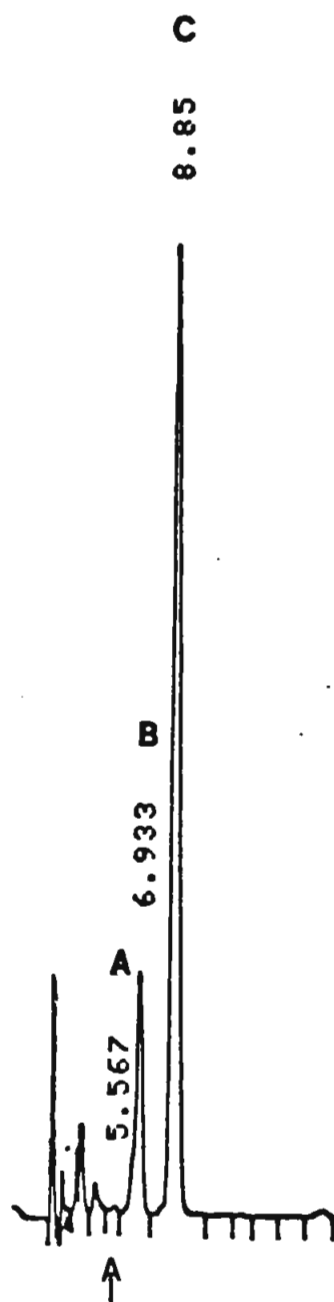


FIGURA 11 - Cromatograma obtido da curva de calibração do ácido mandélico, em urina.
A = ácido mandélico (*branco de urina*); B = ácido hipúrico e C = ácido o-metilhipúrico 1,5 g/L.

Coluna = μ BondaPak[®] C₁₈ (300 x 3,9 mm e 10 μ m)

Fase móvel = KH₂PO₄ 5 mM (pH = 3,0) / CH₃CN 90:10

Comprimento de onda = 225 nm

Atenuação = 0,16 UAFS

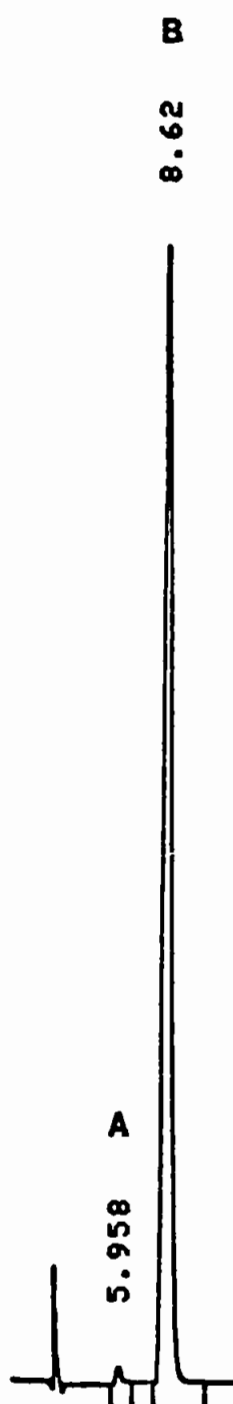


FIGURA 12 - Cromatograma obtido da curva de calibração do ácido mandélico, em água.

A = ácido mandélico 0,010 g/L e B = ácido o-metilhipúrico 1,5 g/L.

Coluna = μ BondaPak[®] C₁₈ (300 x 3,9 mm e de 10 μ m)

Fase móvel = KH₂PO₄ 5 mM (pH = 3,0) / CH₃CN 90:10

Comprimento de onda = 225 nm

Atenuação = 0,16 UAFS

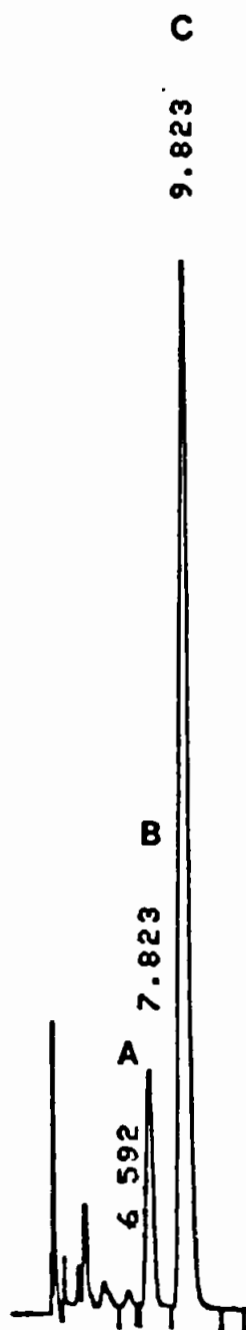


FIGURA 13 - Cromatograma obtido da curva de calibração do ácido mandélico, em urina.
A = ácido mandélico 0,010 g/L; B = ácido hipúrico e C = ácido o-metilhipúrico 1,5 g/L.

Coluna = μ BondaPak[®] C₁₈ (300 x 3,9 mm e 10 μ m)

Fase móvel = KH₂PO₄ 5 mM (pH = 3,0) / CH₃CN 90:10

Comprimento de onda = 225 nm

Atenuação = 0,16 UAFS

5.1.2. Estudo da recuperação

Para o estudo da recuperação da técnica de extração, aos resíduos obtidos das alíquotas do *pool* submetidas ao procedimento analítico, foi adicionado o volume de 0,5 mL das soluções metanólicas de ácido mandélico nas concentrações de 2,5; 12,5; 25; 125; 250 e 625 mg/L, correspondentes às de valores 0,010; 0,050; 0,10; 0,50; 1,0 e 2,5 g/L.

A recuperação da técnica de extração foi determinada através da relação algébrica entre os dados experimentais obtidos com as curvas de calibração das soluções-padrão submetidas à técnica de extração e das soluções-padrão metanólicas adicionadas aos resíduos. Os valores encontrados da recuperação estão na Tab. VII.

TABELA VII - Valores da recuperação do ácido mandélico urinário determinado por cromatografia em fase líquida de alto desempenho.

Concentração de ácido mandélico (g/L)	Conc. média encontrada (g/L)	Recuperação (%)
0,010	0,0106	106
0,050	0,0460	92,0
0,10	0,0954	95,4
0,50	0,4981	99,6
1,0	0,9938	99,4
2,5	2,4680	98,7

5.1.3. Estudo da precisão

Para o estudo da precisão dos resultados analíticos, procedeu-se a sete ensaios consecutivos com soluções-padrão de ácido mandélico em urina do *pool* nas concentrações de 0,050; 1,0 e 2,5 g/L, em hexaplicata, juntamente com um *branco de urina*, analisado de modo idêntico.

A precisão dos resultados analíticos pôde ser estimada através dos coeficientes de variação intra-ensaio (CV_{intra}) e interensaio (CV_{inter}), operando independentemente (Tab. VIII). O CV_{intra} foi obtido de hexaplicatas de um mesmo ensaio e o CV_{inter} com as médias dessas hexaplicatas obtidas a partir de 7 ensaios realizados.

TABELA VIII - Precisão dos resultados analíticos obtidos da determinação do ácido mandélico urinário por cromatografia em fase líquida de alto desempenho.

Concentração de ácido mandélico (g/L)	Coefficiente de variação intra-ensaio* (%)	Coefficiente de variação interensaio† (%)
0,050	1,5	2,2
1,0	0,9	1,2
2,5	1,2	1,4

* hexaplicatas para cada ponto da curva de calibração.

† hexaplicatas para cada ponto da curva de calibração durante 7 ensaios consecutivos.

5.2. Aplicação do método analítico em urina de trabalhadores de uma indústria de produção do monômero de estireno

5.2.1. Determinação da densidade e creatinina urinárias

Os valores da densidade e creatinina das amostras do Grupo Controle e do Grupo Exposto (antes e após a jornada de trabalho) são mostrados nas Tabs. IX e X para o primeiro Grupo, XI e XII para o segundo, respectivamente. Para a correção pela densidade foi usada a expressão:

$$V_r = V_o \times \frac{1,024 - 1}{D - 1} \quad \text{onde}$$

V_r = valor em g/L corrigido pela densidade de 1,024

V_o = valor obtido em g/L do ácido mandélico

D = valor da densidade da amostra

TABELA IX - Valores da densidade em urina de trabalhadores do Grupo Controle, obtidos antes e após a jornada de trabalho.

Trabalhador	Antes	Depois
1. A.C.P.S	1,022	1,020
2. O.L.P.	1,020	1,020
3. M.D.	1,021	1,026
4. A.M.S.	1,020	1,025
5. A.C.M.	1,029	1,027
6. G.L.C.	1,017	1,020
7. J.C.T.	1,015	1,023
8. L.R.F.	1,025	1,025
9. J.E.O.	1,025	1,023
10. J.B.O.	1,015	1,022
média	1,021	1,023

Média total = 1,022.

Erro-padrão = 0,002.

TABELA X - Valores da creatinina em urina de trabalhadores do Grupo Controle, obtidos antes e após a jornada de trabalho.

Trabalhador	Antes (g/L)	Depois (g/L)
1. A.C.P.S	2,20	1,43
2. O.L.P.	1,72	1,29
3. M.D.	1,69	1,82
4. A.M.S.	1,60	1,98
5. A.C.M.	2,40	2,16
6. G.L.C.	1,90	2,20
7. J.C.T.	1,09	1,48
8. L.R.F.	1,60	1,60
9. J.E.O.	1,58	1,38
10. J.B.O.	1,00	1,32
média	1,68	1,66

Média total = 1,67 g/L.

Erro-padrão = 0,18.

TABELA XI - Valores da densidade em urina de trabalhadores do Grupo Exposto, obtidos antes e após a jornada de trabalho.

Trabalhador	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	antes	depois	antes	depois	antes	depois
1. J.D.G.L	1,022	1,027	1,019	1,021	1,022	1,022
2. D.A.B.J	1,021	1,024	1,018	1,024	1,022	1,020
3. J.L.G.H	1,025	1,028	1,026	1,020	1,028	1,027
4. E.M.M.	1,020	1,023	1,022	1,028	1,021	1,026
5. J.B.W.	1,024	1,025	1,021	1,025	1,025	1,029
6. G.G.	1,030	1,030	1,028	1,030	1,029	1,030
7. A.G.	1,028	1,022	1,019	1,021	1,026	1,025
8. A.C.M.S	1,020	1,015	1,025	1,026	1,026	1,022
médias	1,024	1,024	1,022	1,024	1,025	1,025
	1,024		1,023		1,025	

Média total = 1,024.

Erro-padrão = 0,001.

TABELA XII - Valores da creatinina em urina de trabalhadores do Grupo Exposto, obtidos antes e após a jornada de trabalho.

Trabalhador	Dia 1		Dia 2		Dia 3	
	antes	depois (g/L)	antes	depois (g/L)	antes	depois (g/L)
1. J.D.G.L	1,74	2,20	1,80	2,03	2,60	2,28
2. D.A.B.J	1,82	1,98	1,68	2,00	2,36	2,21
3. J.L.G.H	1,68	1,83	1,90	1,37	2,76	2,39
4. E.M.M.	1,94	2,03	1,25	1,64	1,68	2,00
5. J.B.W.	2,15	2,50	1,00	1,53	1,70	2,03
6. G.G.	1,00	0,92	0,68	0,84	1,03	1,28
7. A.G.	2,84	1,92	1,56	1,72	2,44	2,36
8. A.C.M.S	1,72	2,04	1,36	1,73	1,52	1,00
médias	1,86	1,93	1,40	1,61	2,01	1,94
	1,89		1,51		1,98	

Média total = 1,79 g/L.

Erro-padrão = 0,22.

5.2.2. Determinação do ácido mandélico em urina

As amostras de urina foram analisadas em duplicata. As Tabs. XIII e XIV mostram as concentrações médias de ácido mandélico encontradas nos Grupos Controle e Exposto, com o tempo de serviço de cada um dos trabalhadores.

TABELA XIII - Concentrações de ácido mandélico em urina de trabalhadores do Grupo Controle, obtidas antes e após a jornada de trabalho.

Trabalhador	Tempo serviço (anos)	Valor obtido (g/L)		Valor corrigido* (g/L)		Valor corrigido (g/g de creatinina)	
		antes	depois	antes	depois	antes	depois
1. A.C.P.S.	7	0,0083	0,0105	0,0091	0,0126	0,0038	0,0073
2. O.L.P.	16	0,0100	0,0069	0,0120	0,0083	0,0058	0,0053
3. M.D.	8	0,0117	0,0115	0,0134	0,0106	0,0069	0,0063
4. A.M.S.	14	0,0160	0,0174	0,0192	0,0167	0,0100	0,0088
5. A.C.M.	5	0,0182	0,0191	0,0151	0,0170	0,0076	0,0088
6. G.L.C.	8 **	0,0193	0,0132	0,0272	0,0158	0,0102	0,0060
7. J.C.T.	12	0,0084	0,0058	0,0134	0,0063	0,0077	0,0039
8. L.R.F.	4	0,0200	0,0168	0,0192	0,0161	0,0125	0,0105
9. J.E.O.	10	0,0074	0,0104	0,0071	0,0109	0,0047	0,0076
10. J.B.O.	17	0,0053	0,0079	0,0085	0,0086	0,0053	0,0060
médias		0,0125	0,0120	0,0144	0,0123	0,0075	0,0071
médias totais		0,0122		0,0133		0,0073	
erro-padrão		0,0024		0,0024		0,0011	

* correção pelo valor de 1,024.

** tempo de serviço em meses.

TABELA XIV - Concentrações de ácido mandélico em urina de trabalhadores do Grupo Exposto, obtidas antes e após a jornada de trabalho.

Trabalhador	Tempo serviço (anos)	Valor obtido (g/L)		Valor corrigido* (g/L)		Valor corrigido (g/g de creatinina)	
		antes	depois	antes	depois	antes	depois
1. J.D.G.L.	17	0,0319	0,0522	0,0348	0,0464	0,0183	0,0237
2. D.A.B.J.	13	0,0264	0,0304	0,0302	0,0304	0,0145	0,0154
3. J.L.G.H.	5	0,0290	0,0273	0,0278	0,0234	0,0173	0,0149
4. E.M.M.	14	0,0230	0,0281	0,0276	0,0293	0,0119	0,0138
5. J.B.W.	8 **	0,0285	0,0214	0,0285	0,0205	0,0133	0,0086
6. G.G.	13	0,0173	0,0144	0,0138	0,0115	0,0173	0,0157
7. A.G.	6 **	0,0499	0,0367	0,0428	0,0400	0,0176	0,0191
8. A.C.M.S.	3 **	0,0467	0,0401	0,0560	0,0642	0,0272	0,0197
médias dia 1		0,0316	0,0313	0,0327	0,0332	0,0172	0,0164
1		0,0137	0,0180	0,0173	0,0206	0,0076	0,0088
2		0,0173	0,0124	0,0231	0,0124	0,0103	0,0062
3		0,0144	0,0103	0,0133	0,0124	0,0076	0,0075
4		0,0220	0,0332	0,0240	0,0285	0,0176	0,0202
5		0,0103	0,0221	0,0118	0,0212	0,0102	0,0144
6		0,0063	0,0087	0,0054	0,0070	0,0093	0,0104
7		0,0221	0,0173	0,0279	0,0198	0,0142	0,0101
8		0,0373	0,0525	0,0358	0,0485	0,0274	0,0303
médias dia 2		0,0179	0,0218	0,0198	0,0210	0,0130	0,0135
1		0,0145	0,0105	0,0158	0,0115	0,0056	0,0046
2		0,0179	0,0132	0,0195	0,0158	0,0076	0,0060
3		0,0204	0,0108	0,0175	0,0096	0,0074	0,0045
4		0,0177	0,0111	0,0202	0,0102	0,0105	0,0056
5		0,0218	0,0192	0,0209	0,0159	0,0128	0,0095
6		0,0233	0,0166	0,0193	0,0133	0,0226	0,0130
7		0,0308	0,0241	0,0284	0,0231	0,0126	0,0102
8		0,0319	0,0193	0,0294	0,0211	0,0210	0,0193
médias dia 3		0,0223	0,0156	0,0214	0,0151	0,0125	0,0091
médias		0,0229	0,0239	0,0246	0,0232	0,0142	0,0130
médias totais		0,0234		0,0239		0,0136	
erro-padrão		0,0035		0,0037		0,0019.	

* correção pelo valor de 1,024.

** tempo de serviço em meses.

A Fig. 14 representa os cromatogramas relativos às amostras contendo, respectivamente, 0,0105 g/L (Grupo Controle) e 0,0401 g/L (Grupo Exposto) de ácido mandélico.

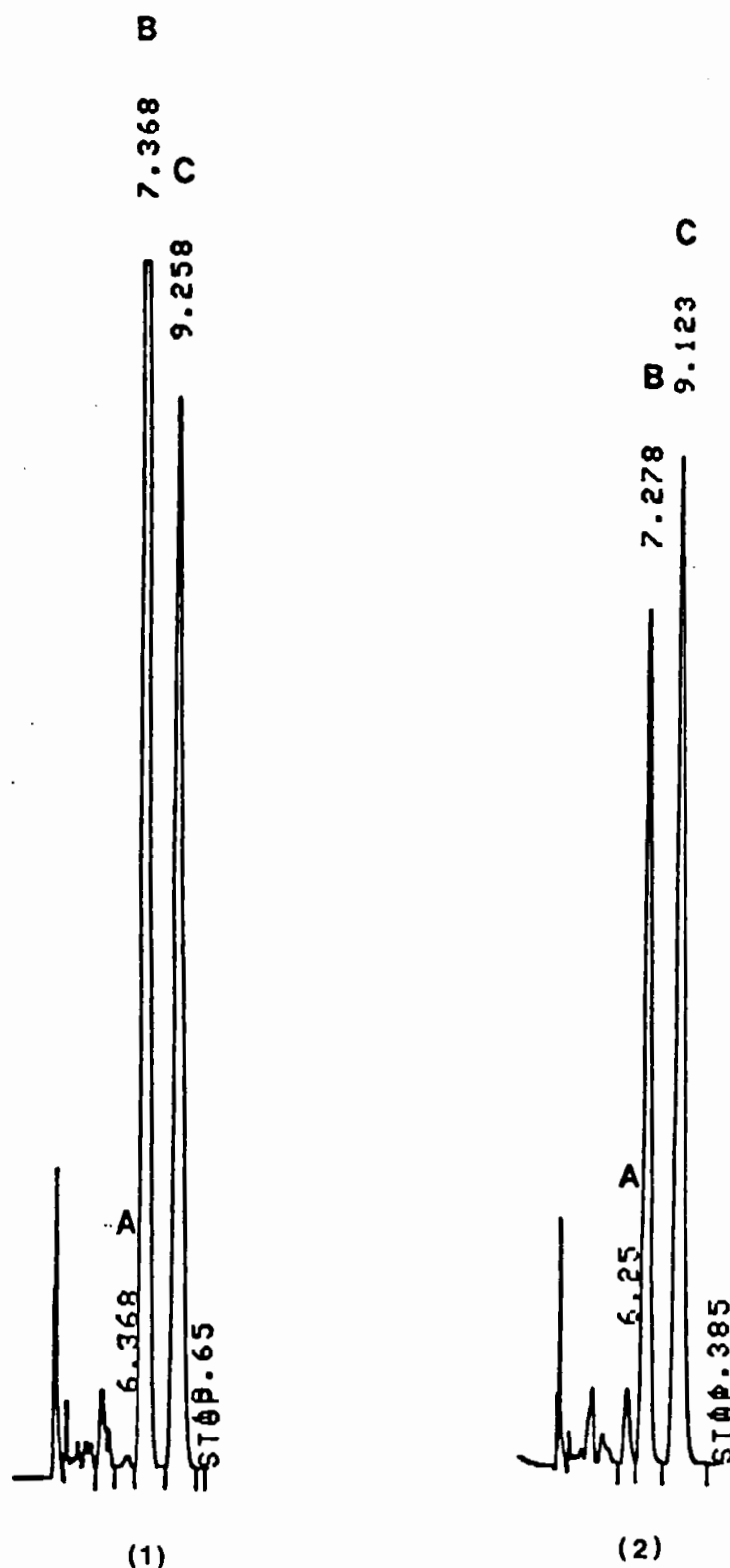


FIGURA 14 - Cromatogramas relativos às amostras de urina de trabalhadores de uma indústria de produção do monômero de estireno: (1) do Grupo Controle, contendo 0,0105 g/L e (2) do Grupo Exposto, contendo 0,0401 g/L de ácido mandélico. A = ácido mandélico; B = ácido hipúrico e C = ácido o-metilhipúrico.

Coluna = μ BondaPak[®] C₁₈ (300 3,9 mm e 10 μ m)

Fase móvel = KH₂PO₄ 5 mM (pH = 3,0) / CH₃CN 90:10

Comprimento de onda = 225 nm

Atenuação = 0,16 UAFS

5.2.3. Determinação do estireno em amostradores por difusão passiva

Os resultados fornecidos indicaram valores de exposição para os Grupos Controle e Exposto respectivamente inferiores a $1,0 \text{ mg/m}^3$ (0,2 ppm) e $1,2 \text{ mg/m}^3$ (0,3 ppm).

Foi encontrada uma concentração superior a 40000 mg/m^3 (9000 ppm) de estireno para o controle positivo forçado.

6. DISCUSSÃO

A avaliação da exposição ocupacional, tradicionalmente, sempre foi realizada através da análise de agentes químicos presentes na atmosfera do ambiente de trabalho. Durante anos, a monitorização ambiental foi utilizada como o único procedimento disponível para a prevenção de alterações biológicas significativas à saúde de trabalhadores expostos a toxicantes. Nestes últimos anos, entretanto, a monitorização biológica tem adquirido importância crescente e contínua, pois está mais diretamente relacionada aos efeitos nocivos à saúde, oferecendo uma melhor estimativa ^{4 22 66 130 131 164 258}.

Para a realização da monitorização biológica, é de fundamental importância a existência de eficientes indicadores biológicos de exposição (IBEs). Dentre os que têm sido estudados, quanto à aplicação para a avaliação biológica da exposição ocupacional ao estireno, temos o estireno no ar expirado ^{32 33 60 78 79 218}, estireno no sangue total ^{7 12 46 141 220 255 256} e os ácidos mandélico e fenilglioxílico na urina ^{7 17 19 65 71 74 75 79 98 99 101 103 106 108 109 120 161 168 184 207 216 220 255 256}. A *ACGIH* (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists*) adota índices biológicos para estes indicadores, que estão representados na Tab. XVI.

Neste trabalho não foi possível, em razão da inexequibilidade, planejar a determinação desses diferentes indicadores da *dose interna* do estireno.

A determinação do estireno no ar exalado ainda é de difícil realização por vários motivos, entre os quais, o tipo de amostra que seria mais representativa, isto é, se ar exalado misto ou ar exalado final. Além disso, existem problemas relacionados ao momento mais adequado para a colheita das amostras, agravado pelas dificuldades metodológicas encontradas em situações de exposição ocupacional ^{78 79 104}.

Apesar de Apostoli et al ⁷ considerarem que a concentração de estireno no ambiente

de trabalho tem melhor correlação com o estireno no sangue que a dos ácidos mandélico e fenilgloxílico, essa avaliação apresenta restrições, principalmente porque a colheita das amostras de sangue é realizada por técnica invasiva, somente por pessoal especializado e de menor aceitação entre os trabalhadores. Além disso, as amostras deterioram-se facilmente quando não estocadas e/ou transportadas adequadamente. A técnica de extração, contida nos métodos analíticos, requer etapas muito trabalhosas para a purificação (*clean up*) do extrato orgânico e técnicas de quantificação mais sofisticadas (cromatografia em fase gasosa e espectrofotometria de massa, cromatografia em fase gasosa com detector por captura eletrônica e *head space* 7 12 104 141 222 255 256).

TABELA XVI – Índices biológicos de exposição dos ácidos mandélico e fenilgloxílico, e estireno, de acordo com a *ACGIH* 4.

Indicador biológico	Tempo de coleta	Índice Biológico	Anotação
ácido mandélico na urina	final da jornada	1,0 g/L	A C
	(últimas 2 h de exposição)	0,8 g/g creat.	A C
ácido fenilgloxílico na urina	final da jornada	250 mg/L	A B
		240 mg/g creat.	A B
estireno no sangue	final da jornada	0,55 mg/L	D
	antes da jornada	0,02 mg/L	
estireno no ar exalado misto	durante a jornada	18 ppm	D
	antes da próxima jornada	40 ppb	D

- A Devido às amplas variações interindividuais na resposta, recomenda-se um valor médio.
 B Pode estar presente em urina de indivíduos não expostos ocupacionalmente ao toxicante.
 C Inespecíficos, porém com boa correlação entre exposição e resposta.
 D Específico, porém a interpretação quantitativa é ambígua.

Dessa forma, os ácidos mandélico e fenilglioxílico tornaram-se os indicadores mais exequíveis de serem estudados, visando a sua determinação na urina, mesmo porque constam da Norma Regulamentadora-7 da portaria nº 3214 do Ministério do Trabalho. Para o estireno, os indicadores biológicos de exposição e os respectivos limites são mostrados na Tab. XVII.

TABELA XVII - Índices biológicos de exposição para a monitorização biológica da exposição ao estireno, de acordo com a Norma Regulamentadora-7, Anexo II, da portaria nº 3214 do Ministério do Trabalho ²⁸.

indicador biológico de exposição		limite de tolerância biológico
material biológico	análise	
urina	ácido mandélico	2 g/L
urina	ácido fenilglioxílico	250 mg/L

Procedeu-se assim à localização e busca metódica de publicações pertinentes à determinação desses ácidos em urina de trabalhadores expostos ao estireno. Todavia, devido à impossibilidade de se conseguir o padrão de ácido fenilglioxílico em tempo hábil para a realização deste trabalho, sua determinação não foi incluída no objetivo e plano de trabalho.

Entre os primeiros métodos de análise desenvolvidos estão os espectrofotométricos, e neste trabalho foi realizado inicialmente um estudo da técnica espectrofotométrica do método de Ohtsuji & Ikeda ¹⁷¹, baseada na reação química inespecífica dos núcleos aromáticos presentes na urina com o reativo composto por ácido sulfúrico concentrado/formalina a 40% (100:1 v/v). Além da inconveniência da utilização desse

reativo cromogênico higroscópico, contendo ácido sulfúrico concentrado, observaram-se valores relativamente elevados de absorvância para o *branco de urina* e a reação não se completava até 1 hora após a adição do reativo (o método original recomenda esperar por 15 minutos até a leitura das absorvâncias).

Passou-se então a cogitar a determinação do ácido mandélico por cromatografia em fase gasosa. Verificou-se que por esta técnica é necessária uma modificação química deste ácido. As reações químicas envolvidas na derivação, para a determinação do ácido mandélico, são a metilação com diazometano e a silanização com organocompostos de silício 20 35 40 73 85 98 212 228 233 248 . O diazometano é uma substância que apresenta risco de explosão durante sua manipulação; e os organocompostos de silício originam o óxido de silício que se deposita no detector por ionização em chama, exigindo limpeza frequente deste a fim de evitar-se uma diminuição da sensibilidade. Há outros problemas quanto ao uso de agentes metilantes e silanizantes, tais como o tempo, temperatura e quantidade do agente para a reação de derivação se completar, necessidade de meio reacional absolutamente anidro e dificuldade na obtenção de um padrão puro do derivado. Além disso, também não foi possível conseguir esses agentes de derivação em tempo hábil para a realização deste trabalho.

Frente às inconveniências e dificuldades apresentadas, prosseguiu-se na busca de uma metodologia eficiente, optando-se pela cromatografia em fase líquida de alto desempenho (*HPLC*), técnica de separação, identificação e quantificação que dispensa a etapa de derivação química do ácido mandélico. Vários nomes têm sido usados para descrever os principais atributos da cromatografia em fase líquida: alta velocidade (*high speed*), alta eficiência (*high efficiency*), alta pressão (*high pressure*) ou alto desempenho (*high performance*). No consenso de vários autores, o termo cromatografia em fase líquida de alto desempenho parece ser o mais adequado 106 128 210 214 232 .

O método de Poggi et al ¹⁸⁵ foi o selecionado devido à disponibilidade de uma

coluna de características similares à desses autores e ao modo de operação de *fase reversa*. Foi utilizada uma coluna de fase quimicamente ligada (*bonded phase*), a μ BondaPak C₁₈ (Waters[®]). Foi adaptada uma coluna de proteção (*guard column*) de dimensões menores, mesma fase estacionária e mesmo tamanho de partículas de sílica, entre a válvula injetora e a coluna cromatográfica. Esta medida visou adsorver substâncias indesejáveis presentes no eluente e na amostra, que poderiam constituir-se em interferentes.

Objetivando-se uma boa resolução na separação cromatográfica, escolheu-se a fase móvel composta pela solução de KH₂PO₄ 5 mM (pH=3,0)/acetonitrila 90:10 (v/v). Esta fase móvel permitiu manter o pH constante e apresentou maior poder eluotrópico que a preconizada por Poggi et al ¹⁸⁵, água/acetonitrila/ácido acético 95:5:0,02 (v/v). A composição da fase móvel foi mantida constante (modo de operação isocrático) a 30°C.

A mistura extratora composta por cloreto de n-butila/isopropanol 9:1 (v/v) ¹⁸⁵ foi substituída por éter etílico/metanol 9:1 (v/v) ¹⁶⁸, de maior poder de extração, conforme observado pela área dos picos do cromatograma. O resíduo foi ressuspenso com metanol *Lichrosolv*, o que facilitou a dissolução do padrão interno. No método original utiliza-se a própria fase móvel aquosa ¹⁸⁵.

De acordo com o método de Poggi et al ¹⁸⁵, pensou-se em usar o ácido 4-hidróxi-benzóico como padrão interno. Porém não pôde ser usado, pois seu tempo de retenção coincidiu com o do ácido hipúrico normalmente presente na urina, proveniente da ingestão de frutas e da biotransformação de benzoato de sódio, aditivo de alimentos. O ácido fenilacético, mais próximo estruturalmente ao ácido mandélico, também não pôde ser utilizado, pois aparece na urina proveniente de fonte endógena (metabolismo da β -feniletilamina) e da dieta ⁹⁷. Sendo assim, foi escolhido como padrão interno o ácido o-metilhipúrico, isômero presente em quantidades pouco representativas na urina de trabalhadores expostos aos xilenos, uma vez que 97% da quantidade absorvida e

biotransformada deste toxicante é excretada como ácido m-metilhipúrico 72 76 168.

A detecção do ácido mandélico e do padrão interno foi realizada a 225 nm, baseada na Lei de Lambert Beer da espectrofotometria 168 169 170 185 .

A retenção dos solutos ocorreu dentro de um intervalo de tempo com seletividade adequada e alta eficiência, sendo necessários 15 minutos para a separação dos picos de interesse do cromatograma. O estabelecimento das condições cromatográficas poderia ser mais rápido se fosse utilizada uma estação de trabalho computacional, através da simulação com sistemas especialistas (*expert systems*) para a otimização da retenção, seletividade e eficiência 179 204 .

Para a quantificação do ácido mandélico é necessário o prévio estabelecimento dos parâmetros de desempenho (*performance characteristics*), como o intervalo de concentração coberto pelo método analítico, considerações estatísticas para estimar a magnitude das variações aleatórias (precisão), e dos erros sistemáticos (*bias*) e os limites de detecção e de quantificação (sensibilidade) 157 244 245 246 247 .

As curvas de calibração do ácido mandélico foram *parametrizadas* pelo modelo estatístico de regressão linear, $y = \alpha x + \beta$, que estabelece o incremento linear que a variável dependente y (relação de áreas) sofre em função da variável x (concentração de ácido mandélico). Uma suposição fundamental para o método dos mínimos quadrados não ponderados (regressão linear simples) é a de que cada ponto da curva de calibração, incluindo o ponto que representa o *branco de urina*, esteja sujeito a variações aleatórias apenas na direção dos valores de y (reta de y sobre x), que seguem uma distribuição normal de frequências 37 113 157 244 245 246 247 .

Há autores que discutem os aspectos teóricos da Análise Instrumental de substâncias químicas, baseando-se em recomendações da IUPAC (*International Union of*

Pure and Applied Chemistry) 157 244 245 246 247 . De acordo com estes autores, foram utilizadas considerações estatísticas para a determinação da concentração que pôde ser considerada significativamente diferente do *branco* ou do *ruído*, representada pelo limite de detecção do método analítico (0,004 g/L). Uma definição relativamente aceita em Química Analítica é que o limite de detecção seja calculado pela análise dos resíduos da curva de calibração, ou seja, a concentração de uma substância que forneça um sinal analítico igual ao do *branco*, y_b , acrescido de 2 (ou 3) desvios-padrão entre as replicatas, s_b .

Para a curva de calibração $y = \alpha.x + \beta$ obtemos as seguintes equações:

$$\left[\begin{array}{l} y_b + 2s_b = \alpha.L_d + \beta \quad : \text{equação para o limite de detecção; e} \\ y_b = \alpha.x_b + \beta \quad : \text{equação para o branco.} \end{array} \right.$$

Destas equações obtemos esta fórmula simples para calcular o limite de detecção:

$$L_d = 2s_b/\alpha + x_b \text{ onde } s_b = \text{desvio-padrão entre os valores do sinal analítico das replicatas do branco}$$

x_b = concentração média do branco de urina

L_d = limite de detecção

O limite de quantificação do método analítico foi considerado como sendo a concentração de ácido mandélico que forneceu um sinal analítico igual ao do *branco*, acrescido de 10 desvios-padrão entre as replicatas (0,006 g/L), ou seja, a menor concentração deste ácido obtida com boa precisão e ao nível de 95% de confiança:

$$L_q = 10s_b/\alpha + x_b \text{ onde } s_b = \text{desvio-padrão entre os valores do sinal analítico das replicatas do branco}$$

x_b = concentração média do branco de urina

L_q = limite de quantificação

O intervalo de concentrações da curva de calibração (0,010 a 2,5 g/L) foi determinado levando-se em consideração o limite de quantificação estabelecido, e a concentração do ácido mandélico correspondente à exposição acima do limite de tolerância biológica para o estireno (2g/L) da portaria nº 3214 do Ministério do Trabalho ²⁶, assim como de recomendações de instituições de outros países ^{4 148} e de pesquisadores ^{7 18 59 65 74 79 103 120 130 180 184 216}. As curvas de calibração do ácido mandélico em água ($y = 0,8345x + 0,0198$) e em urina do pool ($y = 0,8027x + 0,0062$) apresentaram-se praticamente sobrepostas e com boa relação linear positiva entre as variáveis x e y (Fig. 10), com valores do coeficiente de correlação respectivamente de 0,9995 e 1,0000.

BIBLIOTECA
 Faculdade de Ciências Farmacêuticas
 Universidade de São Paulo

A exatidão dos resultados analíticos pôde ser estimada através da recuperação da técnica de extração, que forneceu valores pouco inferiores aos citados por outros autores, de valor médio e desvio-padrão $98,5 \pm 4,7\%$ entre as concentrações de 0,010 a 2,5 g/L, considerado satisfatório ao objetivo do trabalho. Convém mencionar que esses autores obtiveram valores maiores que 100 % de recuperação.

Os resultados da padronização do método analítico apresentaram certa margem de variabilidade associada a diversos fatores, que muitas vezes escaparam do controle experimental. Uma estimativa da magnitude das variações aleatórias, ou indeterminadas, pôde ser avaliada após repetidas determinações, através dos coeficientes de variação intra-ensaio, que representa a *repetibilidade* do método analítico e o interensaio, que representa a *reprodutibilidade*, de valores médios 1,2 e 1,6% , respectivamente, entre as concentrações de 0,050; 1,0 e 2,5 g/L. A precisão dos resultados analíticos foi considerada satisfatória de acordo com o objetivo do trabalho. Poggi et al ¹⁸⁵ encontraram valores do coeficiente de variação menores que 2,0 % no intervalo de concentração entre 0,10 e 3,0 g/L e Ogata et al ¹⁸⁸, de 5% (0,50 a 3,0 g/L).

Para que o método analítico padronizado pudesse ser aplicado em urina de

trabalhadores expostos ao estireno, programou-se uma visita preliminar à indústria para o detalhamento da estratégia de colheita das amostras de urina e de ar do ambiente de trabalho, através do conhecimento do processo e das operações envolvidas na produção do monômero de estireno, número de indivíduos selecionados para a amostragem, tempo de exposição, ritmo de trabalho e as condições ambientais da área.

A produção do monômero de estireno, na indústria visitada, é realizada através da reação de desidrogenação catalítica do etilbenzeno com $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, vapor de água salgada a 600°C e posterior adição de enxofre em pó e t-butilcatecol como inibidores de polimerização. Após sucessivas etapas de destilação fracionada são obtidos, através de reações secundárias, parafinas de cadeias pequenas, benzeno e tolueno, além do etilbenzeno que não reagiu. O processo é contínuo, as torres de destilação encontram-se ao ar livre e os trabalhadores estão simultaneamente expostos a baixas concentrações de benzeno, tolueno e etilbenzeno, além do estireno.

São lotados pela indústria de Duque de Caxias (RJ) 8 operadores por turno alternante de 6 horas, com esforço físico leve, na área de fabricação do estireno. Para a colocação dos amostradores por difusão passiva, foram selecionados o operador que realizava o carregamento do caminhão-tanque com estireno comercial, um operador de área e um enfermeiro (turno fixo de 8 horas). As amostras de urina foram colhidas dos 8 operadores e dos 10 trabalhadores não expostos, a partir do 2º dia da semana de trabalho, conforme recomendado por Engstrom et al ⁷⁴. As amostras foram colhidas antes e após a jornada de trabalho, visando constatar uma possível variação na concentração de ácido mandélico que refletisse a absorção do estireno.

O ácido mandélico, de $\text{pK}_a = 3,4$ a 25°C , é excretado na forma livre, pois encontra-se preferencialmente na forma de mandelato no intervalo *normal* de pH urinário de 5,5 a 6,5. Considerando-se uma exposição simultânea ao estireno e ao etilbenzeno, inferiu-se que o ácido mandélico encontrado na urina dos trabalhadores foi

originário da biotransformação do estireno, pois a retenção alveolar dos vapores de etilbenzeno é de apenas 49%, e somente 23% da quantidade absorvida e biotransformada é excretada como ácido mandélico ^{76 96}. Sabe-se também que as vias de biotransformação do estireno e etilbenzeno são distintas e resultam em composição diferente de estereoisômeros ópticos do ácido mandélico. São encontrados enantiômeros nas configurações D e L para o estireno na proporção aproximada de 1:1 e apenas na configuração D para o etilbenzeno ^{61 127 238}.

BIBLIOTECA
Faculdade de Ciências Farmacéuticas
Universidade de São Paulo

Para a validação dos resultados da aplicação do método analítico, foram realizados alguns testes de significância para decidir se as diferenças encontradas entre os valores das variáveis biológicas poderiam ser atribuídas apenas a erros experimentais ou à exposição ao estireno. A hipótese de nulidade que a diferença entre 2 variáveis possa ser considerada como não significativa, foi testada com as estatísticas F de Snedecor, para comparar as variâncias entre as 2 variáveis biológicas; e a estatística t de Student, para comparar as médias, ambas ao nível de 5% de significância. O recurso utilizado para o tratamento estatístico foram os programas aplicativos PC compatíveis MicroStat[®] e StatGraphics[®]. Com um número menor que 30 observações (n), a incerteza que envolve a estimativa da média (μ) e desvio-padrão (σ) da população de todas as observações possíveis, a partir da média (\bar{x}) e desvio-padrão (s) amostrais, é dada pelo erro-padrão da média (s/\sqrt{n}) e o intervalo de confiança por $\bar{x} \pm t.s/\sqrt{n}$, onde t é a estatística de Student com n-1 graus de liberdade ¹⁵⁷.

Há controvérsias quanto à forma de expressar os resultados do indicador biológico, considerando-se que a excreção urinária de vários solutos, inclusive a do ácido mandélico, varia durante a jornada de trabalho. Alguns autores recomendam a correção pela densidade ^{7 18 79 108 180} enquanto que outros pela creatinina ^{59 65 99 100 103 120 184}. A correção pela densidade, assim como pela creatinina, é feita com o objetivo de minimizar a influência da diluição da urina, e tornar os resultados comparáveis aos obtidos de amostras colhidas durante 24 horas ¹.

A densidade é representada pela quantidade constante dos principais solutos presentes na urina, em relação à quantidade de água na qual estão dissolvidos. A creatinina, produto final do catabolismo da creatina fosfato dos músculos esqueléticos, tem sua excreção pouco afetada pela dieta, diurese e esforço físico, e a variação circadiana é mínima, sendo considerada um bom parâmetro biológico para o ajuste ^{1 3} 67 129 131 231 236 , desde que o xenobiótico não comprometa a função renal e seja depurado preferencialmente por filtração glomerular, como a creatinina.

Neste trabalho não foi possível proceder-se à determinação da densidade e da creatinina logo após a micção. Com o resfriamento das amostras de urina ocorreu a precipitação de solutos, e observou-se que os valores de densidade obtidos com ou sem homogeneização eram idênticos. Foi adicionado um volume conhecido de solução-padrão de creatinina em alíquotas de algumas amostras de urina, e constatou-se que não houve degradação significativa da creatinina em função do tempo aguardado para a análise. Sabe-se que o tempo não é um fator crítico se a amostra for armazenada por período inferior a 7 dias sob refrigeração.

A hipótese que a população de valores da densidade de média e erro-padrão da média de $1,022 \pm 0,002$ para o Grupo Controle, e a de média $1,024 \pm 0,001$ para o Grupo Exposto seguem uma distribuição normal de frequências, não pôde ser rejeitada ao nível de 95% de confiança. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os valores da densidade das amostras colhidas antes e após a jornada de trabalho ou entre os dias 1; 2 e 3. O mesmo foi observado para a creatinina, de média $1,67 \pm 0,18$ g/L para o Grupo Controle e $1,79 \pm 0,22$ g/L para o Grupo Exposto.

Encontrou-se a concentração média não corrigida de ácido mandélico e o erro-padrão da média de $0,0122 \pm 0,0024$ g/L em urina de trabalhadores não expostos ao estireno, acima do limite de quantificação do método analítico (0,0058 g/L). Não houve evidência que a diferença fosse significativa entre os valores obtidos antes e após

a jornada, e a concentração média encontrada do ácido mandélico corrigida pela densidade foi de $0,0133 \pm 0,0024$ g/L para o Grupo Controle e de $0,0239 \pm 0,0037$ g/L para o Exposto. O mesmo foi observado para a concentração média de ácido mandélico corrigida pela creatinina de valor $0,0073 \pm 0,0011$ g/g para o Grupo Controle e de $0,0136 \pm 0,0019$ g/g para o Exposto. Constatou-se que houve diferença significativa entre o primeiro dia, após 3 dias de folga, e os demais, sugerindo uma possível tendência ao estabelecimento de equilíbrio dinâmico entre a exposição ao estireno, absorção e excreção do ácido mandélico pela urina.

A correção dos valores de ácido mandélico pôde ser realizada tanto pela densidade quanto pela creatinina, pois os valores do coeficiente de correlação de Pearson (r) encontrados foram elevados, sugerindo uma boa correlação entre ambas.

Apesar de não ser considerada uma substância de origem endógena ou proveniente da ingestão de alimentos, o ácido mandélico tem sido detectado em urina de indivíduos não ocupacionalmente expostos ao estireno. A quantidade deste ácido depende da técnica de quantificação utilizada. Pela cromatografia em fase gasosa e em fase líquida de alto desempenho são encontradas concentrações de até 0,010 g/L ^{20 35 40 73 85 91 104 168 169}
170 185 212 228 233 .

Embora a utilização de um questionário aplicado à população (como o descrito em 4.1) seja considerada relevante, não foi possível realizar uma estimativa do efeito de fatores relacionados ao indivíduo e à exposição sobre as concentrações do ácido mandélico urinário. Todavia, o questionário não deve ser descartado, em procedimentos de monitorização biológica, para uma melhor interpretação dos resultados. Há também problemas relacionados aos ajustes biológicos à organização laboral em turnos, que envolvem uma dessincronização entre o ciclo sono-vigília e o ritmo circadiano da temperatura interna do trabalhador ^{28 81 82 86 213} , e sua influência na excreção do indicador biológico.

Teria sido de grande importância uma criteriosa avaliação ambiental para validar a eficiência do indicador biológico, através da análise estatística de correlação. Porém, como não houve esta possibilidade, e devido à necessidade de verificar se o estireno estava realmente presente no ambiente de trabalho e a que nível, foi realizada uma estimativa da exposição ocupacional.

A técnica convencional de coleta de vapores é feita pela utilização de bombas individuais calibradas e impíngeres ou tubos de carvão ativado. Segundo Hickey & Bishop ¹¹⁴, Harper & Purnell ¹¹² e Van Den Hoed et al ²²⁷, os amostradores por difusão passiva, em situações de exposição ocupacional, fornecem resultados que não diferem significativamente dos obtidos em atmosfera-padrão de laboratório e tampouco dos obtidos com tubos de carvão ativado, sendo muito confortáveis ao trabalhador. Na impossibilidade de serem utilizadas bombas individuais com tubos de carvão ativado, os amostradores por difusão passiva foram empregados neste estudo para a colheita dos vapores de estireno.

Os resultados obtidos, nas condições em que foi realizado, sugerem que a indústria visitada oferecia um ambiente de trabalho de baixo risco de intoxicação pelo estireno, pois a partir da estimativa da concentração ambiental deste toxicante, verificou-se que os valores encontrados estavam abaixo do limite de tolerância estabelecido pela NR-15, anexo 11 da portaria nº 3214 do Ministério do Trabalho, de 328 mg/m³ (78 ppm) para até 48 horas semanais ²⁷ e do TLV-TWA (*threshold limit value-time weighted average*) adotado pela ACGIH ⁴, de 213 mg/m³ (50 ppm) para jornadas de trabalho de 40 horas semanais. Além disso esses valores estavam abaixo do nível de ação †, e este fato, segundo o NIOSH ¹⁶⁴, permite supor que a probabilidade do limite de tolerância ser excedido durante outras jornadas de trabalho é pequena. As concentrações

† o nível de ação corresponde à metade do valor do limite de tolerância-média ponderada no tempo ⁴ ¹⁶⁴.

de ácido mandélico urinário encontradas estavam abaixo do limite de tolerância biológico, e os trabalhadores, que não utilizavam equipamento de proteção respiratória na época da colheita das amostras, não relataram qualquer queixa relacionada ao seu estado de saúde.

7. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos da padronização e aplicação do método analítico, pode ser concluído que:

- o método analítico forneceu resultados de boa precisão e exatidão, expressas, respectivamente, pelos coeficientes de variação intra-ensaio (CV_{intra}) e interensaio (CV_{inter}) e pela recuperação da técnica de extração (REC), com valores médios em percentagem e desvio-padrão de :

$$CV_{intra} = 1,2 \pm 0,3\% \text{ para as concentrações de } 0,050; 1,0 \text{ e } 2,5 \text{ g/L}$$

$$CV_{inter} = 1,6 \pm 0,5\% \text{ para as concentrações de } 0,050; 1,0 \text{ e } 2,5 \text{ g/L}$$

$$REC = 98,5 \pm 4,7\% \text{ para as concentrações de } 0,010 \text{ a } 2,5 \text{ g/L;}$$

- a diferença entre a quantidade de ácido mandélico, corrigida tanto pela densidade de 1,024 quanto pela creatinina, presente em amostras de urina colhidas antes e após a jornada de trabalho, não foi significativa ao nível de 5%, de valor médio e erro-padrão da média de:

. para o Grupo Controle (n = 10)

$$\text{antes da jornada} \quad 0,0144 \pm 0,0044 \text{ g/L} \quad \text{e} \quad 0,0075 \pm 0,0020 \text{ g/g}$$

$$\text{após a jornada} \quad 0,0123 \pm 0,0028 \text{ g/L} \quad \text{e} \quad 0,0071 \pm 0,0014 \text{ g/g}$$

. para o Grupo Exposto (n = 24)

$$\text{antes da jornada} \quad 0,0246 \pm 0,0046 \text{ g/L} \quad \text{e} \quad 0,0142 \pm 0,0026 \text{ g/g}$$

$$\text{após a jornada} \quad 0,0232 \pm 0,0029 \text{ g/L} \quad \text{e} \quad 0,0130 \pm 0,0028 \text{ g/g;}$$

- A diferença entre a quantidade de ácido mandélico, corrigida tanto pela densidade quanto pela creatinina, presente em urina de trabalhadores expostos e de não expostos ao estireno, foi significativa ao nível de 5%:

. para o Grupo Controle (n = 20)

$$0,0133 \pm 0,0024 \text{ g/L e } 0,0073 \pm 0,0011 \text{ g/g}$$

. para o Grupo Exposto (n = 48)

$$0,0239 \pm 0,0037 \text{ g/L e } 0,0136 \pm 0,0019 \text{ g/g;}$$

- Pela aplicação do coeficiente de Pearson, a quantidade de ácido mandélico presente na urina pôde ser expressa tanto pela densidade de 1,024 quanto pela creatinina urinária, pois foram observados elevados valores do coeficiente entre as duas variáveis biológicas, estando, pois, muito correlacionadas;

- O método analítico padronizado pode ser aplicado, com confiança, para a monitorização biológica da exposição ocupacional ao estireno, mesmo em condições de baixa exposição, refletida nas pequenas quantidades de ácido mandélico na urina.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS (*)

1. AITIO, A. & JARVISALO, J. - Collection, processing and storage of specimens for biological monitoring of occupational exposure to toxic chemicals. *Pure Appl. Chem.*, London, 56 (4): 549-566, 1984.
2. ALENCASTRO, R.B. & MANO, E. - *Nomenclatura de compostos orgânicos*. Rio de Janeiro, Guanabara, 1987. 271p.
3. ALESSIO, L.; BERLIN, A.; DELL'ORTO, A. ; TOFFOLETTO, F.; GHEZZI, I. Reliability of urinary creatinine as a parameter used to adjust values of urinary biological indicators. - *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. Berlin, 55 (2): 99-106, 1985.
4. AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS. - *Threshold limit values and biological indices for 1989-1990*. Cincinnati, 1989. 124p.
5. ANDERSEN, M.E.; MAGNAUGHTON, M.G.; CLEWELL, H.J.; PAUSTENBACH, D.J. - Adjusting exposure limits for long and short exposure periods using a physiological pharmacokinetic model. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, 48 (4): 335-343, 1987.
6. ANDREWS, L.S. & SNYDER, R. - Toxic effects of solvents and vapors. In: KLAASSEN, C.D.; AMDUR, M.D.; DOULL, J., eds. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. 3.ed. New York, MacMillan, 1986. p.636-668.
7. APOSTOLI, P.; BRUGNONE, F.; PERBELLINI, L.; COCCEO, V.; BELLOMO, M.L.; SILVESTRI, R. - Occupational styrene exposure environmental and biological monitoring. *Am. J. Ind. Med.*, New York, 4 (6): 741-754, 1983.
8. ARFINI, G.; MUTTI, A.; VESCOVI, P.; FERRONI, C.; FERRARI, M.; GIAROLI, C.; PASSERI, M.; FRANCHINI, I. Impaired dopaminergic modulation of pituitary secretion in workers occupationally exposed to styrene: further evidence from PRL response to TRH stimulation. *J. Occup. Med.*, Chicago, 29 (10): 826-830, 1987.

(*) - De acordo com a NB 66/78 preconizada pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT). As abreviaturas dos títulos dos periódicos seguem o *Chemical Abstracts Service Source Index (CASSI)*, Columbus, 1990.

Estes periódicos (†) ou volumes e/ou fascículos (‡) não foram localizados no país através do Catálogo Coletivo Nacional, e as separatas dos artigos foram gentilmente enviadas pelos respectivos autores ou adquiridas pelo *The British Library Document Supply Centre*.

9. ARGERER, N. - Biological monitoring of workers exposed to organic solvents: past and present. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 11 (supl 1): 45-52, 1985.
10. ARIENS, E.J.; SIMONIS, A.M.; OFFERMEIER, J., eds. *Introduction to general toxicology*. New York, Academic Press, 1976. 252p.
11. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA QUÍMICA E DE DERIVADOS (ABIQUIM). *Anuário da indústria química brasileira 1989*. São Paulo, 1989. 272p.
12. ASTRAND, I. - Uptake of solvents in the blood and tissue of man: a review. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 1: 199-218, 1975.
13. ATHERLEY, G. - A critical review of time-weighted average as an index of exposure and dose, and of its key elements. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, 46 (9): 481-487, 1985.
14. AXELSON, O. & GUSTAVSON, J. - Some hygienic and clinical observations on styrene exposure. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (supl 2): 215-219, 1978.
15. BAGGET, M.S.; MORIA, G.P.; SIMMONS, M.W.; LEWIS, J.S. - Quantitative determination of semi-volatile compounds in cigarette smoke. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, 97: 79-82, 1974.
16. BAKER, E.L.; SMITH, T.J.; LANDRIGAN, P.J. - The neurotoxicity of industrial solvents: a review of the literature. *Am. J. Ind. Med.*, New York, 8 (3): 207-217, 1985.
17. BARDODEJ, Z. - Styrene, its metabolism and the evaluation of hazards in industry. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (supl 2): 95-103, 1978.
18. BARDODEJ, Z. & BARDODEJOVA, E. - Biotransformation of ethylbenzene, styrene, and α -methylstyrene in man. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, 31 (2): 206-209, 1970.
19. BARTOLUCCI, G.B.; BRIGHENTI, F.; VALENTINI, F.; GORI, G.P.; DE ROSA, E. - Esposizione professionale a stirene nell'industria del mobile. *Med. Lav.*, Milan, 76 (2): 157-165, 1985.
20. BAUER, D. & GUILLEMIN, M.P. - Human exposure to styrene. I. The gas chromatographic determination of urinary phenylglyoxilic acid using diazomethane derivatization. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, 37 (1): 47-55, 1976.

21. BEIJE, B. & JENSSEN, D. - Investigation of styrene in the liver perfusion/cell culture system. No indication of styrene 7,8 oxide as the principal mutagenic metabolite produced by the intact rat liver. *Chem. Biol. Interact.*, Shannon, 39 (1): 57-76, 1982.
22. BERNARD, A. & LAUWERYS, R. - Present status and trends in biological monitoring of exposure to industrial chemicals. *J. Occup. Med.*, Chicago, 28 (8): 558-562, 1986.
23. BERODE, M.; DROZ, P.O.; GUILLEMIN, M.P. - Human exposure to styrene. VI. Percutaneous absorption in humans volunteers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, 55 (4): 331-336, 1985.
24. BERODE, M.; DROZ, P.O.; BOILLAT, M.A.; GUILLEMIN, M.P. - Effect of alcohol on the kinetics of styrene and its metabolites in volunteers and in workers. *Appl. Ind. Hyg.*, Cincinnati, 1(1): 25-28, 1986 † .
25. BIENIEK, G.; PALYS, E.; WILCZOK, T. - TLC separation of hippuric, mandelic, and phenylglyoxilic acids from urine after mixed exposure to toluene and styrene. *Br. J. Ind. Med.*, London, 39 (2): 187-190, 1982.
26. BRASIL. Ministério do Trabalho. Secretaria de Segurança, Higiene e Medicina do Trabalho. NR-7 - Exame médico. In: _____ . *Segurança e medicina do trabalho: Lei n° 6514, de 22 de dezembro de 1977, normas regulamentadoras (NR) aprovadas pela portaria n° 3214, de 8 de junho de 1978.* 18.ed. São Paulo, Atlas, 1990. p.69-76 (Manuais de legislação atlas, 16).
27. BRASIL. Ministério do Trabalho. Secretaria de Segurança, Higiene e Medicina do Trabalho. NR-15 - Atividades insalubres. In: _____ . *Segurança e medicina do trabalho: Lei n° 6514, de 22 de dezembro de 1977, normas regulamentadoras (NR) aprovadas pela portaria n° 3214, de 8 de junho de 1978.* 18.ed. São Paulo, Atlas, 1990. p.94-189 (Manuais de legislação atlas, 16).
28. BRIEF, R.S. & SCALA, R.A. - Occupational health aspects of unusual work schedules: a review of Exxon's experiences. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, 47 (4): 199-202, 1986.
29. BRIGHAM, C.R. & LANDRIGAN, P.J. - Safety and health in boatbuilding and repair. *Am. J. Ind. Med.*, New York, 8 (3): 169-182, 1985.
30. BROOKS, S.M.; ANDERSON, L.; EMMETT, E.; CARSON, A.; TSAY, J.Y.; ELIA, V.; BUNCHEER, R.; KARBOWSKY, R. - The effects of protective equipment on styrene exposure in workers in the reinforced plastics industry. *Arch. Environ. Health*, Chicago, 35 (5): 287-294, 1980.
31. BROWN, R.H.; SAUNDERS, K.J.; WALKIN, K.T. - Personal sampling method for the determination of styrene exposure. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, 48 (9): 760-765, 1987.

32. BRUGNONE, F.; PERBELLINI, I.; GAFFURI, E.; APOSTOLI, P. - Biomonitoring of industrial solvent exposures in workers's alveolar air. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, 47 (3): 245-261, 1980.
33. BRUGNONE, F.; PERBELLINI, L.; APOSTOLI, P. - L'aria alveolar nel monitoraggio dell'esposizione industriale a composti chimici volatili. *Med. Lav.*, Milan, 74 (1): 1-12, 1983.
34. BRUGNONE, F.; PERBELLINI, L.; FACCINI, G.B.; PASINI, F.; MARANELLI, G.; ROMEO, L.; GOBBI, M.; ZEDDE, A. - Breath and blood levels of benzene, toluene, cumene and styrene in non-occupational exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, 61 (5): 303-311, 1989.
35. BUCHET, J.P.; LAUWERYS, R.; ROELS, H. - Évaluation de l'exposition des travailleurs au styrène par le dosage de ses métabolites urinaires: les acides mandélique et phénylglyoxylique. - *Arch. Mal. Prof. Med. Trav. Secur. Soc.*, Paris, 35 (4-5): 511-516, 1974.
36. BUS, J.S. & GIBSON, L.E. - Body defense mechanism to toxicant exposure. In: CRALLEY, L.J. & CRALLEY, L.V.L., eds. *Patty's industrial hygiene and toxicology*. 2.ed. New York, Wiley Interscience, 1985. v.3B, p.143-174.
37. BUSSAB, W.O. & MORATTIN, P.A. - *Estatística básica*. 4.ed. São Paulo, Atual, 1987. 319p.
38. CAMBAR, J.; DORIAN, C.; CAL, J.C. - Chronobiologie et physiopathologie rénale. *Pathol. Biol.*, Paris, 35 (6): 977-984, 1987.
39. CANTONI, L.; SALMONA, M.; FACCHINETTI, T.; PANTAROTTO, C.; BELVEDERE, G. - Hepatic and extrahepatic formation and hydration of styrene oxide *in vitro* and animals of different species and sex. *Toxicol. Lett.*, Amsterdam, 2: 179-186, 1978.
40. CAPEROS, J.R. & FERNÁNDEZ, J.G. - Dosage des acides mandélique et phénylglyoxilique dans l'urine par chromatographie en phase gazeuse. *Arch. Mal. Prof. Med. Trav. Secur. Soc.*, Paris, 37 (4-5): 387-391, 1976.
41. CAPEROS, J.R. HUMBERT, B.; DROZ, P.O. - Exposition au styrène. II. Bilan de l'absorption, de l'excrétion et du métabolisme sur des sujets humains. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, 42: 223-230, 1979 †.
42. CARLSSON, A. - Distribution and elimination of C¹⁴ styrene in rats. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 7 (10): 45-50, 1981.
43. CHAKRABARTI, S.J. - New Fluorometric analysis of mandelic and phenylglyoxylic acids in urine as an index to styrene exposure. *Clin. Chem.*, Winston-Salem, 25 (4): 592-595, 1979.

44. CHECKOWAY, H. & WILLIAMS, T.M. - A hematological survey of workers at a styrene-butadiene synthetic rubber manufacturing plant. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, 43 (3): 164-169, 1982.
45. CHECKOWAY, H.; DEMENT, J.M.; FOWLER, D.P.; HARRIS, R.L. LAMM, S.H.; SMITH, T.J. - Industrial hygiene involvement in occupational epidemiology. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, 48 (6): 515-523, 1987.
46. CHERRY, N.; WALDRON, H.A.; WELLS, G.G.; WILKINSON, R.T.; WILSON, H.K.; JONES, S. - An investigation of the acute behavioural effects of styrene on factory workers. *Br. J. Ind. Med.*, London, 37 (3): 234-240, 1980.
47. CHERRY, N.; RODGERS, B.; VENABLES, H.; WALDRON, H.A.; WELLS, G.G. - Acute behavioural effects of styrene exposure: a further analysis. *Br. J. Ind. Med.*, London, 38 (4): 346-350, 1981.
48. CHERRY, N. & GAUTRIN, D. - Neurotoxic effects of styrene: further evidence. *Br. J. Ind. Med.*, London, 47 (1): 29-37, 1990.
49. CHMIELEWSKI, J. & RENKE, W. - Clinical and experimental studies on the pathogenesis of toxic effects of styrene. II. The effect of styrene on the respiratory system. *Bull. Inst. Mar. Trop. Med.*, Danzig, 26: 299-302, 1975.
50. COGGON, D.; OSMOND, C.; PANNETT, B.; SIMMONOS, S.; WINTER, P.D.; ACHESON, E.D. Mortality of workers exposed to styrene in the manufacture of glass-reinforced plastics. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 13 (2): 94-99, 1987.
51. CRANDALL, M.S. & HARTLE, R.W. - An analysis of exposure to styrene in the reinforced plasticboat-making industry. *Am. J. Ind. Med.*, New York, 8 (3) : 183-192, 1985.
52. DESGAGNE, M. & BELANGER, P.M. - Chronohepatotoxicity of styrene in rat. *Annu. Rev. Chronopharmacol.*, Oxford, 3: 103-105, 1986.
53. DI BOSCO, M.M. & IACENNA, V.E. - Patologia da stirene. *Arch. Sci. Lav.*, Rome, 3: 317-334, 1987.
54. DOLARA, P.; LODOVICI, M.; SALVADORI, M.; SANTONI, G.; CADERNI, G. - Enzyme induction in humans exposed to styrene. *Ann. Occup. Hyg.*, London, 27 (2): 183-186, 1983.
55. DOLARA, P.; CADERNI, G.; LODOVICI, M.; SANTONI, G.; SALVADORI, M. - Determination of styrene in the urine of workers manufacturing polystyrene plastics. *Ann. Occup. Hyg.*, London, 28 (2): 195: 199, 1984.

56. DOLMIERSKI, R.; SZCZEPANIK, M.; DANIELEWICZ-GARBALINSKA, G.; KUNIKOWSKA, D.; MICKIEWICZ, W.; CHOMICZ, M.; GLONICKA, R. - Mutagenic action of styrene and its metabolites. 1. Chromosome aberration in persons exposed to the action of styrene. *Bull. Inst. Mar. Trop. Med., Danzig*, 34: 89-93, 1983.
57. DOSSING, M. - Antipyrine clearance during occupational exposure to styrene. *Br. J. Ind. Med.*, London, 40 (2): 224-228, 1983.
58. DROZ, P.O. & FERNÁNDEZ, J.G. - Effect of physical workload on retention and metabolism of inhaled organic solvents. *Int. Arch. Occup. Environ Health*, Berlin, 38: 231-246, 1977†.
59. DROZ, P.O. & GUILLEMIN, M.P. - Human styrene exposure. V. Development of a model for biological monitoring. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, 53 (1): 19-36, 1983.
60. DROZ, P.O. & GUILLEMIN, M.P. - Occupational exposure monitoring using breath analysis. *J. Occup. Med.*, Chicago, 28 (8): 593-606, 1986.
61. DRUMMOND, L.; CALDWELL, J.; WILSON, H.K. - The metabolism of ethylbenzene and styrene to mandelic acid: stereochemical considerations. *Xenobiotica*, London, 19 (2): 199-207, 1989.
62. DUTKIEWICZ, T. & TYRAS, H. - Skin absorption of toluene, styrene, and xylene by man. *Br. J. Ind. Med.*, London, 25 (3): 243, 1968.
63. EDLING, C. & TAGESSON, C. - Raised serum bile acid concentrations after occupational exposure to styrene: a possible sign of hepatotoxicity? *Br. J. Ind. Med.*, London, 41 (2): 257-259, 1984.
64. EDLING, C.; EKBERG, K.; AHLBORG JR., G.; ALEXANDERSSON, R.; BARREGARD, L.; EKENVALL, L.; NILSSON, L.; SVENSSON, B.G. - Long term follow up of workers exposed to solvents. *Br. J. Ind. Med.*, London, 47 (2): 75-82, 1990.
65. ELIA, V.J.; ANDERSON, L.A.; MACDONALD, T.J.; CARSON, A.; BUNCHEER, C.R.; BROOKS, S.M. Determination of urinary metabolites in styrene exposed workers and a control population. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, 41 (12): 922-926, 1980.
66. ELINDER, C.G. & VESTERBERG, D. - Environmental and biological monitoring. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 11 (supl 1): 91-103, 1985.
67. ELKINS, H.B.; PAGNOTTO, L.D.; SMITH, H.L. - Concentration adjustments in urinalysis. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, 35 (9): 559-565, 1974.

68. ENCYCLOPAEDIA of occupational health and safety. 3.ed. Geneva, International Labour Office, 1983. v.2, p.2113-2115.
69. ENGSTROM, J. - Styrene in subcutaneous adipose tissue after experimental and industrial exposure. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (supl 2): 119-120, 1978.
70. ENGSTROM, J.; ASTRAND, I.; WIGAEUS, R. - Exposure to styrene in a polymerization plant: uptake in the organism and concentration in subcutaneous adipose tissue. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (4): 324-329, 1978.
71. ENGSTROM, J.; BJURSTROM, R; ASTRAND, I.; OKUN, P. - Uptake, distribution and elimination of styrene in man: concentration in subcutaneous adipose tissue. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (4): 315-323, 1978.
72. ENGSTROM, K. - Urinalysis of minor metabolites of ethylbenzene and m-xylene. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 10 (2): 75-81, 1984.
73. ENGSTROM, K. & RANTANEN, J. - A new gas chromatographic method for determination of mandelic acid in urine. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, 33: 163-167, 1974.
74. ENGSTROM, K.; HARKONEN, H.; KALLIOKOSKI, P.; RANTANEN, J. - Urinary mandelic acid concentration after occupational exposure to styrene and its use as a biological exposure test. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 2(1): 21-26, 1976.
75. ENGSTROM, K.; HARKONEN, H.; PEKAR, K.; RANTANEN, J. - Evaluation of occupational styrene exposure by ambient air and urine analysis. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (supl 2): 121-123, 1978.
76. ENGSTROM, K.; RIIHIMAKI, V.; LAINE, A. - Urinary disposition of ethylbenzene and m-xylene in man following separate and combined exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, 54 (4): 355-363, 1984.
77. ENTERLINE, P.E. - Detecting disease produced by occupational exposure. In: CRALLEY, L.J. & CRALLEY, L.V.L., eds. *Patty's industrial hygiene and toxicology*. 2.ed. New York, Willey Interscience, 1985. v.3A, p.73-93.
78. FERNÁNDEZ, J.G. & CAPEROS, J.R. - Exposition au styrène. I. Etude expérimentale de l'absorption pulmonaires sur des sujets humains. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, 40 (1): 1-12, 1977 †.
79. FIELDS, R.L. & HORSTMAN, S.W. - Biomonitoring of industrial exposures. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, 40 (6): 451-459, 1979.

80. FINLEY, J.W. & WHITE, J.C. - Two methods to determine if styrene monomer is present in milk. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, New York, 2: 41-46, 1967.
81. FISCHER, F.M.; BENEDITO-SILVA, A.A.; MARQUES, N.; ABDALLA, D.S.; HIRATA, M.; MORENO, C.R.C.; CIPOLLA-NETTO, J.; MENNA-BARRETO, L. - Biological aspects and self evaluation of shiftwork adaptation. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, 61 (6): 379-384, 1989.
82. FISCHER, F.M.; GOMES, J.R.; COLACIOPPO, S. - Tópicos de saúde do trabalhador. São Paulo, Hucitec, 1989. 239p.
83. FISEROVA-BERGEROVA, V. Toxicokinetics of organic solvents. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 11 (supl 1): 7-21, 1985.
84. FLEIG, I. & THEISS, A.M. - Mutagenicity study of workers employed in the styrene and polystyrene processing and manufacturing industry. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (supl 2): 254-258, 1978.
85. FLEK, J. & SEDIVEC, V. - Simultaneous gas chromatographic determination of urinary mandelic and phenylglyoxilic acids using diazomethane derivatization. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, 45 (2): 181-188, 1980.
86. FOLKARD, S.; MINORS, D.S.; WATERHOUSE, J.M. - Chronobiology and shiftwork: current issues and trends. *Chronobiologia*, Milan, 12 (1): 31-54, 1985.
87. FORATTINI, O.P. - *Epidemiologia geral*. São Paulo, Artes Médicas, 1986. 259p.
88. FRANCHINI, I.; CAVATORTA, A.; FALZOI, M.; LUCERTINI, S.; MUTTI, A. - Early indicators of renal damage in workers exposed to organic solvents. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, 52 (1): 1-9, 1983.
89. FRANCO, G. Acidi biliari nel siero: un nuovo indicatore di funzione epatica nell'esposizione occupazionale a xenobiotici ? *Med. Lav.*, Milan, 79 (2): 91-99, 1988.
90. FRENTZEL-BEYME, R.; THIESS, A.M.; WIELAND, R. - Survey of mortality among employees engaged in the manufacture of styrene and polystyrene at the Basf Ludwigshafen workers. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (supl 2): 231-239, 1978.
91. GAETANI, E.; LAURERI, C.F.; VITTO, M.; FALZOI, M. ; MUTTI, A. - Determinazione quantitativa nelle urine dei metaboliti dello stirene, acido mandelico ed acido fenilgliossilico, mediante cromatografia liquida ad alta pressione. *Med. Lav.*, Milan, 73 (4): 408-411, 1982.

92. GAMBERALE, F. - Use of behavioural performance tests in the assessment of solvent toxicity. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 11 (supl 1): 65-74, 1985.
93. GANONG, W.F. - *Fisiologia médica*. 5ed. São Paulo, Atheneu, 1989. 680p.
94. GHITTORI, S.; IMBRIANI, M.; PEZZAGNO, G.; CAPODAGLIO, E. - The urinary concentration of solvents as a biological indicator of exposure: proposal for the biological equivalent exposure limit for nine solvents. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, 48 (9): 786-790, 1987.
95. GOBBATO, F.; COLLE, B.; FERIGO, G.; DE MARCHI, D.; LO GRECO, P. - Osservazioni sulla cinetica di escrezione dell'acido mandelico durante il fine settimana in operaie esposte allo stirene. *Med. Lav.*, Milan, 74 (3): 173-181, 1983.
96. GROMIEC, J.P. & PIOTROWSKI, J.K. - Urinary mandelic acid as an exposure test for ethylbenzene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, 55 (1): 61-72, 1984.
97. GROSSI, G.; MONDINI, L.; BRUNO, W.; STELLA, S. - Urinary phenylacetic acid determination by HPLC. *Chromatographia*, Braunschweig, 26: 142-144, 1988.
98. GUILLEMIN, M.P. & BAUER, D. - Human exposure to styrene. II. Quantitative and specific gas chromatographic analysis as an index of styrene exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, 37 (1): 57-64, 1976 †.
99. GUILLEMIN, M.P. & BAUER, D. - Biological monitoring of exposure to styrene by analysis of combined urinary mandelic and phenylglyoxilic acids. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, 39 (11): 873-879, 1978.
100. GUILLEMIN, M.P.; BAUER, D.; HOTZ, P.A.; LOB, M.; GREUTER, W.F. - Monitoring of styrene exposure in the polyester industry. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (supl 2): 14-21, 1978.
101. GUILLEMIN, M.P. & BAUER, D. - Human exposure to styrene. III. Elimination kinetics of urinary mandelic and phenylglyoxilic acids after single experimental exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, 44 (4): 249-263, 1979.
102. GUILLEMIN, M.P. & BAUER, D. - Delayed excretion of urinary metabolites after styrene exposure: fact or artifact ? *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 6 (2): 158-160, 1980.
103. GUILLEMIN, M.P.; BAUER, D.; MARTIN, B.; MARAZZI, A. - Human exposure to styrene. IV. Industrial hygiene investigations and biological monitoring in the polyester industry. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, 51 (2): 130-150, 1982.

104. GUILLEMIN, M.P. & BERODE, M. - Biological monitoring of styrene: a review. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, 49 (10): 497-505, 1988.
105. HAGMAR, L.; HOGSTEDT, B.; WELINDER, H.; KARLSSON, A.; RASSNER, F. - Cytogenetic and hematological effects in plastic workers exposed to styrene. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 15 (2): 136-141, 1989.
106. HAMILTON, R.J. & SEWELL, P.A. eds. - Introduction to high performance liquid chromatography. London, Chapman and Hall, 1982. 248p.
107. HARKONEN, H. - Styrene, its experimental and clinical toxicology. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (supl 2): 104-113, 1978.
108. HARKONEN, H.; KALLIOKOSKI, P.; HIETALA, S.; HERNBERG, S. - Concentrations of mandelic and phenylglyoxilic acid in urine as indicators of styrene exposure. *Work Environ. Health*, Helsinki, 11: 162-165, 1974 †.
109. HARKONEN, H.; LINDSTROM, K.; SEPPALAINEN, A.M.; ASP, S.; HERNBERG, S. - Exposure-response relationship between exposure and central nervous functions. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (1): 53-59, 1978.
110. HARKONEN, H. & HOLMBERG, P.C. - Obstetric histories of women occupationally exposed to styrene. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 8 (1): 74-77, 1982.
111. HARKONEN, H.; LEHTNIEMI, A.; AITIO, A. - Styrene exposure and the liver. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 10 (1): 59-61, 1984.
112. HARPER, M. & PURNELL, C.J. - Diffusive sampling: a review. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, 48 (3): 214-218, 1987.
113. HEATH, O.V.S. - *A estatística na pesquisa científica*. São Paulo, EDUSP, 1981. v.1, 95p.
114. HICKEY, J.L.S. & BISHOP, C.C - Field comparison of charcoal tubes and passive vapor monitor with mixed organic vapors. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, 42 (4): 264-267, 1981.
115. HODGSON, J.T. & JONES, R.D. - Mortality of styrene production, polymerization and processing workers at a site in northwest England. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 11. (5): 347-352, 1985.
116. HOGSTEDT, B.; AKESSON, B.; AXELL, K.; GULBERG, B.; MITELMAN, F.; PERO, R.W.; SKERFVING, S.; WELINDER, H. - Increased frequency of lymphocyte micronuclei in workers producing reinforced polyester resin with low exposure to styrene. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 9 (3): 241-246, 1983.

117. HOTZ, P.; GUILLEMIN, M.P.; LOI, M. - Study of some hepatic effects (induction and toxicity) caused by occupational exposure to styrene in the polyester industry. *Scand. J. Work Environ. Health, Helsinki*, 6 (3): 206-215, 1980.
118. HUSAIN, R.; SRIVASTAVA, S.P.; SETH, P.K. - Some behavioural effects of early styrene intoxication in experimental animals. *Arch. Toxicol., Berlin*, 57 (1): 53-55, 1985.
119. IKEDA, M. & HIRAYAMA, T. - Possible metabolic interaction of styrene with organic solvents. - *Scand. J. Work Environ. Health, Helsinki*, 4 (supl 2): 41-46, 1978.
120. IKEDA, M.; KOIZUMI, A.; MIYASAKA, M.; WATANABE, T. - Styrene exposure and biologic monitoring in FRP boat production plants. *Int. Arch. Occup. Environ. Health, Berlin*, 49 (3-4): 325-339, 1982.
121. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). Some monomers, plastics and synthetics elastomers, and acrolein. Lyons, 1979. p.231-274. [Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to human. v.19].
122. JABLONICKÁ, A.; KARELOVÁ, J.; POLÁKOVÁ, H.; VARGOVÁ, M.- Analysis of chromosomes in peripheral blood lymphocytes of styrene exposed workers. *Mutat. Res., Amsterdam*, 206 (2): 167-169, 1988.
123. JEDRYCHOWSKI, W. - Styrene and methyl methacrylate in the industrial environment as a risk factor of chronic obstructive lung disease. *Int. Arch. Occup. Environ. Health, Berlin*, 51 (2): 151-157, 1982.
124. KALLIOKOSKI, P.J.; SAAMANEN, A.J.; IVALO, L.M.; KOKOTTI, H.M. - Exposure to styrene can be controlled. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J., Akron*, 49 (1): 6-9, 1988.
125. KLAASSEN, C.D. - Distribution, excretion and absorption of toxicants. In: KLAASSEN, C.D.; AMDUR, M.D.; DOULL, J., eds. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. 3.ed. New York, MacMillan, 1986. p.33-63.
126. KOIZUMI, A.T.; SEKIGUCHI, T.; KONNO, M.; IKEDA, M. - Evaluation of the time-weighted average of air contaminants with special references to concentration fluctuation and biological half-time. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J., Akron*, 41 (10): 693-699, 1980.
127. KORN, M.; WODARZ, R.; SCHOKNECHT, W.; WEICHARDT, H.; BAYER, E. - Styrene metabolism in man: gas chromatographic separation of mandelic acid enantiomers in the urine of exposed persons. *Arch. Toxicol., Berlin*, 55 (1): 59-63, 1984.

128. KRSTULOVIC, A.M. & BROWN, P.R. eds. - Reversed-phase high performance liquid chromatography. New York, John Wiley, 1982. 296p.
129. LAUWERYS, R. - Individual chemical exposure guidelines for biological monitoring. Paris, Biomedical, 1983. p.1-8.
130. LAUWERYS, R. - Occupational toxicology. In: KLAASSEN, C.D.; AMDUR, M.D.; DOULL, J. eds. Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons. 3ed. New York, MacMillan, 1986, p.902-916.
131. LAUWERYS, R. & BERNARD, A. La surveillance biologique de l'exposition aux toxiques industriels: position actuelle et perspectives de développement. Scand. J. Work Environ. Health, Helsinki, 11 (3): 155-164, 1985.
132. LEMASTER, G.K.; CARSON, A.; SAMUELS, S.J. - Occupational styrene exposure for twelve product categories in the reinforced plastic industry. Am. Ind. Hyg. Assoc. J., Akron, 46 (8): 434-441, 1985.
133. LIEBMAN, K.C. - Metabolism and toxicity of styrene. - Environ. Health Perspect., Washington, 11: 115-119, 1975.
134. LILIS, R.; LORIMER, W.V.; DIAMOND, S.; SELIKOFF, I.J. - Neurotoxicity of styrene in production and polymerization workers. Environ. Res., New York, 15: 133-138, 1978.
135. LINDBOHM, M.L.; TASHINEN, H.; SALLMÉN, M.; HEMMINKI, K. - Spontaneous abortions among women exposed to organic solvents. Am. J. Ind. Med., New York, 17 (4): 449-463, 1990.
136. LINDSTROM, K. & HARKONEN, H. - Disturbances in psychological functions of workers occupationally exposed to styrene. Scand. J. Work Environ. Health, Helsinki, 2 (3): 129-139, 1976.
137. LINDSTROM, K.; HARKONEN, H.; MANTERE, P. Alcohol consumption and tolerance of workers exposed to styrene in relation to level of exposure and psychological symptoms and signs. Scand. J. Work Environ. Health, Helsinki, 4 (supl 2): 196-199, 1978.
138. LINNAINMAA, K.; MERETOJA, T.; SORSA, M.; VAINIO, H. - Cytogenetic effects of styrene and styrene oxide on human lymphocytes and *Allium cepa*. Scand. J. Work Environ. Health, Helsinki, 4 (supl 2): 156-162, 1978.
139. LOF, A.; GULLSTRAND, E; NORDQVIST, M.B. - Tissue distribution of styrene, styrene glycol and more polar styrene metabolites in the mouse. Scand. J. Work Environ. Health, Helsinki, 9 (5): 419-430, 1983.

140. LOF, A.; GULLSTRAND, E.; LUNDGREN, E.; NORDQVIST, M.B. - Occurrence of styrene 7,8 oxide and styrene glycol in mouse after the administration of styrene. *Scand. J. Work Environ. Health, Helsinki*, 10 (3): 179-187, 1984.
141. LOF, A.; LUNDGREN, E.; BYFAELT, E.M.N.; NORDQVIST, M.B. - Biological monitoring of styrene metabolites in blood. *Scand. J. Work Environ. Health, Helsinki*, 12 (1): 66-69, 1986.
142. LOF, A.; LUNDGREN, E.; NORDQVIST, M.B. - Kinetics of styrene in workers from a plastics industry after controlled exposure: a comparison with subjects not previously exposed. *Br. J. Ind. Med., London*, 43 (8): 537-543, 1986.
143. LOI, A.M.; BIAGINI, A.M.; PAGGIARO, P.L.; ROSELLI, M.G.; CRISTAUDO, A.; BERTONE, C.; RICCO, V.; FONTANA, V.; ROSSI, G.; BASCHIERI, L. - Excrezione urinaria dell'acido d-glucarico in soggetti esposti a stirene. *Med. Lav., Milan*, 75 (2): 110-114, 1984.
144. LOPRIENO, N.; PRESCIUTTINI, S.; SBRANA, I.; SBRANA, I.; STRETTI, G.; ZACCARO, L.; ABBONDANDOLO, A.; BONATTI, S.; FIORIO, R.; MAZZACCARO, A. - Mutagenicity of industrial compounds. VII. Styrene and styrene oxide: II. Point mutations, chromosome aberrations and DNA repair induction analysis. *Scand. J. Work Environ. Health, Helsinki*, 4 (supl 2): 169-178, 1978.
145. LORIMER, W.V.; LILIS, R.; NICHOLSON, W.J.; ANDERSON, H.; FISCHBEIN, A.; DAUM, S.; ROM, W.; RICE, C.; SELIKOFF, I.J. - Clinical studies of styrene workers: initial findings. *Environ. Health Perspect., Washington*, 17: 171-181, 1976.
146. LORIMER, W.V.; LILIS, R.; FISCHBEIN, A.; DAUM, E.; ANDERSON, H.; WOLFF, M.S.; SELLIKOFF, I.J. - Health status of styrene polystyrene polymerization workers. *Scand. J. Work Environ. Health, Helsinki*, 4 (supl 2): 220-226, 1978.
147. LOWRY, L. - Biological exposure index as a complement to the TLV. *J. Occup. Med., Chicago*, 28 (8): 578-582, 1986.
148. MACKISON, F.W.; STRICOFF, R.S.; PARTRIDGE JR., L.J. eds. - *Occupational health guidelines for chemical hazards*, Washington, NIOSH/OSHA, 1981. [DHHS (NIOSH) Publication 81-123].
149. MAKI-PAKKANEN, J. - Chromosome aberrations, micronuclei and sister chromatid exchanges in blood lymphocytes after occupational exposure to low levels of styrene. *Mutat. Res., Amsterdam*, 189: 399-406, 1987.
150. MALEK, R.F.; DAISEY, J.M.; COHEN, B.S. - The effect of aerosol on estimates of inhalation exposure to airborne styrene. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J., Akron*, 47 (8): 524-529, 1986.

151. MALTONI, C.; FAILLA, G.; KASSAPIDIS, G. - First experimental demonstration of the carcinogenic effects on styrene oxide. *Med. Lav.*, Milan, 70 (5): 358-362, 1979.
152. MANO, E.B. - *Introdução a polímeros*. São Paulo, Edgard Blucher, 1985. 111p.
153. MATANOSKI, G.M. & SCHWARTZ, L. - Mortality of workers in styrene-butadiene polymer production. *J. Occup. Med.*, Chicago, 29 (8): 675-680, 1987.
154. MEINHARDT, T.J.; YOUNG, R.J.; HARTLE, R.W. - Epidemiologic investigations of styrene-butadiene rubber production and reinforced plastics production. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (supl 2): 240-246, 1978.
155. MERETOJA, T.; JARVENTUS, H.; SORSA, M.; VAINIO, H. - Chromosome aberrations in lymphocytes of workers exposed to styrene. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (supl 2): 259-264, 1978.
156. MEYER-BISCH, C. & PROTOIS, J.C. - Risques toxicologiques liés à l'exposition industrielle au styrène. *Cah. Notes Doc.*, Paris, 125: 495-502, 1986.
157. MILLER, J.C. & MILLER, J.N., eds. *Statistics for analytical chemistry*. 2.ed. Chichester, Ellis Horwood, 1988. 225p.
158. MOSCATO, G.; BISCALO, G.; COTTICA, D.; PUGLIESI, F.; CANDURA, F. - Occupational asthma due to styrene: two case reports. *J. Occup. Med.*, Chicago, 29 (12): 957-960, 1987.
159. MOSCONI, G.; LEGHISSA, P.; FIORENTINI, E.; TANI, A. - Neurite ottica in paziente professionalmente esposto a stirene. *Med. Lav.*, Milan, 78 (5): 380-385, 1987.
160. MUIJSER, H.; HOOGENDIJK, E.M.G.; HOOISMA, J. - The effects of occupational exposure to styrene on high frequency hearing thresholds. *Toxicology*, Shannon, 49 (2-3): 331-340, 1988.
161. MUTTI, A.; MAZZUCCHI, A.; RUSTICHELLI, P.; FRIGERI, G.; ARFINI, G.; FRANCHINI, I. - Exposure-effect and exposure-response relationships between occupational exposure to styrene and neuropsychological functions. *Am. J. Ind. Med.*, New York, 5 (4): 275-286, 1984.
162. MUTTI, A.; VESCOVI, P.P.; FALZOI, M. ARFINI, G.; VALENTI, G.; FRANCHINI, I. - Neuroendocrine effects of styrene on occupationally exposed workers. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 10 (4): 225-228, 1984.

163. MUTTI, A.; FALZOI, M.; ROMANELLI, A.; FRANCHINI, I. - Regional alterations of brain catecholamines by styrene exposure in rabbits. *Arch. Toxicol.*, Berlin, 55 (3): 173-177, 1984.
164. NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH. *Criteria for a recommended standard...occupational exposure to styrene.* Cincinnati, 1983. 236p.
165. NICHOLSON, W.J.; SELIKOFF, I.J.; SEIDMAN, H. - Mortality experience of styrene-polystyrene polymerization workers. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (supl 2): 247-252, 1978.
166. NORDENSON, I. & BECKMAN, L. - Chromosomal aberrations in lymphocytes of workers exposed to low levels of styrene. *Hum. Hered.*, Basel, 34: 178-182, 1984.
167. NORDQVIST, M.B.; LOF, A.; OSTERMAN-GOLKAR, S.; WALLE, S.A.S. - Covalent binding of styrene and styrene 7,8 oxide to plasma proteins, hemoglobin and DNA in the mouse. *Chem. Biol. Interact.*, Shannon, 55 (1-2): 63-73, 1985.
168. OGATA, M. & SUGIHARA, R. - High performance liquid chromatographic procedure for quantitative determination of urinary phenylglyoxilic, mandelic, and hippuric acids as indices of styrene exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, 42 (1): 11-19, 1978 †.
169. OGATA, M. & TAGUCHI, T. - Quantitation of urinary metabolites of toluene, xylene, styrene, ethylbenzene, benzene and phenol by automated high performance liquid chromatography. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, 59 (3): 263-272, 1987.
170. 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, 61 (1-2): 131-140, 1988.
171. OHTSUJI, H. & IKEDA, M. - A rapid colorimetric method for the determination of phenylglyoxilic and mandelic acids. *Br. J. Ind. Med.*, London, 20 (2): 150-154, 1970.
172. OKUN, A.H.; BEAUMONT, J.J.; MEINHARDT, T.J.; CRANDALL, M.S. - Mortality patterns among styrene exposed boatbuilders. *Am. J. Ind. Med.*, New York, 8 (3): 193-205, 1985.
173. OTT, M.G.; KOLESAR, R.C.; SCHARNWEBER, H.C.; SCHNEIDER, E.J.; VENABLE, J.R. - A mortality survey of employees engaged in the development or manufacture of styrene-based products. *J. Occup. Med.*, Chicago, 22 (7): 445-460, 1980.

174. PANTAROTTO, C.; FANELLI, R.; BIDOLI, F.; MORAZZONI, P.; SALMONA, M.; SZCZAWINSKA, K. - Arene oxides in styrene metabolism, a new perspective in styrene toxicity ? *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (supl 2): 67-77, 1978.
175. PANTAROTTO, C.; FANELLI, R.; BELLETI, I.; BIDOLI, F. Determination of styrene in biological specimens by gas chromatography-selected ion monitoring: distribution in mice. *Anal. Biochem.*, Baltimore, 105 (2): 340-347, 1980.
176. PARKKI, M.G. - The role of glutathione in the toxicity of styrene. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (supl 2): 53-59, 1978.
177. PARKKI, M.G.; MARNIEMI, J.; VAINIO, H. - Action of styrene and its metabolites styrene oxide and styrene glycol on activities of xenobiotic biotransformation enzymes in rat liver *in vivo*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, New York, 38 (1): 59-70, 1976.
178. PAUSTENBACH, D.I. - Occupational exposure limits, pharmacokinetics, and unusual work schedules. In: CRALLEY, L.J. & CRALLEY, L.V.L., eds. *Patty's industrial hygiene and toxicology*. 2.ed. New York, Willey Interscience, 1985. v.3A, p.111-277.
179. PEETERS, A.; BUYDENS, L.; MASSART, D.L.; SCHOENMAKERS, P.J. - An expert system for the selection of criteria for selectivity optimization in high-pressure liquid chromatography. *Chromatographia*, Braunschweig, 26: 101-109, 1988.
180. PERBELLINI, L.; LIMOZZO, P.; TURRI, P.V.; ZEDDE, A.; BRUGNONE, F. - Biological exposure index of styrene suggested by a physiologico-mathematical model. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, 60 (3): 187-193, 1988.
181. PEZZAGNO, G.; GHITTORI, S.; IMBRIANI, M.; CAPODAGLIO, E. - Urinary elimination of styrene in experimental and occupational exposure. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 11 (5): 371-379, 1985.
182. PFAFFLI, P.; ZITTING, A.; VAINIO, H. - Thermal degradation products of homopolymer polystyrene in air. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (supl 2): 22-27, 1978.
183. PFAFFLI, P.; HESSO, A.; VAINIO, H.; HYVONEN, M. - 4-vinylphenol excretion suggestive of arene oxide formation in workers occupationally exposed to styrene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, New York, 60 (1): 85-90, 1981.
184. PHILIPPE, R.; LAUWERYS, R.; BUCHET, J.P.; ROELS, H. - Évaluation de l'exposition des travailleurs au styrène par le dosage de ses métabolites urinaires: les acides mandélique et phénylglyoxilique. II. Application aux travailleurs fabricant des polyesters. *Arch. Mal. Prof. Med. Trav. Secur. Soc.*, Paris, 35 (6): 631-640, 1974.

185. POGGI, G.; GIUSIANI, M.; PALAGI, U.; PAGGIARO, P.L.; LOI, A.M.; DAZZI, F.; SICLAIR, C.; BASCHIERI, L. - High performance liquid chromatography for the quantitative determination of the urinary metabolites of toluene, xylene, and styrene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, 50 (1): 25-31, 1982.
186. PONOMARKOV, V. & TOMATIS, L. - Effects of long-term oral administration of styrene to mice and rats. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (supl 2): 127-135, 1978.
187. RAMSEY, J.C. & YOUNG, J.D. - Pharmacokinetics of inhaled styrene in rats and humans. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (supl 2): 84-91, 1978.
188. RAMSEY, J.C.; YOUNG, J.D.; KARBOWSKI, R.J.; CHENOWETH, M.B.; MACCARTY, L.P.; BRAUN, W.H. - Pharmacokinetics of inhaled styrene in human volunteers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, New York, 53 (1): 54-63, 1980.
189. RAMSEY, J.C. & ANDERSEN, M.E. - A physiologically based description of the inhalation pharmacokinetics of styrene in rats and humans. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, New York, 53 (11): 54-63, 1984.
190. RAPPAPORT, S.M.; SELVIN, S.; SPEAR, R.C.; KEIL, C. - Air sampling in the assessment of continuous exposures to acutely toxic chemicals. Part I. Strategy. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, 42 (11): 831-838, 1981.
191. REY, L. - Planejar e redigir trabalhos científicos. São Paulo, Edgard Blucher, 1987. 239p.
192. RIIHIMAKI, V. & PFAFFLI, P. - Percutaneous absorption of solvent vapours in man. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (1): 73-85, 1978.
193. ROACH, S.A. - A more rational basis for air sampling programs. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, 27 (1): 1-12, 1966.
194. ROACH, S.A. - A most rational basis for sampling programs. *Ann. Occup. Hyg.*, London, 20 (1): 65-84, 1977.
195. ROBERFROID, M.; PONCELET, F.; LAMBOTTE-VANDEPAER, M.; DUVERGER-VAN BOGAERT, M.; DE MESTER, C.; MERCIER, M. - Acute biotoxic effect of styrene on rat liver: correlation with enzyme-mediated mutagenicity of benzopyrene and acrylonitrile. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (supl 2): 163-168, 1978.
196. ROSÉN, I.; HAEGER-ARONSEN, B.; REHNSTROM, S.; WELINDER, H. - Neurophysiological observations after chronic styrene exposure. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (supl 2): 184-194, 1978.

197. RYAN, A.J.; JAMES, M.D.; BEN-ZVI, Z.; LAW, F.C.P.; BEND, J.R. - Hepatic and extrahepatic metabolism of C¹⁴ styrene oxide. *Environ. Health Perspect.*, Washington, 17 : 135-144, 1976.
198. SALMONA, M.; PACKECKA, J.; CANTONI, L.; BELVEDERE, G.; MUSSINI, E.; GARATTINI, S. - Microsomal styrene mono-oxygenase and styrene epoxide hydase activities in rats. *Xenobiotica*, London, 6: 585-591, 1976.
199. SAMINI, B. & FALBO, L. - Monitoring of workers exposed to low levels of airborne monomers in a polystyrene production plant. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, 43 (11): 858-862, 1982.
200. SATO, A. & NAKAJIMA, T. - Partition coefficients of some aromatic hydrocarbons and ketones in water, blood and oil. *Br. J. Ind. Med.*, London, 36 (3): 231-234, 1979.
201. SATO, A. & NAKAJIMA, T. - Pharmacokinetics of organic solvent vapours in relation to their toxicity. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 13 (2): 81-93, 1987.
202. SAVOLAINEN, H. & PFAFFLI, P. - Accumulation of styrene monomer and neurochemical effects of long term inhalation exposure in rats. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (1): 78-83, 1978.
203. SCHALLER, K.H.; SCHUTZ, H.W.; GELDMACHER, V.; MALLINCKRODT, M.; GOSSLER, K.; BOST, H.P. - The qualitative and quantitative determination of mandelic acid in urine in clinical and occupational medical toxicology. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, Copenhagen, 41 (supl 2): 230-238, 1977.
204. SCHOENMAKERS, P.J.; DUNAND, N.; CLELAND, A.; MUSCH, G.; BLAFFERT, TH. - An expert system for the optimization of columns, operating conditions and instrumentation for high-pressure liquid chromatography. *Chromatographia*, Braunschweig, 26: 37-44, 1988.
205. SCHOFIELD, K. - Problems with flame ionization detectors in automotive exhaust hydrocarbon measurements. *Environ. Sci. Technol.*, Washington, 8: 826-834, 1974.
206. SCHUMACHER, R.L.; BREYSSE, P.A.; CARLYON, W.R.; HIBBARD, R.P.; KLEINMAN, G.D. - Styrene exposure in the fiberglass fabrication industry in Washington State. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, 42 (2): 143-149, 1981.
207. SEDIVEC, V.; FLEK, J.; MRÁZ, M. - Urinary excretion of mandelic and phenylglyoxilic acids after exposure to styrene vapour. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, Prague, 28 (3): 241-255, 1984.
208. SEPPALAINEN, A.M. - Neurotoxicity of styrene in occupational and experimental exposure. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (supl 2): 181-183, 1978.

209. SEPPALAINEN, A.M. & HARKONEN, H. - Neurophysiological findings among workers occupationally exposed to styrene. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 2 (3): 140-146, 1976.
210. SIMPSON, C.F. ed. *Techniques in liquid chromatography*. Chichester, Wiley Heyden, 1982. 464p.
211. SIPES, I.G. & GANDOLFI, A.J. - Biotransformation of toxicants. In: KLAASSEN, C.D.; AMDUR, M.D.; DOULL, J., eds. *Casarett and Doull's toxicology: the basic science of poisons*. 3.ed. New York, MacMillan, 1986. p.64-98.
212. SLOB, A. - A new method for determination of mandelic excretion at low level styrene exposure. *Br. J. Ind. Med.*, London, 30 (4): 390-393, 1973.
213. SMOLENSKY, M.H.; PAUSTENBACH, D.J.; SCHEVING, L.E. - Biological rhythms, shiftwork, and occupational Health In: CRALLEY, L.J. & CRALLEY, L.V.L., eds. *Patty's industrial hygiene and toxicology*. 2.ed. New York, Willey Interscience, 1985. v.3B, p.175-312.
214. SNYDER, L.R. & KIRKLAND, J.J. - *Introduction to liquid chromatography*. New York, John Wiley, 1979. 863p.
215. SOLLENBERG, J. - Isotachophoretic analysis of mandelic acid, phenylglyoxilic acid, hippuric acid and methylhippuric acid in urine after occupational exposure to styrene, toluene and/or xylene. *J. Chromatogr.*, Amsterdam, 132 (3): 469-476, 1977.
216. SOLLENBERG, J.; BJURSTROM, R.; WRANGSKOG, K.; VESTERBERG, O. - Biological exposure limits estimated from relations between occupational styrene exposure during a workweek and excretion of mandelic and phenylglyoxilic acids in urine. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, 60 (5): 365-370, 1988.
217. STEELE, J.W.; YAGEN, B.; HERNANDEZ, O.; COX, R.H.; SMITH, B.R.; BEND, J.R. - The metabolism and excretion of styrene oxide glutathione conjugates in the rat and by isolated perfused liver, lung and kidney preparations. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, 219 (1): 35-41, 1981.
218. STEWART, R.D.; DODD, H.C.; BARETTA, E.D.; SCHAFFER, A.W. - Human exposure to styrene vapour. *Arch. Environ. Health*, Chicago, 16 (5): 656-662, 1968.
219. THIESS, A.M. & FRIEDHEIM, M. - Mortality among persons employed in styrene production, polymerization and processing plants. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (supl 2): 203-214, 1978.

220. TODD, W.F. - Styrene vapor control systems in FRP yacht plants. *Am. J. Ind. Med.*, New York, 8 (3): 219-232, 1985.
221. TOSSAVAINEN, A. - Styrene use and occupational exposure in the plastics industry. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (supl 2): 7-13, 1978.
222. TRIEBIG, G.; SCHALLER, K.H.; VALENTIN, H. - Investigations on neurotoxicity of chemical substances at the workplace. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, 56 (3): 239-247, 1985.
223. VAINIO, H.; PAAKKONEN, R.; RONNHOLM, K.; RAUNIO, V.; PELKONEN, D. - A study on the mutagenic activity of styrene and styrene oxide. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 2 (3): 147-151, 1976.
224. VAINIO, H. & ZITTING, A. - Interaction of styrene and acetone with drug biotransformation enzyme in rat liver. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (supl 2): 47-52, 1978.
225. VAINIO, H.; JARVISALO, J.; TASKINEN, E. - Adaptative changes caused by intermittent styrene inhalation on xenobiotic biotransformation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, New York, 49 (1): 7-14, 1979.
226. VAN ANDA, J.; SMITH, B.R.; FOUTS, J.R.; BEND, J.R. - Concentration-dependent metabolism and toxicity of [¹⁴C] styrene oxide in the isolated perfused rat liver. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, Baltimore, 211 (1): 207-212, 1978.
227. VAN DEN HOED, N.; VAN ASSELEN, D.L.J.; VAN DONGEN, J.P.C.M. - Replicate side-by-side field comparison of 3M diffusive samplers versus charcoal tube samplers for styrene. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, Akron, 48 (3): 252-256, 1987.
228. VAN ROOSMALEN, P.B. & DRUMMOND, I. - Simultaneous determination by gas chromatography of the major metabolites in urine of toluene, xylenes and styrene. *Br. J. Ind. Med.*, London, 35 (1): 56-60, 1978.
229. VARNER, S.L. & BREDER, C.V. - Head space sampling and gas chromatographic determination of styrene migration from food contact polystyrene cups into beverages and food simulants. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Washington, 64 (5): 1122-1130, 1981.
230. VARNER, S.L. & BREDER, C.V. - Liquid chromatographic determination of residual styrene in polystyrene food packaging. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Washington, 64 (3): 647-652, 1981.

231. VESTERBERG, O.; SOLLENBERG, J.; WRANGSKOG, K. - Evaluation of determinations made in urine samples. Adjustments of mandelic acid concentration using creatinine and density. *Ann. Am. Conf. Gov. Ind. Hyg., Cincinnati*, 12: 301-304, 1985 †.
232. VICKEY, T.M., ed. *Liquid chromatography detectors*. New York, Marcel Dekker, 1983. 434p.
233. VIVOLI, G. & VECCHI, G. - Study of the urinary excretion of mandelic acid as a test of styrene exposure. *Lav. Um., Rome*, 26 (1): 1-9, 1974.
234. VOLPI, R.; BAULEO, F.; PASQUINI, R.; MONARCA, S.; CIONI, C.; ANGELI, G.; BLASI, F. - Aumentata escrezione urinaria di acido d-glucarico in lavoratori esposti a stirene del settore vetroresina. *Med. Lav., Milan*, 79 (2): 136-141, 1988.
235. VYSKOCIL, A.; EMMINGER, S.; MALIR, F.; ZIALA, Z.; TULL, M.; ETTEROVA, E.; BERNARO, A. - Lack of nephrotoxicity of styrene at current TLV level (50 ppm). *Int. Arch. Occup. Environ. Health, Berlin*, 61 (6): 409-411, 1989.
236. WARITZ, R.S. - Biological indicators of chemical dosage and burden. In: CRALLEY, L.J. & CRALLEY, L.V.L., eds. *Patty's industrial hygiene and toxicology*. 2.ed. New York, Willey Interscience, 1985. v.3B, p.75-142.
237. WATABE, T.; ISOBE, M.; SAWAHATA, T.; YOSHIKAWA, K.; YAMADA, S.; TAKABATAKE, E. - Metabolism and mutagenicity of styrene. *Scand. J. Work Environ. Health, Helsinki*, 4 (supl 2): 142-155, 1978.
238. WATABE, T.; OZAWA, N.; YOSHIKAWA, K. - Stereochemistry in the oxidative metabolism of styrene by hepatic microsomes. *Biochem. Pharmacol., Oxford*, 30: 1695-1698, 1981.
239. WIECZOREK, H. Evaluation of low exposure to styrene. II. Dermal absorption of styrene vapours in humans under experimental conditions. *Int. Arch. Occup. Environ. Health, Berlin*, 57: 71-75, 1985.
240. WIECZOREK, H. & PIOTROWSKI, J.K. - Evaluation of low exposure to styrene. I. Absorption of styrene vapours by inhalation under experimental conditions. *Int. Arch. Occup. Environ. Health, Berlin*, 57: 57-69, 1985.
241. WIECZOREK, H. & PIOTROWSKI, J.K. - Kinetic interpretation of the exposure test for styrene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health, Berlin*, 61 (1-2): 107-113, 1988.
242. WIGAEUS, E.; LOF, A.; BJUSTROM, R.; NORDQVIST, M.B. - Exposure to styrene: uptake, distribution, metabolism and elimination in man. *Scand. J. Work Environ. Health, Helsinki*, 9 (6): 479-488, 1983.

243. WIGAEUS, E.; LOF, A.; BYFALT, N.M. - Uptake, distribution, metabolism and elimination in man: comparison between single exposure and co-exposure with acetone. *Br. J. Ind. Med.*, London, 41 (4): 539-546, 1984.
244. WILSON, A.L. - The performance characteristics of analytical methods - I. *Talanta*, London, 17 (1): 21-29, 1970.
245. WILSON, A.L. - The performance characteristics of analytical methods - II. *Talanta*, London, 17 (1): 31-44, 1970.
246. WILSON, A.L. - The performance characteristics of analytical methods - III. *Talanta*, London, 20 (8): 725-731, 1973.
247. WILSON, A.L. - The performance characteristics of analytical methods - IV. *Talanta*, London, 21 (10): 1109-1121, 1974.
248. WILSON, H.K.; COCKER, J.; PURNELL, C.J.; BROWN, R.H.; GOMPERTZ, D. - The time course of mandelic and phenylglyoxilic acid excretion in workers exposed to styrene under model conditions. *Br. J. Ind. Med.*, London, 36 (3): 235-237, 1979.
249. WILSON, H.K.; ROBERTSON, S.M.; WALDRON, H.A.; GOMPERTZ, D. - Effect of alcohol on the kinetics of mandelic acid excretion in volunteers exposed to styrene vapour. *Br. J. Ind. Med.*, London, 40 (1): 75-80, 1983.
250. WITHEY, J.R. - Quantitative analysis of styrene monomer in polystyrene in foods including some preliminary studies of the uptake and pharmacodynamics of the monomer in rats. *Environ. Health Perspect.*, Washington, 17: 125-133, 1976.
251. WITHEY, J.R. - The toxicology of styrene monomer and its pharmacokinetics and distribution in the rat. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (supl 2): 31-40, 1978.
252. WITHEY, J.R. & COLLINS, P.G. - Styrene monomer in foods: a limited Canadian survey. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, New York, 19: 86-94, 1978.
253. WOLFF, M.S. - Evidence for existence in human tissue of monomers for plastics and rubber manufacture. *Environ. Health Perspect.*, Washington, 17: 183-187, 1976.
254. WOLFF, M.S.; DAUM, S.M.; LORIMER, W.V.; SELIKOFF, I.J. - Styrene and related hydrocarbons in subcutaneous fat from polymerization workers. *J. Toxicol. Environ. Health*, Washington, 2 (5): 997-1005, 1977.

255. WOLFF, M.S.; LILIS, R.; LORIMER, W.V.; SELIKOFF, I.J. - Biological indicators of exposure in styrene polymerization workers: styrene in blood and adipose tissue and mandelic and phenylglyoxilic acids in urine. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (supl 2): 114-118, 1978.
256. WOLFF, M.S.; LORIMER, W.V.; LILIS, R.; SELIKOFF, I.J. - Blood styrene and urinary metabolites in styrene polymerization. *Br. J. Ind. Med.*, London, 35 (4): 318-329, 1978.
257. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Principles of toxicokinetic studies. Geneva, 1986. 116p. [Environmental Health Criteria, 57].
258. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Styrene. Geneva, 1983. 123p. [Environmental Health Criteria, 26].
259. ZIELHUIS, R.L. - Biological monitoring confusion in terminology. *Am. J. Ind. Med.*, New York, 8 (6): 515-516, 1985.
260. ZIELHUIS, R.L. & HENDERSON, P.TH. - Definitions of monitoring activities and their relevance for the practice of occupational health. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, Berlin, 57: 249-257, 1986.
261. ZITTING, A.; PFAFFLI, P.; VAINIO, H. - Effects of thermal degradation products of polystyrene on drug biotransformation and tissue glutathione in rat and mouse. *Scand. J. Work Environ. Health*, Helsinki, 4 (supl 2): 60-66, 1978.