

EXTRAÇÃO DE ÁCIDO *TRANS-TRANS* MUCÔNICO URINÁRIO COM POLÍMEROS DE IMPRESSÃO MOLECULAR E ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA - ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Lidiane Silva Franqui, André Coutinho Vieira, Patrícia Penido Maia e Eduardo Costa Figueiredo*

Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, 37130-000 Alfenas - MG, Brasil

Recebido em 4/1/12; aceito em 17/4/12; publicado na web em 20/7/2012

MOLECULARLY IMPRINTED SOLID-PHASE EXTRACTION OF URINARY *TRANS-TRANS* MUCONIC ACID AND ANALYSIS BY GAS CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY. This paper describes selective molecularly imprinted solid-phase extraction of ttMA from urine samples followed by derivatization and analysis by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). The analytical calibration curve ranged from 0.3 to 7.0 mg L⁻¹ ($r = 0.999$) and the limit of quantitation (LOQ) was 0.3 mg L⁻¹. The method was applied for the determination of ttMA in urine samples from smokers and concentrations detected ranged from < LOQ to 1.64 mg L⁻¹. Thus, the proposed method proved adequate for the determination of urinary ttMA in the biomonitoring of occupational exposure to low levels of benzene.

Keywords: *trans,trans*-muconic acid; molecularly imprinted polymers; gas chromatography/mass spectrometry.

INTRODUÇÃO

O benzeno é um hidrocarboneto aromático utilizado em processos industriais que representa grande risco ocupacional, uma vez que possui elevado potencial carcinogênico, além de ser um irritante da pele e mucosas, bem como depressor do sistema nervoso central.¹ Por ter um alto potencial tóxico, a legislação brasileira considera inexistente um limite seguro para a exposição a esse solvente (Portaria n.º 14, de 20/12/1995 do Ministério do Trabalho).² Desta forma, na impossibilidade de se inutilizar o benzeno devido a sua vasta aplicação industrial, a exposição a este agente deve ser monitorada e avaliada de acordo com os índices biológicos de exposição (IBEs).

Atualmente, os dois indicadores biológicos que melhor avaliam a exposição ocupacional a baixos níveis de benzeno são os ácidos *trans,trans*-mucônico (AttM) e fenilmercaptúrico urinários.³⁻⁶ A correlação entre AttM e benzeno é observada em níveis ambientais inferiores a 1,0 mg L⁻¹.⁷ Esse fato viabiliza o AttM como bioindicador no Brasil (Portaria n.º 34, de 20/12/2001),⁸ considerando que a concentração de benzeno permitida no ar ocupacional varia entre 1,0 mg L⁻¹ para as indústrias químicas e petroquímicas e 2,5 mg L⁻¹ para as indústrias siderúrgicas.⁹

A cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (GC/MS) ou por ionização em chama (GC-FID) e a cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por UV (HPLC-UV) são as técnicas mais empregadas na determinação do AttM. Comparando-se as duas técnicas cromatográficas, pode-se concluir que ambas apresentam sensibilidades equivalentes.¹⁰ No entanto, apesar da necessidade de uma etapa de derivatização em GC/MS, esta técnica tem se mostrado mais específica e econômica em termos de reagentes e solventes.

Com relação ao preparo de amostras na análise de AttM, na extração líquido-líquido utilizam-se solventes, tais como o acetato de etila, seguido de etapas de derivatização com hexano e reagente Tri-sil.¹¹ Contudo, a técnica mais empregada é certamente a extração em fase sólida (SPE).^{5,12} Em um estudo mais recente,¹³ o AttM foi analisado por cromatografia com detector ultravioleta após extração em fase sólida, sendo que a amostra foi aplicada num cartucho tipo

SAX (troca aniônica) pré-condicionado com metanol e água. O cartucho foi lavado com solução aquosa de ácido acético glacial a 1% e eluído com solução de ácido acético glacial a 10%. Apesar de sua boa aplicabilidade, os cartuchos tradicionais como troca iônica normalmente são usados uma única vez, possuem alto custo e baixa seletividade, o que tem resultado na extração de diversos interferentes com polaridade similar ao AttM. Desta forma, sorventes mais seletivos como os polímeros de impressão molecular (MIP) são apropriados no sentido de minimizar a extração de concomitantes indesejados.

Atualmente, diversos trabalhos têm sido publicados empregando-se MIP na extração seletiva das mais variadas moléculas.¹⁴⁻¹⁸ A impressão molecular é uma tecnologia capaz de produzir materiais dotados de sítios específicos de reconhecimento, estereoquimicamente moldados a partir de molécula modelo (MM).¹⁹ A síntese ocorre após o posicionamento dos monômeros funcionais ao redor da MM por meio de forças intermoleculares, resultando em uma notável capacidade enantiosseletiva.²⁰

Os MIP, quando usados como fase sólida em SPE, apresentam características vantajosas como alta seletividade, baixo custo, possibilidade de reutilização e menor gasto de solventes.²¹

Neste sentido, frente à necessidade de se desenvolver métodos sensíveis e seletivos para a avaliação da exposição a baixos níveis de benzeno e considerando as relevantes vantagens dos MIP na extração de analitos em amostras biológicas, este trabalho teve como objetivo desenvolver um método de extração e análise de AttM empregando-se MIP e GC/MS.

PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentação

Para síntese do MIP foram utilizados banho ultrassônico, modelo USC1400 (Unique, Indaiatuba, Brasil) e banho-maria (Frigomix B) acoplado com termostato Thermomix (B. Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Alemanha). A extração em fase sólida foi processada com auxílio de um sistema de extração a vácuo Manifold (Supelco, Bellefonte, EUA); a derivatização foi realizada em uma estufa S.E. modelo 310/1 (Fanem Ltda, São Paulo, SP) e a análise cromatográfica foi feita em um cromatógrafo a gás modelo GC-2010

*e-mail: eduardocfig@yahoo.com.br

acoplado à espectrometria de massas GCMS QP 2010 plus e autoinjeter AOC 20i+s (Shimadzu®, Kyoto, Japão).

Reagentes e soluções

Ácido *trans*, *trans*-mucônico (pureza $\geq 98,0\%$), etileno glicol dimetacrilato (pureza $\geq 98,0\%$), 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila, *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida – BSTFA (pureza $> 99,5\%$), trimetilclorossilano – TMCS (pureza $> 99,0\%$) e cloreto de N, N, N-trimetil, N-fenilamônio foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (Steinheim, Alemanha). Metanol, ácido acético e acetato de etila grau p.a. foram obtidos da Vetec® (Rio de Janeiro, Brasil). 4-vinilpiridina (pureza $\geq 98,0\%$) foi obtida da Acros Organics® (New Jersey, EUA). Ácido nítrico e ácido malônico foram adquiridos da Merck® (Munich, Alemanha). Ácido clorídrico e clorofórmio foram obtidos da Isofar® (Rio de Janeiro, Brasil). Sulfato de sódio anidro foi adquirido da Quimibrás® (Rio de Janeiro, Brasil). As soluções aquosas foram preparadas com reagente de alta pureza analítica e com água ultrapura ($>18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) obtida de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, São Paulo, Brasil).

As soluções estoque de AttM $1,5 \text{ g L}^{-1}$ e ácido malônico (padrão interno - PI) $1,5 \text{ g L}^{-1}$ foram preparadas através da dissolução de quantidades apropriadas dos padrões em metanol, acondicionadas em frasco âmbar, armazenadas em freezer ($-18 \text{ }^\circ\text{C}$) e utilizadas por um prazo máximo de 6 meses. A solução de trabalho de AttM $0,1 \text{ g L}^{-1}$ foi preparada por diluição da solução estoque, em metanol, e utilizada no prazo de 1 mês.

Amostras

As amostras de urina ($n = 5$) destinadas à formação do *pool* para o desenvolvimento do método foram obtidas de voluntários adultos, não fumantes. As amostras de urina ($n = 4$) destinadas à determinação de AttM foram obtidas de voluntários adultos, do sexo masculino e que relataram ser fumantes. A urina, proveniente de única micção, foi coletada diretamente em frasco de polietileno, quimicamente limpo. Após a coleta, as amostras foram mantidas sob refrigeração até o momento da análise. Ressalta-se que as amostras de fumantes foram processadas em um tempo máximo de 24 h após a coleta. O procedimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFAL-MG, protocolo n° 23087.001825/2009-81.

Síntese do MIP

A síntese do MIP foi conduzida de acordo com o trabalho prévio,²² seguindo o método de polimerização em *bulk*. Inicialmente, em uma ampola de vidro foram adicionados 2 mmol de ácido *trans*, *trans*-mucônico (MM), 8 mmol de 4-vinilpiridina (monômero funcional) e 11 mL de metanol (solvente de síntese) e esta ampola foi sonicada em ultrassom até total solubilização da MM. Em seguida, foram adicionados 40 mmol de etileno glicol dimetacrilato (agente de ligação cruzada) e 1,5 mmol de 2,2'-azo-bis-iso-butironitrila (iniciador radicalar). A solução foi purgada com nitrogênio por 20 min, a fim de eliminar o oxigênio presente no meio reacional. Posteriormente, a ampola foi selada e imersa em banho-maria a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h, tempo requerido para a completa reação de polimerização. O monólito obtido foi triturado em almofariz e tamisado, selecionando-se as partículas com tamanho entre 80 e 106 μm . Para remover a molécula molde, bem como os reagentes remanescentes da síntese, o material obtido foi submetido à lavagem com 100 mL de solução metanol:ácido acético (90:10 v/v) sendo, em seguida, seco em estufa a $40 \text{ }^\circ\text{C}$ e estocado à temperatura ambiente. Um polímero não impresso molecularmente (NIP) foi também sintetizado da mesma forma que o MIP, porém na ausência de molécula modelo.

Procedimento de extração

As amostras de urina foram filtradas em papel de filtro, fortificadas com 100 mg L^{-1} de ácido malônico (padrão interno) e sonicadas por 10 min. A seguir, 100 μL de amostra foram diluídos com 900 μL de água destilada e a solução foi submetida à extração em fase sólida molecularmente impressa. Para tal, 30 mg do MIP foram fixados em um cartucho vazio de SPE e este acoplado a um sistema de extração a vácuo, tipo Manifold®. O cartucho foi inicialmente condicionado com 6,0 mL de ácido nítrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, com o objetivo de ativar as cavidades seletivas do polímero, de modo que as interações com a molécula de interesse fossem maximizadas.²³ Em seguida, 1,0 mL de amostra (sendo 100 μL de urina e 900 μL de água destilada) foi percolado pelo cartucho, correspondendo à etapa de carregamento do MIP, na qual o AttM é retido. Por fim, a eluição foi realizada com 1,0 mL de acetato de etila.

Derivatização

O eluato obtido após a extração com MIP foi colocado em um tubo de ensaio contendo 40 mg de sulfato de sódio anidro. Tal procedimento foi necessário para a retirada do excesso de água, uma vez que a mesma interfere drasticamente na reação de derivatização.²⁴ O sobrenadante foi então seco em atmosfera de nitrogênio até um volume de *ca.* 50 μL . Em seguida, adicionaram-se 25 μL de BSTFA e 2,0 μL de TMCS (agente catalisador). A mistura foi mantida em estufa a $60 \text{ }^\circ\text{C}$ por 30 min. Após este período, 1,0 μL do derivatizado foi injetado no GC/MS.

Condições cromatográficas

O AttM foi analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, empregando-se uma coluna RTX5-MS (30,0 m x 0,25 mm x 0,25 μm) e hélio como gás de arraste, a um fluxo de 1,0 mL/min. O injetor foi mantido a $250 \text{ }^\circ\text{C}$ no modo *split* a uma razão de divisão de 1:3. A seguinte programação do forno foi utilizada: temperatura inicial de $80 \text{ }^\circ\text{C}$ mantida por 2 min, aumento a uma rampa de $10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ até $88 \text{ }^\circ\text{C}$, aumento a uma rampa $2 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ até $90 \text{ }^\circ\text{C}$, aumento a uma rampa de $20 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ até $150 \text{ }^\circ\text{C}$, manutenção da temperatura em $150 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 min, aumento a uma rampa de $30 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ até $280 \text{ }^\circ\text{C}$, manutenção da temperatura a $280 \text{ }^\circ\text{C}$ por 2 min. O espectrômetro de massas foi operado no modo SIM (monitoramento seletivo de íons) com ionização por impacto de elétrons (70 eV). A temperatura da interface foi $250 \text{ }^\circ\text{C}$ e a temperatura do ionizador foi de $200 \text{ }^\circ\text{C}$. As relações monitoradas foram *m/z* 73, 147 e 271 para o AttM, e 73 e 147 para o PI, respectivamente.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos de adsorção

Os estudos de adsorção foram executados de acordo com a literatura,¹⁷ empregando-se dois cartuchos contendo 3 mg de MIP e NIP, respectivamente, e padrões aquosos de AttM nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 60 e 80 mg L^{-1} . Os cartuchos foram empregados para a extração dos padrões por meio do seguinte procedimento: condicionamento com 6,0 mL de uma solução aquosa de ácido clorídrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$; extração de 2,0 mL de solução padrão e, eluição com 5,0 mL de uma solução aquosa de ácido clorídrico $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Os eluatos foram analisados espectrofotometricamente a 265 nm para a determinação da capacidade adsortiva (Q_e), da concentração de equilíbrio (C_e). As equações ajustadas das isotermas de adsorção e as capacidades máximas adsortivas são apresentadas na Tabela 1;

como pode ser visto, há uma maior adsorção no MIP, o que permite concluir que suas interações com AttM provavelmente são baseadas em reconhecimento molecular, enquanto que somente interações não específicas prevalecem entre NIP e AttM.¹⁷ Adicionalmente, verificou-se também que os dados do MIP se ajustam melhor ao modelo de Freundlich, o que dá indícios de que os sítios de reconhecimento estão distribuídos em multicamadas no MIP.¹⁷

Tabela 1. Parâmetros de adsorção para MIP e NIP

Parâmetro	MIP	NIP
Faixa de estudo/mg L ⁻¹	8,3<Ce<73,1	8,4<Ce<75,3
Equação	$Q_e = -0,0010.Ce^2 + 0,1387.Ce + 0,0162$	$Q_e = -0,0005.Ce^2 + 0,0691.Ce + 0,5147$
r ^a	>0,998	>0,998
Q _{e(m)} ^b /mg g ⁻¹	4,8	2,9

^aCoefficiente de correlação; ^bCapacidade máxima adsorviva.

Escolha do padrão interno

A escolha do padrão interno foi realizada considerando-se os seguintes parâmetros: não ser um composto presente naturalmente na urina, possuir uma estrutura semelhante ao analito possibilitando, assim, sua extração com o MIP sintetizado para o AttM e, ser derivatizado pelo mesmo reagente utilizado para derivatização do analito.²⁵ Entre as substâncias estudadas, o ácido malônico foi o composto que forneceu as melhores condições analíticas para tal finalidade. É importante ressaltar que, como o MIP foi sintetizado para AttM, a recuperação do PI foi menor quando comparada ao analito (maior seletividade do MIP para AttM). Assim, as amostras foram fortificadas com uma concentração superior de PI em relação à concentração do AttM.

Escolha do agente derivatizante

A derivatização refere-se à transformação de um composto químico em outro, com o intuito de permitir sua análise por cromatografia gasosa. Esse procedimento tem como principal objetivo reduzir a polaridade e aumentar a volatilidade de compostos polares.^{26,27} Vários desses compostos têm apresentado problemas durante a análise por cromatografia gasosa, como é o caso dos ácidos carboxílicos que apresentam elevada polaridade e moderada solubilidade em água, dificultando a obtenção de bons resultados quantitativos, particularmente em baixas concentrações.²⁷

O primeiro derivatizante estudado foi o metanol em HCl_(c).²⁸ Para tal teste, uma solução padrão foi seca em atmosfera de nitrogênio, o resíduo foi ressuspenso em 1,0 mL da solução de derivatização e levado a estufa à 80 °C por 1 h. Adicionou-se, então, 2,0 mL de água no frasco promovendo-se, em seguida, uma extração líquido-líquido com 1,0 mL de clorofórmio. Finalmente, 1,0 µL da fase orgânica foram injetados no GC/MS. Apesar de o método ter apresentado vantagens, como baixo custo e uso de reagentes menos tóxicos quando comparado com outros procedimentos de derivatização, algumas desvantagens devem ser destacadas, como a cinética lenta de reação além da necessidade de se promover uma extração líquido-líquido após a derivatização. Outro fator importante refere-se ao fato de que toda a pré-concentração obtida durante a extração com MIP foi perdida na etapa de derivatização (devido à diluição), o que contribuiu drasticamente para a diminuição da sensibilidade do procedimento.

Em seguida, avaliou-se a eficiência de uma solução de hidróxido de trimetilfenilamônio 0,2 mol L⁻¹ em metanol (agente metilante).²⁹ Nesse caso, o eluato foi seco e o resíduo ressuspenso diretamente

em 200 µL do agente derivatizante (agente metilante). Injetou-se 1,0 µL no GC/MS. Esse procedimento foi de execução mais rápida, uma vez que a reação tem cinética rápida, não requerendo etapa de aquecimento. No entanto, devido ao caráter universal da reação de metilação, o cromatograma apresentou picos concomitantes, dificultando a otimização das condições cromatográficas.

Finalmente, vale enfatizar a ampla utilização de reações de silição na análise de ácidos carboxílicos.²⁴ Dentre os vários reagentes empregados, o N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) se destaca devido ao fato de resultar em compostos mais voláteis e em cromatogramas mais limpos em comparação a outros reagentes.²⁶ Frequentemente, o trimetilclorossilano (TMCS) é utilizado como catalisador da reação de silição por aumentar a reatividade do BSTFA, melhorando assim a eficiência da reação.³⁰ Nesse sentido, o BSTFA foi avaliado como agente derivatizante, com base em trabalho prévio.²⁴ O primeiro teste realizado foi com relação ao uso do TMCS como agente catalisador da reação. A derivatização foi então feita na presença e na ausência de TMCS, os resultados demonstraram um aumento significativo do sinal analítico, justificando-se o uso desse reagente. Vale ressaltar que os cromatogramas obtidos apresentaram poucos picos, o que evidencia o caráter mais seletivo da reação (em comparação a outros derivatizantes), além da facilidade de execução do processo, o que contribuiu para a escolha da mistura derivatizante BSTFA + TMCS como condição de trabalho.

Estudo das condições de extração

O condicionamento do MIP é uma etapa importante para preparar os sítios seletivos para a ligação com o analito.³¹ Como relatado em trabalho anterior,¹⁷ a interação do AttM com o MIP provavelmente tem natureza eletrostática, o que faz com que essa interação dependa drasticamente da protonação dos sítios seletivos do polímero na etapa de condicionamento. Sendo assim, uma solução aquosa de ácido nítrico 0,5 mol L⁻¹ foi adotada para futuros experimentos. Vale ressaltar que os mesmos autores realizaram um estudo do pH da amostra de 6,0 a 8,0 e concluíram que essa variável não influenciou significativamente no sinal analítico. Dessa forma, no presente trabalho as amostras de urina foram analisadas diretamente sem ajuste prévio de pH.

A etapa de extração da amostra (no cartucho de MIP) foi executada diluindo-se inicialmente 100 µL de urina em 900 µL de água. Essa mistura foi extraída, quantitativamente, em um cartucho contendo 30 mg de MIP e a eluição foi satisfatória, empregando-se 1,0 mL de acetato de etila.

A etapa de lavagem não foi necessária, uma vez que as amostras de urina extraídas por MIP e injetadas no GC/MS, não apresentaram grande número de concomitantes, como pode ser comprovado pelo cromatograma da Figura 1.

Condições cromatográficas

As condições cromatográficas foram adaptadas dos métodos descritos anteriormente.^{24,28} Nesta etapa foi realizado um estudo das melhores condições de separação em função de temperaturas e rampas de temperatura. A condição ideal foi selecionada em função da resolução dos picos de AttM e PI, bem como pelo baixo tempo de corrida cromatográfica (ca. 15 min). A rampa ideal de temperatura foi temperatura inicial de 80 °C mantida por 2 min, aumento da temperatura até 88 °C a 10 °C/min, aumento da temperatura até 90 °C a 2 °C/min, aumento da temperatura até 150 °C a 20 °C/min, manutenção da temperatura em 150 °C por 2 min, aumento da temperatura até 280 °C a 30 °C/min e manutenção da temperatura a 280 °C por 2 min.

As corridas foram executadas no modo SIM, com o objetivo de aumentar a sensibilidade e a seletividade do método. As relações *m/z*

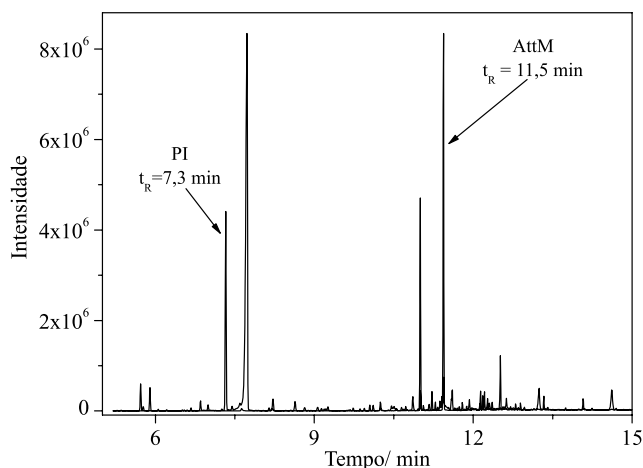


Figura 1. Cromatograma de íons totais da amostra de urina fortificada com 5 mg L^{-1} de AttM e 100 mg L^{-1} de ácido malônico (PI) obtido após extração por MIP

monitoradas, tanto para o AttM, quanto para o PI foram 73, 147 e 271 por apresentarem os picos mais intensos para ambos compostos; sendo as relações m/z 147 e 271 mais representativas, respectivamente, para o PI e AttM (Tabela 2).

Tabela 2. Principais formas derivatizadas do AttM e do ácido malônico

Analito	Estrutura química
AttM derivatizado	
PI derivatizado	

Figuras de mérito e aplicações

Os parâmetros de validação avaliados foram linearidade, limite de quantificação, precisão e exatidão. Para tal, utilizou-se um *pool* de urina obtido pela mistura de 5 amostras de indivíduos não expostos ao benzeno e não fumantes, com o intuito de compensar o efeito da matriz nos processos de extração das amostras de urina.

O estudo da linearidade foi feito por meio da análise de amostras fortificadas com soluções padrões de AttM nas concentrações de 0,3; 0,5; 1,0; 3,0; 5,0 e $7,0 \text{ mg L}^{-1}$. O PI (ácido malônico) foi empregado na concentração de 100 mg L^{-1} . O método mostrou-se linear na faixa de 0,3 a $7,0 \text{ mg L}^{-1}$, com equação $y = 0,0018x - 0,0029$ e coeficiente de correlação $r > 0,999$.

O limite de quantificação (LQ) foi de $0,3 \text{ mg L}^{-1}$, calculado de acordo com as recomendações da ANVISA.³² O método proposto apresentou detectabilidade suficiente para o monitoramento da exposição ocupacional, conforme preconizado pelo Ministério do Trabalho e Emprego em sua Portaria n° 34, de 20/12/2001.⁸ A recuperação da extração foi da ordem de 75,8%. A frequência analítica (extração, derivatização e separação) foi de $2,4 \text{ h}^{-1}$. Destaca-se ainda que cada cartucho empacotado com o MIP apresentou uma vida útil de até 120 extrações, frente a apenas 3 permitidas pelo método de referência para extração de AttM, a troca iônica.^{10,33} A precisão e exatidão intra e interdias foram avaliadas por meio de amostras de urina fortificada com concentração de AttM de 0,5; 3,0 e $7,0 \text{ mg L}^{-1}$ analisadas no mesmo dia ($n = 5$) e em dias consecutivos ($n = 3$). Os resultados da

precisão intra e interdia são apresentados na forma de desvio padrão relativo e erro relativo, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3. Precisão e exatidão para o AttM urinário extraído por técnica SPE usando MIP

Intradia	CN ^a	0,5	3,0	7,0
	CA ^b	0,44	3,2	6,9
	Precisão (CV ^c /%)	3,4	7,3	5,7
	Exatidão (E ^d /%)	-12,0	6,6	1,4
Interdias	CN ^a	0,5	3,0	7,0
	CA ^b	0,55	3,5	7,4
	Precisão (CV ^c /%)	8,4	6,5	8,4
	Exatidão (E ^d /%)	10,0	16,6	5,7

^aConcentração nominal (mg L^{-1}); ^bConcentração obtida (mg L^{-1}); ^cCoefficiente de variação; ^dErro relativo.

O método foi empregado na análise de 4 amostras de urina de fumantes, sendo que duas delas apresentaram concentrações de AttM de $1,64 \pm 0,2$ e $0,8 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$. As duas outras amostras apresentaram valores inferiores ao LQ, o que pode ser atribuído a diferentes fatores como variações individuais na absorção, distribuição e metabolização do benzeno; o tempo decorrido entre o ato de fumar e a coleta da amostra; variações na concentração de benzeno presente no cigarro, dentre outras.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que é viável a utilização da extração em fase sólida molecularmente impressa como técnica de extração e concentração de AttM urinário, objetivando sua análise por GC/MS. Ademais, o método proposto, além de mostrar-se adequado para a determinação de AttM urinário para fins de biomonitorização da exposição ocupacional a baixos níveis de benzeno, apresenta vantagens quando comparado com o método de referência (extração por troca iônica), como menor gasto de solventes, capacidade de reutilização e menor custo por análise.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) – projetos CDS-PPM-00055-09, CDS-APQ-4487-4.04/07, CDS-APQ-01612-10, CDS-APQ-01323-09 – e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- Alvarez-Leite, E. M. Em *Fundamentos de Toxicologia*; Oga, S., ed.; Ateneu: São Paulo, 2008, cap. 3.
- Brasil, Ministérios da Saúde e do Trabalho; *Portaria n.º 14*, de 20/12/1995.
- Ong, C. N.; Lee, B. L.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **1994**, *660*, 1.
- Boogaard, P. J.; van Sitter, N. J.; *Occup. Environ. Med.* **1995**, *52*, 611.
- Ghittori, S.; Maestri, L.; Rolandi, L.; Lodola, L.; Fiorentino, M. L.; Imbriani, M.; *Appl. Occup. Environ. Hyg.* **1996**, *11*, 187.
- Boogaard, P. J.; van Sitter, N. J.; *Environ. Health Perspect.* **1996**, *104*, 1151.
- Barbosa, E. M.; *Petrobrás/Serviços de Recursos Humanos* **1999**, 1.
- Brasil, Ministérios da Saúde e do Trabalho; *Portaria n.º 34*, de 20/12/2001.

9. Paula, S. C. F.; Silveira, J. N.; Junqueira, R. G.; Alvarez-Leite, E. M.; *Rev. Saúde Pub.* **2003**, *37*, 780.
10. Coutrin, X. M.; de Carvalho, R. F. L.; Arcuri, A. S. A.; *Quim. Nova* **2000**, *23*, 653.
11. Waidyanatha, S.; Rothman, N.; Li, G.; Smith, M. T.; Yin, S.; Rappaport, S. M.; *Anal. Biochem.* **2004**, *327*, 184.
12. Martins, I.; Siqueira, M. E. P. B.; *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2002**, *38*, 205.
13. Malafatti, L.; Martins, M. C. G.; Vieira, A. C.; Zampieri, R. A.; Gomes, L. S.; Martins, I.; *Interciencia* **2011**, *36*, 234.
14. Barros, L. A.; Martins, I.; Rath, S.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397*, 1355.
15. Figueiredo, E. C.; Sanvido, G. B.; Arruda, M. A. Z.; Eberlin, M. N.; *Analyst* **2010**, *135*, 726.
16. Figueiredo, E. C.; Sparrapan, R.; Sanvido, G. B.; Santos, M. G.; Arruda, M. A. Z.; Eberlin, M. N.; *Analyst* **2011**, *136*, 3753.
17. Vieira, A. C.; Zampieri, R. A.; Siqueira, M. E. P. B.; Martins, I.; Figueiredo, E. C.; *Analyst* **2012**, *137*, 2462.
18. Vitor, R. V.; Martins, M. C. G.; Figueiredo, E. C.; Martins, I.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 2109.
19. Magalhães, C. S.; Garcia, J. S.; Lopes, A. S.; Figueiredo, E. C.; Arruda, M. A. Z. Em *Trends in Sample Preparation*; Arruda, M. A. Z., ed.; Nova Science Publishers: New York, 2007, chap. 9.
20. Hilt, J. Z.; Byrne, M. E.; *Adv. Drug Delivery Rev.* **2004**, *56*, 1599.
21. Yang, J.; Hu, Y.; Cai, J. B.; Zhu, X. L.; Su, Q. D.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *384*, 761.
22. Figueiredo, E. C.; Tarley, C. R. T.; Kubota, L. T.; Rath, S.; Arruda, M. A. Z.; *Microchem. J.* **2007**, *85*, 290.
23. Caro, E.; Marcé, R. M.; Borrull, F.; Cormack, P. A. G.; Sherrington, D. C.; *TrAC Trend Anal. Chem.* **2006**, *25*, 143.
24. Rothman, N.; Bechtold, W. E.; Yin, S.-N.; Dosemeci, M.; Wang, Y.-Z.; Li, G.-L.; Griffith, W. C.; Smith, M. T.; Hayes, R. B.; *Occup Environ Med.* **1998**, *55*, 705.
25. Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; *Princípios de análise instrumental*, 5ª ed., Bookman: Porto Alegre, 2002.
26. Knapp, D. R.; *Handbook of analytical derivatization reactions*, John Wiley & Sons: New York, 1979.
27. Lanças, F. M.; *Cromatografia em fase gasosa*, Acta: São Carlos, 1993.
28. Kongtip, P.; Leelapaiboon, S.; Yoosook, W.; Chantanakul, S.; *J. Health Res.* **2009**, *23*, 117.
29. Alvarez-Leite, E. M.; França, L. S.; Ribeiro, L. B.; *Toxirama* **1994**, *3*, 3.
30. Kataoka, H.; *J. Chromatogr. A* **1996**, *733*, 19.
31. Spivak, D. A.; *Adv. Drug Delivery Rev.* **2005**, *57*, 1779.
32. Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, *RE n.º 899*, de 29/5/2003.
33. Paula, S. C. F.; Silveira, J. N.; Alvarez-Leite, E. M.; *Rev. Bras. Cienc. Farm.* **2003**, *39*, 63.