

Determinação espectrofotométrica e cromatográfica em fase gasosa de ácido tricloracético em urina*

Spectrophotometric and gas chromatographic determination of trichloroacetic acid in urine

Maria de Fatima M. Pedrozo e Maria Elisa P. B. Siqueira

Instituto Médico Legal de São Paulo. São Paulo, SP - Brasil (M.F.M.P.), Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas. Alfenas, MG - Brasil (M.E.P.B.S.)

Resumo

Solventes halogenados — 1,1,1-tricloretoano, tricloretileno, percloroetileno — apresentam o ácido tricloracético (TCA) como produto de biotransformação comum, o qual pode ser utilizado como indicador biológico de dose interna na exposição a estes compostos. Foi realizado estudo de métodos espectrofotométrico e cromatográfico em fase gasosa para a determinação do TCA, bem como da aplicação destes métodos à sua determinação em urina de indivíduos expostos ao 1,1,1-tricloretoano. Os resultados mostram a boa precisão à determinação do TCA em urina de indivíduos expostos ao 1,1,1-tricloretoano e nenhuma diferença significativa foi observada entre os métodos, ainda que o cromatográfico em fase gasosa apresentasse menor limite de detecção.

Ácido tricloracético, urina. Espectrofotometria, utilização. Cromatografia gasosa, utilização.

Abstract

Some chlorinated hydrocarbon solvents — 1,1,1-trichloroethane, trichloroethylene and perchloroethylene — have a common biotransformation product, trichloroacetic acid, which can be used as their biological exposure index. The spectrophotometric and gas chromatographic methods for the determination of trichloroacetic acid were studied and used as well as in its determination in the urine of workers exposed to 1,1,1-trichloroethane. Both methods showed good precision and no statistically significant difference was found although the gas chromatographic method presented a lower detection limit.

Trichloroacetic acid, urine. Spectrophotometry, utilization. Chromatography, utilization.

* Baseado na Dissertação de Mestrado de M. F. M. Pedrozo - "Determinação de tricloretoanol e ácido tricloracético em urina por espectrofotometria e cromatografia em fase gasosa". São Paulo, 1990, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Correspondência para / Correspondence to: Maria de Fátima M. Pedrozo - Rua Cristiano de Souza, 75 - Jd. Leonor - 05658-010 São Paulo, SP - Brasil.

Edição subvencionada pela FAPESP. Processo 95/2290-6.

Recebido em 26.6.1995. Aprovado em 31.10.1995.

INTRODUÇÃO

Alguns solventes halogenados (1,1,1-tricloretoano, tricloretileno, percloroetileno), utilizados no desengraxamento de peças metálicas, apresentam o ácido tricloroacético (TCA) como produto de biotransformação comum. Entretanto, as concentrações urinárias de TCA diferem de um para outro solvente, dependendo da extensão com que são biotransformados:

- 2 a 4% para o 1,1,1-tricloretoano^{11, 15, 19,21}
- 10 a 30% para o tricloretileno^{4, 9, 19, 29}
- 2% para o percloroetileno^{8,13, 26}.

A American Conference of Governmental Industrial Hygienists² (1986) preconiza a determinação de TCA urinário no final da semana de trabalho para monitorizar trabalhadores expostos a esses solventes. No Brasil, a NR-7 propõe a determinação dos triclorocompostos totais (TCT) na urina (colhida no final da semana de trabalho) e analisados como TCA através de método espectrofotométrico, na monitorização da exposição ocupacional ao tricloretoano¹⁸. Ainda que exista grande variação interindividual, esse indicador biológico de dose interna integra a exposição da semana, permitindo a avaliação da exposição ocupacional^{6, 14, 15, 23, 27, 28, 30, 33, 34}. As técnicas mais empregadas na quantificação do TCA são a espectrofotometria do visível^{10, 12, 17, 24, 25, 32} e cromatografia em fase gasosa (CG)^{3, 5, 7, 22, 26, 31, 35, 36}.

Os métodos espectrofotométricos baseiam-se na reação de Fujiwara, com formação de uma base de Schiff pela reação do TCA com piridina e alcali e posterior leitura da absorvância em comprimento de onda adequado. Outros compostos halogenados podem ser também determinados por esta reação desde que previamente oxidados a TCA; substâncias cromóforas presentes na urina podem interferir na formação do complexo colorido, o que torna a reação inespecífica.

Os métodos cromatográficos em fase gasosa são mais sensíveis e específicos. O TCA pode ser determinado por CG após extração e metilação^{7, 22}; metilação direta da amostra e volatilização dos compostos de interesse pela técnica de "head space", e CG^{5, 20} pela indução da descarboxilação do TCA, medindo-se o clorofórmio formado³¹.

O estudo de método espectrofotométrico e cromatográfico em fase gasosa, assim como a comparação dos resultados obtidos por estas duas técnicas na determinação de TCA em urina de trabalhadores expostos ao 1,1,1-tricloretoano constituíram o objetivo do presente trabalho.

MATERIAL E MÉTODO

Amostras de Urina

As amostras de urina foram obtidas de indivíduos não expostos e de expostos ocupacionalmente ao 1,1,1-tricloretoano, utilizado no desengraxamento de moldes para fabricação de objetos de espuma. As amostras dos trabalhadores expostos foram colhidas no final do quarto dia da semana de trabalho, acondicionadas em frascos de polietileno e conservadas sob refrigeração a 4°C.

Soluções e Reagentes

- solução padrão de TCA a 0,1% em água;
- solução de KOH 7,8 N;
- piridina;
- tolueno;
- ácido sulfúrico 3,0 M;
- trifluoreto de boro em metanol, 14%.

Aparelhos e Acessórios

- espectrofotômetro Bausch&Lomb, modelo Spectronic 88;
- cromatógrafo a gás "Instrumentos Científicos CG Ltda", modelo 370 equipado com:
 - detector de captura eletrônica, fonte de⁶³ Ni;
 - coluna OV 17-3% , de vidro silanizado, suporte Chromosorb W-HP 80-100 mesh, de 1,8 m x 3 mm;
 - amplificador e registrador Sargent Welch;
 - microseringa Hamilton de 10 µl.

O método utilizado para determinação espectrofotométrica de TCA foi o de Imamura e Ikeda¹² (1973), sem modificações. Foram preparadas soluções padrão de TCA a 0,1% em água e em urina para o preparo da curva de calibração, estudo da recuperação e precisão intrasérie do método. Todas as análises foram realizadas no mínimo em quintuplicata.

Adotou-se o método de Ehrner-Samuel e col.⁷ (1973), com pequenas modificações, para a determinação cromatográfica de TCA. Foi utilizado 0,5 ml de urina, diluída na proporção de 3:2 com água, acidificada com 0,15 ml de H₂SO₄ 3,0 M e extraída com 8,0 ml de tolueno. Após agitação (4 min), 2,0 ml da fase orgânica foram incubados a 80°C com 0,2 ml de trifluoreto de boro 14% em metanol por 60 min. Após a metilação, adicionou-se 1,0 ml de água destilada e 2,0 ml da fase orgânica foram injetados no CG.

Para a otimização das condições de análise cromatográfica foram estudados: fluxo ótimo do gás de arraste; temperatura de operação e a linearidade de resposta do detector. A identificação do TCA foi feita com base na distância de retenção determinada pela injeção, por dez vezes consecutivas, de solução padrão de TCA 4 µg/ml, tratadas como descrito acima; sua quantificação, com base na área do pico calculada por triangulação na metade da

altura do pico, foi comparada às áreas obtidas dos extratos das soluções-padrão de TCA em água (representadas pela equação de regressão linear da curva de calibração). Para o estudo da recuperação, precisão e limite de detecção do método, todas as amostras foram analisadas, no mínimo, em quadruplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Método Espectrofotométrico

A curva de calibração foi construída a partir de concentrações de 2,5-5,0-10,0-20,0-40,0-80,0 µg TCA/ml em água e urina, como ilustra a Figura 1. As equações das retas obtidas foram $y = 0,0071x - 0,0001$ ($r = 0,9999$) e $y = 0,0069x - 0,0039$ ($r =$

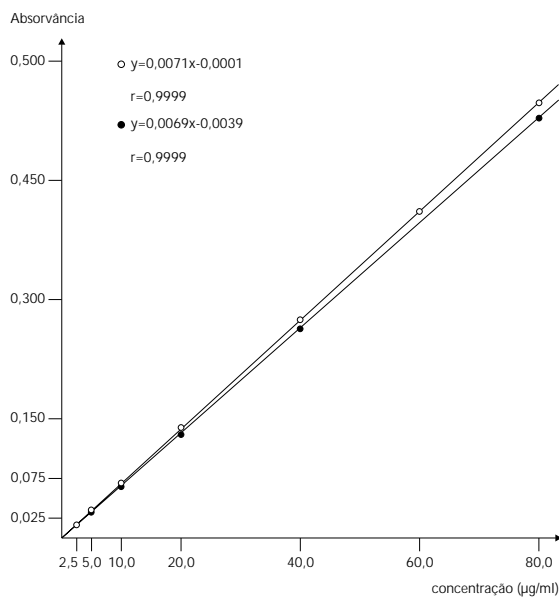


Figura 1 - Projeção da curva de calibração para determinação de ácido tricloracético em água (o) e em urina (•) por espectrofotometria.

Tabela 1 - Desvio-padrão e coeficiente de variação para concentrações de 10, 40 e 80 µg/ml de ácido tricloracético em urina submetidas à técnica espectrofotométrica.

Concentração de TCA em urina (µg/ml)	Desvio-padrão µg/ml	CV (%)
10,0	0,0027	4,09
40,0	0,0020	0,74
80,0	0,0020	0,36

TCA - Ácido Tricloracético
CV - Coeficiente de Variação

0,9999), respectivamente, para os adicionados em água e urina.

A Tabela 1 mostra os resultados obtidos no estudo da precisão do método, quando amostras de

urina enriquecidas com concentrações de 10, 40 e 80 µg de TCA/ml foram analisadas pelo método de Imamura e Ikeda¹² (1973), num total de 5 para cada concentração.

Esse método permite a determinação não só do TCA como do tricloretoanol e de ambos conjuntamente como triclorocompostos totais. Observa-se, no entanto, a necessidade de se utilizar um branco de reativos já que a piridina, por formar hidratos que apresentam cor mesmo na ausência de TCA, interfere na quantificação. Como este fato foi observado mesmo no solvente de grau p.a., procedeu-se à purificação da piridina por destilação, sob refluxo, com pastilhas de KOH, evitando-se, assim, a presença de cor no *branco de reativos*.

A correlação entre as duas curvas de calibração (água e urina) realizada apresentou-se plenamente satisfatória para o trabalho proposto. Os resultados obtidos no estudo da precisão do método - % CV médio de 2,26 também foram considerados adequados, concordantes com o método original.

Método Cromatográfico

As condições de trabalho do cromatógrafo a gás usadas na determinação do TCA foram :

a) condições de operação

- temperatura da coluna (TC): 90°C
- temperatura do detector (TD) : 240°C
- temperatura do vaporizador (TV): 180°C
- fluxo de nitrogênio : 40 ml/min
- sensibilidade: 3×10^{-9} nA
- compensador de corrente: 10^{-8}

b) distância de retenção do TCA metilado -1,28 ± 0,027. A Figura 2 representa um cromatograma CG obtido após a injeção de 2 µl de uma solução de TCA a 2,5 µg/ml, após a metilação.

A linearidade de resposta do detector-DCE para o TCA foi satisfatória no intervalo de 0,5 a 8,0 µg/ml, apresentando a seguinte equação da reta $y = 3,2786x + 0,4330$ ($r = 0,9998$) (Fig. 3). Através da curva de calibração, foram quantificadas amostras autênticas contendo TCA.

A Tabela 2 apresenta os resultados obtidos pelo estudo da recuperação e precisão do método. A recuperação foi obtida por comparação da resposta de adicionados de TCA em urina após extração e derivação, com a obtida de padrões injetados no CG após metilação. O limite de detecção, considerado como duas vezes a linha de base, foi de 150 pg.

Foram necessárias algumas modificações nas condições de análise cromatográfica para obtenção de respostas adequadas do aparelho de cromatografia gasosa

Tabela 2 - Desvio-padrão, coeficiente de variação e percentagem de recuperação obtidos para as concentrações de 1,0, 4,0, 8,0 µg/ml de TCA em urina submetidas à técnica de cromatografia em fase gasosa.

Concentração de TCA adicionada (µg/ml)	Desvio-padrão (µg/ml)	CV %	Recuperação (%)
1,0	0,066	1,79	96,7
4,0	0,099	0,75	97,7
8,0	0,081	0,32	95,4

$\bar{x} = 96,6$ (%)

TC - ácido tricloracético
Cv - coeficiente de variação
 \bar{x} - recuperação média

na realização do presente trabalho - TC, TD, TV, fluxo de N₂, tipo de coluna e de fonte do detector - com relação às relatadas por Erhner-Samuel e col.⁷ (1973).

As técnicas de extração e derivação não exigiram quaisquer modificações para obtenção de resultados satisfatórios: recuperação de 96,6% ± 1,15, limite de detecção (150pg) inferior ao encontrado por Ehrner-Samuel e col.⁷ (1973) (6 ng); maior precisão (CV menor 2%) de que o método original (CV de 5,2%).

O intervalo linear de resposta do detector ao derivado metilado do TCA, de 0,5 a 8,0 µg/ml, foi menor do que o relatado por Erhner-Samuel e col.⁷ (1973), de 3,0 a 100,0 µg/ml, o que provavelmente se deve ao menor limite de detecção obtido no presente trabalho.

Não foi empregado padrão interno ou externo na identificação de TCA, o que, aliás, foi observado na maioria dos trabalhos revisados^{7,20,22,36}, provavelmente, devido a dificuldade em se encontrar substância adequada para tal finalidade.

Tabela 3 - Valores de ácido tricloracético em urina de trabalhadores expostos ao 1,1,1-tricloretoano, determinados por espectrofotometria e cromatografia em fase gasosa.

Amostras	Método espectrofotométrico	Método cromatográfico
	TCA (µg/g creatinina)	TCA (µg/g creatinina)
1	ND	0,52
2	ND	1,47
3	ND	0,97
4	2,35	2,42
5	3,45	3,38
6	2,85	3,07
7	ND	0,75
8	ND	0,99
9	ND	0,92
10	3,05	2,14
11	3,41	2,72
12	3,29	3,03
13	2,45	2,18

ND = não detectado
TCA - ácido tricloracético

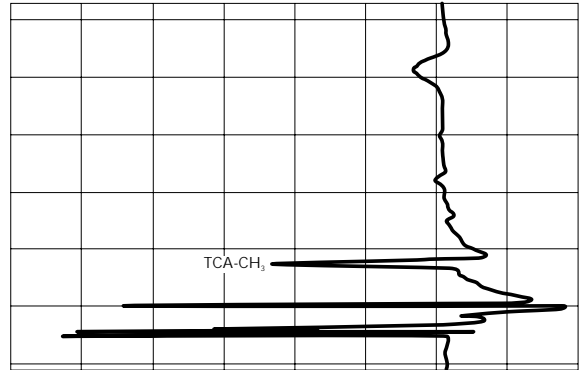


Figura 2 - Cromatograma da injeção de uma solução de ácido tricloracético a 2,5 µg/ml após metilação. Cromatógrafo CG mod. 370, detector de captura eletrônica, fonte 63Ni; coluna de vidro 1,8 m x 3 mm, chromossorb W-HP 80-100 mesh, OV-17, 3%; TD 240oC; TV 180oC; TC 90oC; fluxo de N₂ 40 ml/min.; sensibilidade 3x10⁻⁹ nA.

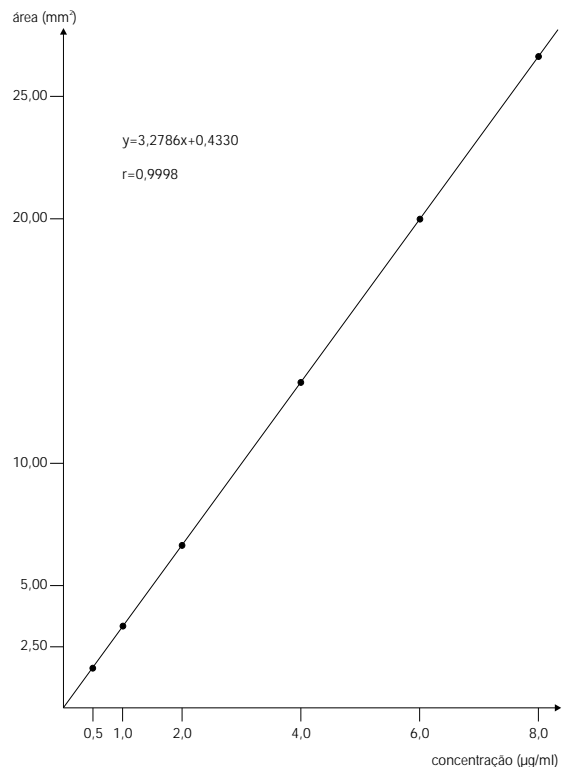


Figura 3 - Projeção da curva de linearidade de resposta do detector de captura eletrônica ao éster do ácido tricloracético.

Ácido Tricloroacético em Urina de Indivíduos Expostos Ocupacionalmente a 1,1,1-Tricloretoanol

Os resultados de TCA em urina de indivíduos expostos ocupacionalmente ao 1,1,1-tricloretoanol, obtidos pelos métodos espectrofotométrico e cromatográfico otimizados, estão apresentados na Tabela 3. Os resultados são expressos com relação a creatinina urinária para minorar as influências da flutuação do volume urinário no decorrer do dia de trabalho na eliminação do TCA, de acordo com a recomendação de alguns autores^{1, 16}.

Os valores de TCA obtidos pelo método espectrofotométrico, quando cotejados com os obtidos pelo método cromatográfico, não apresentaram diferen-

ças estatisticamente significativas, após a aplicação do teste não paramétrico de Wilcoxon.

O menor limite de detecção do método cromatográfico permitiu a determinação de TCA em todas as amostras, o que não pode ser feito quando do uso do método espectrofotométrico. Este fato não representa vantagem significativa em avaliações de exposição ocupacional, quando os teores obtidos são mais elevados. Entretanto, em avaliações de exposição ambiental e em determinações de valores de referência, a capacidade do método de detectar pequenas concentrações do indicador biológico é de grande importância.

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.*, **56**: 549-66, 1984.
2. AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS. *Documentation of the threshold limit values and biological exposure indices*. 5 ed., Cincinnati, ACGIH, 1986. p. BEI-75 - BEI-79.
3. BREIMER, D.D.; KETELAARS, H.C.J.; Van ROSSUM, J.N. Gas chromatographic determination of chloral hydrate, trichloroethanol and trichloroacetic acid in blood and urine employing head-space analysis. *J. Chromatogr.*, **88**: 55, 1974.
4. BRUCKNER, J.V.; DAVIS, B.D.; BLANCATO, J.N. Metabolism, toxicity and carcinogenicity of trichloroethylene. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **20**: 31-50, 1989.
5. BUCHET, J.P.; LAUWERYS, R.; ROELS, H. Le dosage par chromatographie en phase gazeuse des métabolites urinaires du trichloréthylène: l'acide trichloroacétique et le trichloroéthanol. *Arch. Mal. Prof. Med. Trav. Secur. Soc.*, **35**: 396-401, 1974.
6. CAMPOS-OUTCALT, D. Trichloroethylene: environmental and occupational exposure. *Am. Fam. Physician*, **46**: 495-504, 1992.
7. EHRNER-SAMUEL, H.; BALMER, K.; THORSELL, W. Determination of trichloroacetic acid in urine by a gas chromatographic method. *Am. Ind. Hyg. Ass. J.*, **34**: 93-6, 1973.
8. FERNÁNDEZ, J.; GUBERAN, E.; CAPERÓS, J. Experimental human exposures to tetrachloroethylene vapor and elimination in breath after inhalation. *Am. Ind. Hyg. Ass. J.*, **37**: 143-50, 1976.
9. FERNÁNDEZ, J. G.; HUMBERT, B.E.; DROZ, P.O.; CAPERÓS, J. R. Exposition au trichloroéthylène: bilan de l'absorption, de l'excretion et du métabolisme. *Arch. Mal. Prof. Med. Trav. Secur. Soc.*, **36**: 397-407, 1975.
10. GRISLER, R. & GRIFFINI, A. M. Semi micrometodo rápido e screening test per la determinazione dell'acido tricloroacetico nelle urine. *Med. Lav.*, **61**: 509-14, 1970.
11. HUMBERT, B. E. & FERNANDEZ, I. G. Exposition et 1,1,1- trichloroethane contribution à l'étude de l'absorption, de l'excretion et du métabolisme chez des sujet humains. *Arch. Mal. Prof. Med. Trav. Secur. Soc.*, **38**: 415-25, 1977.
12. IMAMURA, T. & IKEDA, M. A time saving procedure for the determination of total trichloro compounds in human urine samples. *Int. Arch. Arbeitsmed.*, **31**: 338-48, 1973.
13. IMBRIANI, M.; GHITTORI, S.; PEZZANO, G.; CAPODAGLIO, E. Urinary excretion of tetrachloroethylene in experimental and occupational exposure. *Arch. Environ. Health*, **43**: 292-8, 1988.
14. JANG, J. Y.; KANG, S. K.; CHUNG, K. C. Biological exposure indices of organic solvents for Korean workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **65**: S219-22, 1993.
15. KAWAI, T.; KAZUTOSHI, Y.; UCHIDA, Y.; IKEDA, M. Exposure of 1,1,1-trichloroethane and dose-related excretion of metabolites in urine of printing workers. *Toxicol. Lett.*, **55**: 39-45, 1991.
16. LOWRY, L. K.; Van der VORT, R.; POLAKOFF, P. L. Biological indication of occupational exposure to trichloroethylene. *J. Occup. Med.*, **16**: 98-101, 1974.
17. MANTEL, M. & NOTHMANN, R. Rapid determination of trichloroethanol and trichloroacetic acid in urine. *Analyt.*, **102**: 672-7, 1977.
18. MINISTÉRIO DO TRABALHO. Secretaria de Segurança e Medicina do Trabalho- NR-7 (Quadro I) - Portaria nº 24, *Diário Oficial da União*, Secão I, nº 248 de 30/12/94.
19. MONSTER, A. C. & ZIELHUIS, R. L. Chlorinated hydrocarbons solvents. In: Commission of the European communities. *Human biological monitoring of industrial chemical series*. Luxembourg, 1983. p.67-91, 96-104.

20. MULLER, G.; SPASSOWSKI, M.; HENSCHLER, D. Trichloroethylene exposure and trichloroethylene metabolites in urine and blood. *Arch. Toxicol.*, **29**: 335-40, 1972.
21. NOLAN, R. J.; FRESHOUR, N. L.; RICK, D. L.; McCARTY, C. P.; SAUNDERS, J. H. Kinetic and metabolism of inhaled methylchloroform (1,1,1-trichloroethylene) in male volunteers. *Fundam. Appl. Toxicol.*, **4**: 654-62, 1984.
22. NOMIYAMA, H.; NOMIYAMA, K.; UCHIKI, H. Gas-liquid chromatographic determination of trichloroethylene metabolites in urine. *Am. Ind. Hyg. Ass. J.*, **39**: 506-10, 1978.
23. OGATA, M. Japanese experience in biological monitoring. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **65**: S15- S21, 1993.
24. OGATA, M.; SHIMADA, Y.; TAGUCHI, T. A new microdetermination method used in an analysis of the excretion of trichloro compounds in the urine of workers exposed to trichloroethylene. *Ind. Health*, **25**: 103-12, 1987.
25. OGATA, M.; TAKATSUKA, Y.; TOMOKUNI, K. A simple method for the quantitative analysis of urinary trichloroethanol and trichloroacetic acid as an index of trichloroethylene exposure. *Br. J. Ind. Med.*, **27**: 378-81, 1970.
26. OGATA, M.; TAKATSUKA, Y.; TOMOKUNI, K. Excretion of organic chlorine compounds in the urine of persons exposed to vapours of trichloroethylene and tetrachloroethylene. *Br. J. Ind. Med.*, **28**: 386-91, 1971.
27. POPP, W.; MUELLER, G.; BALTES-SCHMITZ, B.; WEHNER, C.; VAHRENHOLZ, C.; SCHMIEDING, W.; BENNINGHOFF, M.; NORPOTH, K. Concentrations of tetrachloroethene in blood and trichloroacetic acid in urine in workers and neighbours of dry-cleaning shops. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **63**: 393-5, 1992.
28. SATO, A. Confounding factors in biological monitoring of exposure to organic solvents. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **65**: S61-7, 1993.
29. SATO, A.; NAKAJIMA, T.; FUJIWARA, N. A pharmacokinetic model to study the secretion of trichloroethylene and its metabolites after an inhalation exposure. *Br. J. Med.*, **34**: 56-63, 1977.
30. SEIJI, K.; INOUE, O.; JIN, C.; LIU, Y.; CAI, S.; OHASHI, M.; KAWAI, T.; IKEDA, M. Dose-excretion relationship in tetrachloroethylene-exposed workers and the effect of tetrachloroethylene Co-exposure on trichloroethylene metabolism. *Am. J. Ind. Med.*, **16**: 675-84, 1989.
31. SENFT, V. Simple determination of trichloroacetic acid in urine using head space gas chromatography: a suitable method for monitoring exposure to trichloroethylene. *J. Chromatogr.*, **337**: 126-30, 1985.
32. SETO, T. A. & SCHUTZE, M. O. Determination of trichloroethylene, trichloroacetic acid and trichloroethanol in urine. *Anal. Chem.*, **28**: 1625-9, 1956.
33. SKENDER, L.J.; KARACIC, V.; PRPIC-MAJIC, D. A comparative study of human levels of trichloroethylene and tetrachloroethylene after occupational exposure. *Arch. Environ. Health*, **46**: 174-8, 1991.
34. SKENDER, L. J.; KARACIC, V.; BOSNER, B.; PRPIC-MAJIC, D. Assessment of exposure to trichloroethylene and tetrachloroethylene in the population of Zagreb, Croatia. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, **65**: S163-5, 1993.
35. Van der HOEVEN, R.; DROST, R. H.; MAES, R. A. A.; DROST, F.; PLOMP, T. A.; PLOMP, G. J. J. Improved method for electron-capture gas chromatographic determination of trichloroacetic acid in human serum. *J. Chromatogr.*, **164**: 106-8, 1979.
36. VESTERBERG, O.; GORCZAK, J.; MUDITE, K. Methods for measuring trichloroethanol e trichloroacetic acid in blood and urine after exposure to trichloroethylene. *Scand. J. Work Environ. Health*, **1**: 243-8, 1975.