SOUTHERN BRAZILIAN JOURNAL OF CHEMISTRY 2021 VIRTUAL CONFERENCE

VALIDATION OF A GC-FID METHODOLOGY FOR THE DETERMINATION OF 2,5- HEXANEDIONE IN URINE

BORGES, Henrique Bordin Lucena e RÜBENSAM, Gabriel*

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Escola de Ciências da Saúde e da Vida, Centro de Pesquisa em Toxicologia e Farmacologia

* Correspondence author
e-mail: gabriel.rubensam@pucrs.br

Received 20 January 2022; received in revised form 20 February 2022; accepted 26 February 2022

ABSTRACT

2,5-hexanedione is the main metabolite of hexane and methyl butyl ketone excreted into urine and is currently used to estimate the human exposure levels to these solvents in professional environments. In Brazil, occupational exposure is regulated by a national control program (PCMSO) and applied to public and private organizations that hire your employees according to the actual Brazilian legislation. In the present work, we validated a methodology based on a gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) for the quantification of 2,5-hexanedione in urine to attend the new occupational limit of urinary 2,5-hexanedione, established by a recent revision of the Brazilian legislation, which reduced this limit from 5.0 to 0.5 mg/L. Before GC-FID analysis, sample treatment was based on a simple liquid-liquid extraction with dichloromethane. Considering that there is no specific validation guide for occupational purposes, the adopted validation process was performed using a "fit-for-purpose" approach based on different guides, including FDA bioanalytical method validation, European Commission Decision 2002-657-EC, and ANVISA Guidelines RDC 166/2017. After method optimization, the performance characteristics determined by the present validation study were considered satisfactory and demonstrate the method suitability for the routine analysis in the Brazilian PCMSO, including CC α and CC β values, which are used to avoid the presentation of false-positive and false-negative results. Intra and interday reproducibility were below 2.66, and 4.08 % and analyte recoveries were above 95.4% for three evaluated levels. The limits of detection and quantification were 0.05 and 0.17, respectively. To our knowledge, this is the first application of CC α and CC β approaches in an analytical method intended for occupational purposes, which are important to know when a sample is out or following the legislation. Then real samples were analyzed herein, and none presented 2,5-hexanedione above the required limits.

Keywords: Occupational toxicology, 2,5-hexanodiona, validation, gas chromatography.

1. INTRODUÇÃO

O hexano (HEX) é um dos solventes orgânicos mais utilizados em processos industriais com liberações atmosféricas estimadas em 20.000 ton/ano (Díaz, *et al.*, 2020; ATSDR, 1999). Já a metilbutilcetona (MBK) não apresenta a mesma amplitude de uso, mas é um dos constituintes de produtos comuns em ambientes profissionais como carpetes, forros, pinturas, entre outros (Jantunen *et al.*, 1997). Em humanos, tanto o HEX quanto a MBK são metabolizados e excretados pela urina na forma de 2,5-hexanodiona livre (2,5-HD livre) e na forma de outros metabólitos conjugados (2,5-HD total), permitindo o monitoramento dos níveis de

exposição (NIOSH, 2015). Entre os anos de 1980 e início dos anos 2000, o monitoramento ocupacional desses solventes em diversos países era realizado considerando o somatório da forma livre e conjugada e, atualmente, a maioria monitora somente a forma livre (NIOSH, 2015; EPA, 2009). No Brasil, o monitoramento da exposição ocupacional é realizado de acordo com a Norma Regulamentadora 7 (NR-7), que estabelece um Programa de Controle Médico de Saúde Ocupacional (PCMSO), aplicado nas organizações privadas e órgãos públicos que possuam empregados regidos pela Consolidação das Leis do Trabalho (CLT) (BRASIL, 2021; BRASIL, 2020). Desde a sua criação em 1978, essa norma vem acompanhando e implementando as atualizações propostas por

diferentes comissões nacionais e internacionais. A atualização mais recente ocorreu em 2020, com vigência a partir de agosto de 2021, recomendando, entre outros, a redução de alguns Indicadores Biológicos de Exposição Excessiva (IBE/EE), a forma de expressão de alguns resultados (se na forma livre ou conjugada do metabólito) e a introdução do IBE/EE para exposição ao MBK (BRASIL, 2020).

Com a atualização do PCMSO, o IBE/EE da 2,5-HD urinária passou de 5 mg/g de creatinina para 0,5 mg/L. Considerando que os valores médios esperados da creatinina sejam próximos a 1 mg/mL (Sallsten *et al.*, 2021) e que agora há a recomendação para que os resultados sejam expressos como 2,5-HD livre, houve uma redução no seu limite de aproximadamente 10 vezes. Essa redução, portanto, requer metodologias analíticas mais sensíveis e confiáveis. Assim o presente trabalho objetivou a otimização e a validação de um método de GC-FID para a quantificação de 2,5-HD em urina para atendimento dos novos limites estabelecidos pela legislação brasileira vigente, incluindo uma abordagem para avaliação da sua capacidade de decisão ($CC\alpha$) e detecção ($CC\beta$) que ajudaram a identificar quando uma amostra esteve abaixo ou acima do limite regulatório com probabilidade de erro α e β , respectivamente.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2,5-hexanodiona, ciclohexanona, cloreto de sódio e diclorometano, foram adquiridos da Sigma (Sigma-Aldrich, USA). A água do tipo I foi obtida de sistema de purificação do tipo Milli-Q (Millipore, USA). Os padrões foram preparados em água nas concentrações de 0,1 g/L para 2,5-HD e 0,3 mL/L de ciclohexanona (padrão interno, PI). As amostras de urinas foram obtidas de voluntários, coletadas em frasco de polietileno de 50 mL, posteriormente transferidas (5 mL) para tubos de ensaio com tampa rosca para armazenamento em geladeira ou freezer. Foram consideradas amostras brancas as urinas que não apresentaram 2,5-HD ou concentrações inferiores ao limite de detecção do método.

2.1. Extração

A etapa de extração consistiu em adicionar aproximadamente 1 g de cloreto de sódio em tubos de ensaio de 12 mL com tampa rosca. Em seguida, foram adicionados 5 mL de amostra (ou controles, ou soluções da curva de calibração) e a mistura foi agitada até a dissolução do sal. A extração líquido-líquido (ELL) foi realizada após a

adição de 25 μ L de PI e 2 mL de diclorometano, agitação orbital a 70 rpm durante 1,5 minutos. O extrato foi separado da matriz após centrifugação da mistura a 2500 rpm, a 4 °C, durante 10 minutos, e transferido (aproximadamente 1 mL) para vials de vidro, deixando-os abertos em rack de alumínio (modelo VT98, Agilent Technologies, CA, USA) aquecida a 50 °C, por aproximadamente 10 minutos para promover evaporação de uma fração do solvente. Quando o volume do extrato atingiu aproximadamente 0,5 mL, os vials foram tampados e a rack transferida para o GC-FID para injeção.

2.2 Análise por GC-FID

Os extratos foram analisados em sistema de cromatografia gasosa 7890B GC-System equipado com amostrador automático GC Sampler 80 (Agilent Technologies, CA, USA). A separação foi performada em coluna megabore DB-624 (30m x 0,53mm di, 0,25 μ m) com gás de arraste sendo nitrogênio, com fluxo constante de 10 mL/min. A temperatura inicial do forno foi de 90 °C mantida em isoterma por 5 minutos, seguida de aquecimento de 30 °C /min até chegar em 120 °C, mantido isoterma de 0,5 min. Uma nova rampa de 50 °C /min foi aplicada até obter 180 °C, permanecendo nesta condição por 0,5 min e, por fim, retomando a condição inicial da análise. O injetor foi mantido à temperatura de 230 °C e injeção foi realizada no modo *splitless*, com volume de extrato de 4 μ L. A temperatura do detector FID foi mantida a 250 °C. A quantificação foi realizada por padronização interna

2.3 Validação

Foram adotados os procedimentos de validação da U. S. Food and Drug Administration (U.S. FDA, 2001), da resolução da Comunidade Européia 2002/657/EC (E.C, 2002), RDC 166/2017 (Anvisa, 2017) utilizando a abordagem “*fit-for-purpose*” (Uvarova *et al.*, 2019). As características de performance avaliadas foram seletividade, utilizando urinas obtidas de, pelo menos, seis coletas distintas adicionadas (ou não) por candidatos a contaminantes externos, como metanol, etanol, metiletilcetona, isopropanol, acetato de etila, acetona, acetonitrila, hexano e ciclohexano, clorofórmio, tetrahidrofurano, formaldeído e metilisobutilcetona; robustez, variando os tempos e velocidades de centrifugação dos extratos, quantidade de cloreto de sódio na etapa de *salting out*, volume de solvent extractor, tipos de solvents diferentes na construção das curvas de calibração;

repetibilidade e reprodutibilidade, a partir do cálculo do desvio padrão relativo de amostras adicionadas por padrão nas concentrações de 0,25 mg/L (limite de quantificação), 0,5 mg/L (IBE/EE) e 1,5 mg/L, no mesmo dia e em dias diferentes, com técnicos diferentes, respectivamente; linearidade, realizando estudo da significância da regressão e desvio da linearidade de curvas construídas em matriz, por análise de variância ($p < 0.05$); estabilidade, trabalhando com adição em matriz e armazenamento em temperatura ambiente (ambiente iluminado e não iluminado), em geladeira e em freezer por até 7 dias; limite de decisão ($CC\alpha$) e capacidade de detecção ($CC\beta$), fortificando lotes de amostras brancas com as concentrações equivalentes a 0,5, 1,0 e 1,5 vezes o IBE/EE do analito; teste do $CC\alpha$ contaminando 22 amostras brancas na concentração equivalente ao IBE/EE da 2,-HD; e efeito de matriz, a partir das curvas de calibração construídas em água e em matriz, observando-se os desvios percentuais dos coeficientes angulares da equações de regressão lineares e utilização de volumes de injeção diferentes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Otimização da etapa de extração

A 2,5-HD foi diretamente extraída de amostras de urina utilizando como base uma das metodologias mais simples até hoje presentes na literatura (Kawai *et al.*, 1990). Para atingir um limite de quantificação não superior a metade do IBE/EE de 2,5-HD proposto na nova legislação brasileira, foi necessária a realização de uma etapa de evaporação do extrato. A variação da concentração de 2,5-HD no extrato causada pela evaporação de solvente foi corrigida pelo padrão interno. Com o método de extração otimizado, foi possível preparar cerca de 30 extratos em menos de 40 minutos, incluindo a curva de calibração, utilizando aproximadamente 60 mL de solvente.

3.2 Validação

O método apresentou seletividade adequada, não sendo observadas coeluições de contaminantes externos. A Figura 1 ilustra os cromatogramas obtidos na etapa de seletividade. Variações do volume de diclorometano, da quantidade de cloreto de sódio, do tempo de agitação e centrifugação do extrato não causaram alterações superiores a 3,2% no limite de quantificação da 2,5-HD em urina (dados não apresentados). Os resultados da avaliação das características de performance do presente

método foram compilados na Tabela 1. A precisão vista como repetibilidade e reprodutibilidade do método foram inferiores a 2,66 e 4,08 %, respectivamente. O método apresentou linearidade na faixa de concentração utilizada (de 0,25 até 1,25 mg/L de 2,5-HD) tanto com curvas construídas em água quanto em curvas construídas em matriz, sem apresentar desvios significativos de variância, com coeficientes de correlação superiores a 0,99 e regressão significativa com intervalo de confiança de 95%. Não foram observados efeitos de matriz significativos (dados não apresentados), considerando que os desvios entre os coeficientes angulares das curvas de calibração construídas em água e na matriz foram inferiores àqueles obtidos na precisão (Hoff *et al.*, 2015). Os limites de detecção e de quantificação foram de 0,05 e 0,17 mg/L. $CC\alpha$ e $CC\beta$ foram 0,53 e 0,56 mg/L, respectivamente, e, dessa forma foi possível estimar a capacidade do método em diferenciar amostras conformes (amostras que apresentaram concentrações de 2,5-HD abaixo do IBE/EE) de amostras não conformes (amostras que apresentaram concentrações de 2,5-HD acima do IBE/EE) e reduzir a probabilidade de apresentar resultados falsos-positivos e falsos-negativos para menos de 5%, conforme recomendado no guia de validação adotado (E.C., 2012). O método foi aplicado para a análise de 10 amostras, sendo que em nove amostras os resultados foram inferiores ao limite de quantificação e, em uma amostra, o resultado foi acima do limite de detecção, mas abaixo do limite de quantificação. Frente a isto, foram realizadas simulações de análises de urinas adicionadas por 2,5-HD na concentração de IBE/EE (22 amostras), para avaliar a metodologia com relação a sua capacidade de gerar resultados falsos-positivos de acordo com a legislação ocupacional vigente. Em uma das amostras simuladas, o resultado foi de 0,55 mg/L, acima do $CC\alpha$, representando menos de 5% de resultados falsos-positivos.

4. CONCLUSÕES

A presente metodologia foi considerada adequada para aplicação em rotina de análises ocupacionais para a determinação de 2,5-HD em urina considerando os resultados de desempenho obtidos da validação. De acordo com as bases de dados consultadas na literatura, o presente trabalho foi o primeiro a avaliar a capacidade analítica de um método em diferenciar resultados de quantificação em situação de conformidade e não-conformidade de amostras com a legislação vigente, na área de análises de toxicologia

ocupacional, baseados nos dados de CC α e CC β .

6. REFERÊNCIAS:

1. Díaz C.C., Yeste M.P., Vidal H., Gatica J.M., Cadús L.E., Morales M.R., *Fuel*, V. 262, **2020**, 116564.
2. U.S. Department of health and human services – ATSDR, **1999**, disponível em: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp113.pdf>, acessado em 12/12/2021.
3. Jantunen M., Jaakkola J.J.K. and Krzyzanowski M., *WHO*, **1997**, No. 78.
4. NIOSH 8318, *NMAM 5th Edition*, **2015**.
5. EPA, *Env Prot Ag*, EPA/635/R-09/008F, **2009**.
6. BRASIL, Ministério do Trabalho e da Previdência, *Norma Regulamentadora No. 7 (NR-7)*, **2021**.
7. BRASIL, Ministério Da Economia, *NR 07 – 2020*.
8. Sallsten G., Barregard L., *Int. J. Environ.* 262, **2020**, 116564
9. U.S. Department of health and human services – ATSDR, **1999**.
10. U.S. FDA, U.S. *Dep. Heal. Hum. Serv. Food Drug Adm.* **2018**, 1–41.
11. E.C., 2002/657/EC - *Commission of the European Communities*, Off. J. Eur. Comm. No. L221/8, **2002**.
12. Anvisa, *Resolução da Diretoria Colegiada RDC 166 de 24 de julho de 2017*
13. Uvarova, N.E., Eremenko, N.N., Ramenskaya, G.V. *Pharm Chem J.* **2019**, 53, 759–765.
14. Kawai T., Mizunuma K., Yasugi T., Uchida Y. & Ikeda M., *Int. Arch Occup Environ Health*, **1990**, 62, 403–408.
15. R.B. Hoff, G. Rübensam, L. Jank, F. Barreto, M.C.R. Peralba, T.M. Pizzolato, M. S. Díaz-Cruz, D. Barceló, *Talanta*, **2015**, 132, 443–450.

Figura 1: Cromatograma “a”, Extrato de urina sem adição de padrões; cromatograma “b”, extrato de urina com adição de 2,5-HD e padrão interno (picos 5 e 6); cromatograma “c” e “d”, extrato de urina com adição de solventes interferentes.

Tabela 1. Tabela 1. Compilação dos resultados da etapa de validação

		Níveis de validação utilizados									Limites ^b			
		0.5 x IBE/EE ^a			1.0 x IBE/EE ^a			1.5 x IBE/EE ^a			LD	LQ	CC α	CC β
		R (%)	Intra-dia CV (%)	Inter-dias CV (%)	R (%)	Intra-dia CV (%)	Inter-dias CV (%)	R (%)	Intra-dia CV (%)	Inter-dias CV (%)				
2,5-HD		95.4	2.66	4.02	99.5	1.05	4.08	99.1	0.98	2.82	0.05	0.17	0.53	0.56

^a IBE/EE: níveis de validação utilizados.

^b Concentrações em mg L⁻¹.