

ENSAIOS PARA DETERMINAR A (BIO)DISPONIBILIDADE DE CHUMBO EM SOLOS CONTAMINADOS: REVISÃO**Sergio Tagliaferri Bosso e Jacinta Enzweiler***

Instituto de Geociências, Universidade Estadual de Campinas, CP 6152, 13083-870 Campinas SP, Brasil

Recebido em 2/2/07; aceito em 14/6/07; publicado na web em 26/2/08

ESSAYS FOR DETERMINING LEAD (BIO)AVAILABILITY IN CONTAMINATED SOILS: REVIEW. Incidental ingestion of contaminated soils is a major route of Pb uptake by humans, especially by children. Lead speciation in soils controls its bioavailability. Bioavailability assessment requires the determination of the amount of absorbed lead if a contaminated soil is ingested. *In vivo* tests, which employ animals, are considered the best model to infer absorption of Pb. But they have some logistic limitations and several authors proposed *in vitro* methods, which simulate conditions of human digestion. Many of them present results which correlate with *in vivo* essays. Several authors consider *in vitro* tests a good and reliable alternative to infer lead bioavailability.

Keywords: bioaccessibility; bioavailability; lead in soils.

INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, a mineração e o beneficiamento de minérios de chumbo para os diversos usos do chumbo metálico e de seus compostos produziram a disseminação do chumbo no ambiente. Exemplos ainda recentes são as tintas com pigmentos à base de compostos de chumbo, amplamente usadas, inclusive para a pintura de residências e o tetraetil chumbo usado como anti-detonante na gasolina durante muitas décadas. Felizmente estas duas aplicações de compostos de chumbo foram banidas na maior parte do mundo. No Brasil, elevadas concentrações de Pb podem ser encontradas em solos no entorno de áreas industriais, em atividades de reciclagem de baterias automotivas ou em áreas onde ocorreram atividades industriais de exploração e refino de minérios de chumbo¹.

O reconhecimento dos efeitos tóxicos da exposição ao chumbo redundou na introdução de restrições ao uso de compostos de chumbo, com o objetivo de tornar o ambiente, em geral, mais seguro e saudável. O mesmo é válido para outros compostos de ação tóxica, metálicos ou não. A necessidade de monitorar a presença e o comportamento de elementos tóxicos no ambiente ensejou o desenvolvimento de métodos específicos para determinar a sua concentração e reatividade em diversas matrizes e meios.

O chumbo (Pb) é um elemento-traço com abundância crustal² de 17 mg kg⁻¹ e que substitui elementos como potássio e cálcio em aluminossilicatos, em especial feldspatos, e metais em sulfetos. O chumbo é constituinte essencial de muitos minerais, mas somente alguns são comuns. A galena (PbS) é o principal mineral de minério de chumbo. O chumbo metálico é produzido por oxidação da galena, seguida pela redução do litargírio (PbO) formado. Alguns minerais importantes de chumbo são formados por transformação da galena. Exemplos são a reação com águas carbonatadas para formar cerussita (PbCO₃), a oxidação que produz a anglesita (PbSO₄) e a reação com fosfatos que resulta na piromorfita [(Pb₃(PO₄)₃X onde X= OH, F, Br ou Cl].

A ocorrência desses minerais evidencia que o chumbo forma compostos de baixa solubilidade, com algumas poucas exceções (p.x., citrato e acetato). A atividade do chumbo em águas naturais, inclusive as intersticiais, com frequência é menor que a calculada pela satura-

ção das espécies de chumbo precipitadas. Isto ocorre por causa de reações de adsorção em superfícies inorgânicas como óxidos de ferro, argilominerais, apatita e matéria orgânica. A solubilidade das diferentes espécies de chumbo, isto é, de minerais, chumbo adsorvido ou de compostos sintéticos também depende do pH do meio. Em pH ácido (~1,5), como o encontrado no estômago humano, muitas espécies de chumbo são solúveis, e por isto a ingestão de solos ou poeiras contaminadas pode resultar na absorção de chumbo.

O chumbo é um metal não essencial ao organismo e pode ser acumulado primeiramente em tecidos moles, e posteriormente nos ossos³. Na sua interação com organismos, o chumbo apresenta características toxicológicas comuns a outros metais (p.ex., induz anemia e danos ao rim) e também alguns efeitos específicos. A toxicidade do chumbo resulta, principalmente, de sua interferência no funcionamento das membranas celulares e enzimas, pois é capaz de formar complexos estáveis com ligantes que contêm enxofre, fósforo, nitrogênio ou oxigênio (p.ex., grupos -SH, -H₂PO₃, -NH₂, -OH), que funcionam como doadores de elétrons³. Por exemplo, como resultado da interação bioquímica do chumbo com grupos -SH de uma enzima, a atividade desta pode ser afetada e, desta forma, produzir efeitos tóxicos^{3,4}.

Quando a exposição ao chumbo é crônica, efeitos a longo prazo no organismo podem atingir os ossos, os rins, os sistemas nervoso central, cardiovascular, reprodutivo, endócrino e a formação do feto³. Comparadas com adultos, as crianças são mais suscetíveis aos efeitos toxicológicos do chumbo. Essa maior vulnerabilidade pode ser relacionada aos seguintes fatores^{3,5}: o contínuo crescimento das crianças em idade pré-escolar implica na remodelagem óssea e contribui para a transferência do chumbo dos ossos para o sangue; por terem o sistema nervoso ainda em formação, as crianças são mais vulneráveis aos efeitos neurotóxicos provocados pela contaminação por chumbo; frequentemente, crianças apresentam deficiências metabólicas de Fe e Ca, o que aumenta a absorção e os efeitos colaterais da ingestão do Pb; a eficiência de absorção do Pb no trato gastro-intestinal, em crianças, é maior que em adultos, devido à formação física e ao metabolismo mais acelerado e, crianças em idade pré-escolar frequentemente brincam diretamente na terra e têm mais acesso a poeiras e levam mãos e brinquedos sujos à boca e ao nariz, o que aumenta a possibilidade de ingestão (ou inalação) de partículas com chumbo⁶.

*e-mail: jacinta@ige.unicamp.br

A absorção do chumbo, ocorre no estômago (em menor escala) e no duodeno, desde que as condições sejam favoráveis. O metal deve estar solúvel, na sua forma livre (Pb^{2+}) ou complexado por aminoácidos, ácidos ou sais orgânicos e pelos componentes da bile, e desta forma ser transportado através da parede epitelial, onde pode ser absorvido e entrar na circulação sanguínea⁷. O tempo de residência do chumbo no sangue é de menos de um mês e a tendência é dele se acumular nos ossos, de onde pode ser liberado novamente.

A ingestão (ou inalação) de partículas com chumbo, sejam elas provenientes diretamente de solos ou de poeiras domésticas, é a principal via de contaminação humana, seja em crianças ou em adultos⁸, exceto trabalhadores envolvidos diretamente em atividades de metalurgia, mineração, separação, refino e reciclagem de materiais e compostos de chumbo, que pela sua atividade estão mais expostos e propensos à contaminação.

Segundo Brown *et al.*⁹ o risco associado à presença de elementos tóxicos no ambiente é influenciado por três fatores: quantidade total de metal presente no ambiente; sua toxicidade e, sua biodisponibilidade. O termo biodisponibilidade oral é definido como a fração da dose administrada que atinge a circulação sanguínea a partir do trato gastro-intestinal. Portanto, a dosagem de chumbo em sangue permite avaliar se o indivíduo teve exposição recente e se absorveu o metal. Para associar estes parâmetros com a sua fonte, diversos meios, como ar, água, solos, sedimentos e alimentos, podem ser amostrados e analisados. Dentre essas matrizes, solos são analisados com grande frequência, principalmente por métodos recomendados para tal finalidade, como os propostos pela agência de proteção ambiental americana (USA-EPA – métodos 3050B e 3051¹⁰). Por outro lado, já foi demonstrado que pode não haver correlação entre a quantidade total de chumbo em solos e a sua concentração no sangue de pessoas a eles expostas^{9,11}. Uma conclusão fundamental deste tipo de estudo é que a biodisponibilidade do chumbo depende também da especiação deste elemento, isto é, das fases em que ele se encontra nos solos, e não somente da sua concentração total. A Tabela 1 apresenta uma relação entre biodisponibilidade e a forma de ocorrência de chumbo, que se refere aos minerais em que ele se encontra, tamanho de partícula, se livre ou

encapsulado por minerais (p.ex., quartzo) ou materiais provenientes da metalurgia do Pb (escória).

Esta revisão teve como objetivo rever os métodos mais utilizados para avaliar a disponibilidade do chumbo em solos. Ênfase será dada aos ensaios que simulam o trato gastro-intestinal humano, os chamados testes *in vitro* ou de bioacessibilidade, que são usados para medir a quantidade de metal dissolvida se um solo contaminado é ingerido acidentalmente e, portanto, passível de absorção pelo organismo.

MÉTODOS PARA ESPECIAÇÃO DE CHUMBO EM SOLOS

A composição elementar, o estado físico e de oxidação, a fórmula empírica e a estrutura molecular são os atributos físico-químicos que caracterizam uma dada espécie química⁹. Nos solos, a reatividade e a solubilidade das diferentes espécies de chumbo controlam a biodisponibilidade e a toxicidade deste elemento. Por exemplo, a ordem de estabilidade dos minerais cerussita ($PbCO_3$) < anglesita ($PbSO_4$) < cloropiromorfita [$Pb_3(PO_4)_3Cl$] indica que se o chumbo estiver presente como cloro-fosfato, ele é menos solúvel e menos biodisponível⁸ que como cerussita. Portanto, a avaliação de riscos associados à presença de elementos ou compostos tóxicos implica na identificação das fases em que se encontra o elemento e na estimativa das suas respectivas reatividades e mobilidades.

A associação de dados de especiação com resultados de biodisponibilidade obtidos em testes com animais (*in vivo*) ou ensaios laboratoriais (*in vitro*) demonstrou a importância da espécie na sua reatividade biológica^{8,9,11,12}. Porém, a especiação não é o único fator controlador da solubilidade de chumbo se solos contaminados com este elemento forem acidentalmente ingeridos. Se as fases com chumbo estiverem encapsuladas por outros minerais, a cinética de reatividade destes pode ser determinante à solubilidade⁸. Por exemplo, a solubilidade de carbonatos e óxidos de chumbo tende a ser reduzida quando estes se encontram encapsulados por silicatos ou sulfetos¹².

A caracterização das fases de chumbo em solos, às vezes, é feita por meio de difração de raios X, microsonda eletrônica e de absorção de raios X (EXAFS – “extended X-ray absorption spectroscopy”), conforme apresentam Manceau *et al.*¹¹ e Davis *et*

Tabela 1. Tipo de ocorrência do Pb, fórmula química e produtos de solubilidade dos minerais e a biodisponibilidade

Ocorrência	Fórmula química	log K_{ps}	Biodisponibilidade
Minerais			
Anglesita	$PbSO_4$	7,7	Média
Cerussita	$PbCO_3$	12,8	Alta
Galena	PbS	-27,5	Baixa
Fluoropiromorfita	$Pb_3(PO_4)_3F$	-71,6	Baixa
Hidroxipiromorfita	$Pb_3(PO_4)_3OH$	-76,8	Baixa
Cloropiromorfita	$Pb_3(PO_4)_3Cl$	-84,4	Baixa
Hinsdalita	$PbAl_3(PO_4)(OH)_6SO_4$	-99,1	Baixa
Plumbogumita	$PbAl_3(PO_4)_2(OH)_5H_2O$	-99,3	Baixa
Corkita	$PbFe_3(PO_4)(SO_4)(OH)_6$	-112,6	Baixa
Tamanho de partícula			
Grande			Baixa
Pequena			Alta
Encapsulamento*			
Quartzo			Baixa
Material amorfo (escória)			Média
Óxidos de Fe-Pb			Média
PbO			Alta

*Composição do material que recobre partículas de Pb. adaptado da ref. 8

al.¹². Porém, essas técnicas somente são eficientes para identificar fases de chumbo quando sua concentração é significativa e/ou se essas fases puderem ser pré-concentradas ou separadas da matriz antes das medidas¹³. Isto nem sempre é possível, especialmente em solos, pois várias fases diferentes podem co-existir, geralmente em concentrações individuais inferiores aos limites de detecção das técnicas empregadas. A soma de sinais característicos dificulta sua interpretação e a identificação das fases individuais onde o chumbo se encontra¹⁴.

Métodos de extração seletiva

A caracterização da reatividade química de fases metálicas associadas às frações inorgânicas e orgânicas é uma forma muito rápida e indireta de determinar a disponibilidade de metais em matrizes ambientais. As extrações químicas parciais, sequenciais e seletivas são usadas para determinar em que fases se distribuem os diferentes elementos químicos de uma amostra, em geral de sedimentos ou solos. O método proposto por Tessier *et al.*¹⁵ é um dos mais citados e usados. Nele são empregadas soluções de reagentes seletivos, isto é, capazes de extrair para a fase líquida os elementos presentes em tipos específicos de fases, ou frações, por reações de troca iônica, oxidação-redução e dissolução. Os reagentes, em geral, aplicados sequencialmente à fase sólida, após a remoção da fase líquida da etapa anterior, e as frações, cuja composição é determinada são: $MgCl_2$ (1 mol L⁻¹, pH 7) = íons fracamente ligados à matriz e, portanto, mais móveis, também chamada de fração trocável; NaOAc (acetato de sódio) em pH 5 = fração carbonato, à qual se associam elementos cuja solubilidade depende do pH; $Na_2S_2O_4$ + citrato de sódio + ácido cítrico = (oxi)hidróxidos de ferro e manganês, que podem reter diversos metais e ânions por adsorção superficial e co-precipitação; $HNO_3 + H_2O_2$, em pH 2 = matéria orgânica (p.ex., ácidos húmicos e fúlvicos, microorganismos e detritos orgânicos diversos) que dentre outros mecanismos, complexa metais e, $HF + HClO_4$ = fase residual, que geralmente contém silicatos primários e secundários (formados por intemperismo). Se esta última etapa não for efetuada sob pressão, a permanência de um pequeno resíduo pode ser devida à presença de minerais resistentes ao intemperismo e a ataques químicos (p.ex., zircão).

As extrações sequenciais são muito utilizadas¹⁶ e, ao longo dos anos, variantes ao método de Tessier *et al.*¹⁵ foram introduzidas e alguns trabalhos de revisão reúnem a maior parte deles¹⁷. A padronização dos diferentes métodos foi proposta num protocolo harmonizado¹⁸, que consiste somente de três etapas. A reprodutibilidade do protocolo harmonizado foi avaliada num estudo interlaboratorial apresentado por Quevauviller *et al.*¹⁹, e posteriormente melhorado²⁰.

Uma das principais críticas aos métodos de extração sequencial é a falta de seletividade das soluções extratoras usadas. Outra deficiência, apontada por Baffi *et al.*²¹, é a influência da composição mineralógica da amostra na eficiência das extrações. Isto implicaria em validar cada esquema de extração sequencial em matriz semelhante à que se pretende estudar.

A disponibilidade de metais às vezes é avaliada pelo método TCLP²² ("Toxicity Characteristic Leaching Procedure" – método 1311), proposto pela EPA-EUA em 1994. Este método consiste em extrações parciais com ácido acético em pH 4,9 e 2,8, isto é, em condições que simulam a lixiviação realizada pela água da chuva ou por efluentes em locais contaminados. Assim como nos métodos de extração sequencial, o TCLP é utilizado especificamente para determinar a mobilidade de analitos inorgânicos e orgânicos e avaliar seu potencial tóxico de acordo com a quantidade de contaminante que é mobilizado da matriz.

Ensaio de biodisponibilidade *in vivo*

Os métodos discutidos anteriormente são úteis para avaliar a distribuição de metais em fases sólidas, mas a biodisponibilidade de contaminantes é avaliada por procedimentos mais específicos, capazes de simular uma exposição ao material contaminado. Dentre eles, destacam-se os testes *in vivo*, que empregam cobaias (ratos, coelhos, porcos e macacos) e humanos, e são muito usados nas áreas biomédica e farmacêutica, para determinar a biodisponibilidade efetiva de medicamentos, drogas ou de materiais contaminados, ao serem administrados diretamente na dieta de cobaias^{23,24}.

Vários testes padronizados de ensaios *in vivo*, para avaliar a absorção de metais pela ingestão de solos contaminados, foram sugeridos a partir de 1977, quando Dacre e Haar²⁵ determinaram a concentração de Pb em sangue e tecidos de ratos alimentados com solos contaminados por Pb. Tais testes abrangem desde a contaminação aguda até longos períodos de exposição²⁶. Nas cobaias, os efeitos tóxicos são avaliados por parâmetros como mortalidade, observações clínicas, exames funcionais e oftalmológicos, mudanças no peso corporal, mudanças na alimentação e no consumo de água. Já a biodisponibilidade é avaliada pela quantificação do chumbo presente no sangue, tecidos, órgãos, pêlos e ossos das cobaias²⁵, e pelas diferenças na absorção do chumbo quando há variações na composição química e física do solo, como tamanho das partículas, forma química predominante do chumbo na matriz e quantidade administrada.

Ratos, coelhos e porcos são as cobaias usadas nos testes *in vivo*, no intuito de simular a ingestão de materiais contaminados por humanos. Os ratos e coelhos, devido às suas características de alimentação e pH gástrico, são considerados bons simuladores do trato gastro-intestinal infantil²⁶, porém ensaios com porcos são os mais indicados para estimar a biodisponibilidade de Pb em solos. As características fisiológicas e anatômicas dos porcos, semelhantes às dos humanos, tornam sua resposta quase idêntica à de um ser humano que ingerisse o mesmo tipo de material²⁷.

A biodisponibilidade média de chumbo presente numa dieta comum (alimentos e água) de crianças varia de 40 a 53% e em adultos de 7-15%⁷. Para a ingestão de solos e poeiras, a EPA (EUA) propõe uma biodisponibilidade média de Pb em torno de 30%, enquanto para a água e a dieta ela é de 50%. Estes valores encontram-se no guia do software usado para simular a contaminação de seres humanos por ingestão de solos e materiais contaminados com Pb (IEUBK)²⁸. A biodisponibilidade atribuída aos solos provém de resultados de testes *in vivo* executados em porcos não adultos, com solos contendo diferentes fases de Pb, como galena, cerussita e adsorvido em (oxi)hidróxidos de Fe e Mn. Esses valores são apenas aproximações, pois a biodisponibilidade também depende de aspectos sócio-econômicos da população atingida. Por exemplo, a ingestão regular de alimentos contribui para reduzir a absorção de Pb no trato gastro-intestinal²⁹. A faixa etária média da população estudada também deve ser considerada, pois crianças (0-14 anos) absorvem mais Pb que adultos (maiores que 15 anos)⁸, bem como local de moradia³⁰, que influi na acessibilidade a poeiras e solos contaminados. Estas variáveis indicam que cada área pode requerer um estudo detalhado independente³⁰.

Um dos primeiros estudos *in vivo*, realizado com ratos, relacionou a biodisponibilidade com a espécie de Pb em solos³¹. Neste estudo, os ratos foram alimentados por 30 dias com quantidades diferentes de solos contaminados por atividades de mineração do distrito industrial de Butte, em Montana (EUA). Para o cálculo de biodisponibilidade, os valores de Pb encontrados no sangue e tecidos dos ratos foram comparados com valores de biodisponibilidade de um grupo de cobaias alimentadas com acetato de chumbo, $Pb(OAc)_2$, que é bastante solúvel. Os valores finais correspondem

à biodisponibilidade relativa, ou seja, o total absorvido dos solos em relação ao total absorvido do $Pb(OAc)_2$. Os dados permitiram avaliar a biodisponibilidade relativa média de 10% para os solos daquele distrito e de 68% para o $Pb(OAc)_2$. O baixo valor de biodisponibilidade dos solos administrados aos ratos deve-se à preponderância de anglesita e galena, que são fases mais estáveis de chumbo nas condições digestivas. O contrário acontece com o $Pb(OAc)_2$, já que sua solubilidade é elevada na faixa de pH encontrada nas soluções gastro-intestinais.

Davis *et al.*¹² e Ruby *et al.*²⁴ realizaram ensaios em coelhos, com solos e rejeitos de mineração do mesmo distrito (Butte, MO), e os resultados de biodisponibilidade, com média de 9%, são semelhantes aos de Freeman *et al.*³¹. Os resultados indicam que ratos e coelhos absorvem quantidade semelhante de Pb daqueles materiais e também comprovam que a composição mineralógica dos materiais contaminados controla sua biodisponibilidade.

Em outro estudo, Schoof *et al.*³² administraram amostras de solos e rejeitos de mineração de Sandy, Utah (EUA), além de quantidades controladas de $Pb(OAc)_2$ junto à alimentação de ratos por 31 dias. Neste estudo, as amostras continham sulfato, carbonato, fosfato, arsenato e uma fase amorfa de chumbo. A biodisponibilidade relativa do Pb nos materiais contaminados avaliados foi, em média, três vezes maior que a encontrada por Freeman *et al.*³¹, Davis *et al.*¹² e Ruby *et al.*²⁴. Os autores³² do estudo atribuíram os valores mais elevados de biodisponibilidade à presença nas amostras de espécies mais solúveis (como carbonatos, arsenatos e a fase amorfa).

A biodisponibilidade do Pb em dois solos do distrito industrial de Aspen, CO (EUA), foi avaliada em porcos por Casteel *et al.*³³. Com concentrações de 3800 e 14200 mg kg⁻¹, os solos apresentaram resultados de biodisponibilidade relativa, comparados com a biodisponibilidade de $Pb(OAc)_2$, de 63 e 64%. A alta biodisponibilidade encontrada, em comparação com métodos utilizando ratos e coelhos, é atribuída pelos autores a fatores como a fisiologia dos suínos, que excretam comparativamente menos bile que ratos e coelhos, mas aproximadamente a mesma que crianças. Outra comprovação do estudo é que a quantidade total de Pb não é determinante na sua biodisponibilidade. Apesar da diferença nas concentrações de Pb nos solos testados, os respectivos valores de biodisponibilidade tiveram uma diferença relativa de 1%.

Os testes *in vivo* para avaliar a biodisponibilidade de Pb em solos contaminados são considerados confiáveis, mas eles devem ser realizados por profissionais especializados e com infra-estrutura específica, que nem sempre se encontram disponíveis. Outros fatores a considerar são os custos elevados e o tempo requerido. Esses aspectos dificultam a aplicação dos ensaios *in vivo* e estimularam o desenvolvimento de uma metodologia mais simplificada, rápida, relativamente confiável e barata, baseada em ensaios laboratoriais *in vitro*.

Sugerido por Ruby *et al.*²⁴, o chamado teste de bioacessibilidade *in vitro* é um ensaio laboratorial que simula as condições físico-químicas das soluções encontradas no estômago e no duodeno humanos e é usado para estimar a quantidade de Pb (ou outro contaminante) absorvida, caso material contaminado seja ingerido. Este tipo de teste reúne características para uma avaliação de risco rápida e confiável. A bioacessibilidade oral de uma substância foi definida como a fração solúvel nas condições do trato gastro-intestinal e que está disponível para absorção⁸. Ainda segundo Ruby *et al.*²⁴, todo o chumbo dissolvido é passível de ser absorvido. Isto inclui o chumbo que permanece solúvel tanto na forma livre ou combinado a ligantes orgânicos pequenos, bem como também o que depois de dissolvido se liga a espécies de peso molecular elevado ou que ao entrar no duodeno é sorvido à superfície de partículas presentes.

Ensaio de bioacessibilidade *in vitro*

Os testes de bioacessibilidade *in vitro*, recentemente revisados³⁴, baseiam-se na fisiologia do trato gastro-intestinal²⁴ e simulam as condições da digestão humana. No lugar da saliva e dos sucos gástrico e duodenal naturais, são usadas soluções artificiais que simulam o meio de cada um dos compartimentos digestivos. Alguns autores (e.g. Basta e Gradwohl³⁵) empregam métodos de extração seletiva como ensaios de bioacessibilidade, porém nesta revisão apenas os testes que simulam o trato digestivo humano serão considerados.

Assim como em todos os métodos discutidos acima, há vantagens e desvantagens no uso dos diversos ensaios de bioacessibilidade *in vitro* propostos a partir do trabalho de Ruby *et al.*²⁴. A escolha de um determinado método baseia-se na sua validação, em geral, com base na comparação de resultados de testes *in vivo*, na fidelidade da simulação das condições fisiológicas humanas e, também, na adequação à infra-estrutura disponível. É importante ressaltar que os testes de bioacessibilidade não incluem os microrganismos presentes no trato digestivo e não consideram os mecanismos de absorção que ocorrem preferencialmente no epitélio duodenal. Uma simulação *in vitro* da absorção de Pb por parte de células do duodeno foi efetuada por Oomen *et al.*³⁶, porém não será escopo desta revisão.

As soluções simuladoras do trato gastro-intestinal, empregadas nos testes de bioacessibilidade, contêm enzimas, aminoácidos, sais orgânicos e inorgânicos e ácido clorídrico. Em geral, pepsina e pancreatina são as enzimas usadas. A pepsina é uma enzima ácida cuja função é metabolizar proteínas e a pancreatina, secretada no duodeno, é uma mistura de enzimas capazes de metabolizar proteínas, gorduras e carboidratos complexos³⁷. A glicina, o aminoácido mais simples produzido pelo corpo humano, é utilizada em alguns testes e age tamponando a solução gástrica simulada, devido ao caráter anfótero da sua molécula. Alguns exemplos de sais inorgânicos utilizados são NaCl, KCl, KSCN e Na₂HPO₄, a depender do meio simulado. Os sais orgânicos são utilizados para simular a bile humana, e geralmente são empregados compostos sintéticos derivados do ácido cólico, que funcionam como emulsificantes nas soluções duodenais. Além desses reagentes, outras condições do sistema digestivo humano, como temperatura, tempo de contato entre o sólido e o biofluido e pH do meio também são reproduzidas.

Nos primeiros ensaios de bioacessibilidade, Davis *et al.*¹² e Ruby *et al.*²⁴ estimaram a solubilidade de chumbo dos solos do distrito industrial de Butte, MT (USA), e compararam os resultados de bioacessibilidade com os resultados de biodisponibilidade obtidos em ensaios *in vivo* com coelhos, já mencionados. Davis *et al.*¹² simularam as condições estomacais com uma mistura aquosa de HCl (pH 1,3) junto com ração de coelhos rica em fibra, e o intestino com uma solução de NaHCO₃ (pH 7,0) e obtiveram valores baixos de solubilidade na solução intestinal, em torno de 0,18% em relação ao Pb total das amostras. Por outro lado, em ensaios *in vivo* executados paralelamente, a solubilidade média de Pb foi quantificada em 5,6%. A diferença entre experimentos *in vivo* e *in vitro* foi atribuída à composição das soluções, que necessitariam conter componentes do fluido intestinal, capazes de se ligar ao Pb e mantê-lo em solução (p.ex., proteínas, enzimas ou ligantes orgânicos).

Ruby *et al.*²⁴ introduziram ácidos orgânicos (acético, málico e láctico) na solução simuladora do fluido gástrico, enquanto na solução duodenal foram adicionados pancreatina, extratos de bile e NaHCO₃. Desta forma conseguiram resultados de solubilidade *in vitro* mais próximos (4%) dos obtidos nos ensaios *in vivo* em coelhos (9%), realizados concomitantemente e com as mesmas amostras. Nesse trabalho²⁴, foi empregada razão sólido/líquido de 1:10,

que é considerada a mais próxima da quantidade de fluido gástrico produzido no estômago de coelhos, utilizados para validar o método *in vitro* e o pH inicial de 1,3 foi aumentado gradualmente na transição entre as soluções do estômago e do duodeno. Com os resultados obtidos, Ruby *et al.*²⁴ demonstraram que é possível estimar a quantidade de chumbo passível de absorção, a partir da sua solubilidade em fluidos semelhantes aos do trato gastro-intestinal.

O mesmo teste, denominado PBET³⁸ (“Physiologically Based Extraction Test”) foi aplicado às amostras dos estudos *in vivo* de Freeman *et al.*³¹ e Schoof *et al.*³². Foram sugeridas pequenas alterações no método de Davis *et al.*¹², como a adição da pancreatina e os sais de bile ao meio intestinal só após a solução duodenal atingir o equilíbrio em pH 7 com a adição de NaHCO₃, e a razão sólido/líquido, ajustada para 1:100, para empregar a quantidade representativa de amostra (0,4 g) e de fluido gástrico produzido por uma criança em jejum (40 mL). A variação do pH do estômago também foi utilizada para avaliar as condições do estômago quando em jejum (pH 1,3) e logo após a ingestão de alimentos (pH 4,0), e também em pH 2,5 usado como valor médio. Os resultados foram comparáveis aos de biodisponibilidade obtidos em ratos por Freeman *et al.*³¹ (10%) e Schoof *et al.*³² (36%), principalmente na fase gástrica e com pH 2,5. Para a fase intestinal, devido a maior complexidade, tanto da solução simulada quanto das condições intestinais dos ratos, os resultados apresentam as maiores diferenças relativas entre métodos e pouca reprodutibilidade. Segundo os autores, apesar da falta de precisão, essas diferenças não invalidam o teste *in vitro*, que apesar de superestimar a biodisponibilidade, poderia ser aplicado quando não há possibilidade de uma avaliação *in vivo*.

O consórcio para pesquisas em solubilidade e biodisponibilidade (SBRC), fundado em 1997⁸, com o objetivo de validar um método eficaz de bioacessibilidade, propôs um teste bastante simples, chamado SBET³⁹ (“Simple Bioaccessibility Extraction Test”), uma adaptação simplificada do PBET. O SBET apenas faz a simulação da fase gástrica, com solução de ácido clorídrico e glicina, em pH 1,5. Este teste fornece resultados superestimados de bioacessibilidade, devido ao baixo pH do meio e à ausência de uma fase intestinal. Com este método, cerca de 90% do Pb total presente no material de referência certificado de solo SRM 2711 (NIST) foi dissolvido. Este resultado pode ser interpretado como a quantidade máxima de Pb solúvel deste material, nas condições gástricas.

Hamel *et al.*⁴⁰ avaliaram a influência da razão sólido/líquido nos experimentos de bioacessibilidade, com outro material de referência certificado de solo, o SRM 2710 (NIST). Ao simular apenas a fase gástrica, com uma solução simples de pepsina e HCl em pH 1,1, obtiveram valores de solubilidade de chumbo entre 36% (1:100), 34% (1:1000) e 42% (1:5000) no solo certificado para as razões sólido líquido indicadas entre parênteses. Os resultados serviram como base para o desenvolvimento de um novo teste⁴¹, mais detalhado e completo, com mais duas etapas, as soluções da boca e do duodeno.

A composição da solução artificial da saliva humana usada foi a sugerida por Fusayama *et al.*⁴² para avaliar a solubilidade de ouro e amálgama em ensaios odontológicos. A solução contém sais inorgânicos (NaCl, KCl, Na₂HPO₄ e CaCl₂), mucina e uréia em pH 5,5. Já a solução gástrica é simulada apenas com HCl e pepsina em pH 1,5 e a solução duodenal contém apenas Na₂HCO₃. Os autores propõem o uso de um balanço de massas, ou seja, um protocolo de cálculos baseado nas solubilidades do Pb em cada etapa da extração (saliva+gástrica e saliva+gástrica+duodenal) e obtêm um valor combinado onde está expressa a massa total solúvel de Pb ao longo da simulação. O teste foi aplicado em amostras de solo, rejeitos de metalurgia de Pb e no SRM 2710. A bioacessibilidade de Pb em amostra de solo de Bunker Hill foi de 70% e de 62% para o SRM

2710. Estes resultados foram comparados com estudos de biodisponibilidade executados em humanos pela Columbia School of Public Health⁴³, com a amostra de Bunker Hill, porém houve uma grande diferença entre eles, pois apenas 26%, em média, do Pb presente na amostra é biodisponível. Essa discrepância entre os dados de ensaios *in vivo* e *in vitro*, de acordo com os autores⁴¹, poderia estar associada à absorção incompleta das espécies dissolvidas no epitélio intestinal. Esta diferença entre chumbo dissolvido e absorvido provavelmente é a principal limitação dos testes *in vitro*, como substitutos dos testes *in vivo*.

Com o mesmo método⁴¹, Ellickson *et al.*⁴⁴ quantificaram apenas 10% do Pb do SRM 2710 como bioacessível. Concomitantemente, em testes realizados com ratos, foi obtida biodisponibilidade máxima de 0,9%. De acordo com os autores⁴⁴, essa diferença pode ser atribuída à grande quantidade de bile secretada pelos ratos, que poderia interferir na especiação e, conseqüentemente, na absorção do chumbo, o que também foi discutido em outros estudos^{27,31}.

A simulação mais complexa e próxima da composição real do suco gastro-intestinal humano é apresentada por Oomem *et al.*⁴⁵, mas ainda sem a atividade dos microorganismos presentes nas partes superior (boca+estômago) e inferior (duodeno+jejuno+íleo) do sistema digestivo humano. A saliva é simulada com pequenas quantidades de KCl, KSCN, NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaCl, NaOH, uréia, mucina, ácido úrico e α -amilase. O suco gástrico é constituído dos mesmos sais inorgânicos usados na simulação da saliva, acrescido de HCl, glicose, ácido glucorônico, uréia, gluceosamina, albumina, pepsina e mucina. O duodeno é simulado com bile extraída de frangos, sais inorgânicos (NaCl, KCl e MgCl), uréia, albumina, pancreatina e lípase. A bioacessibilidade média do Pb presente nos solos testados foi de 54%. Este resultado é semelhante ao obtido com soluções menos complexas.

A fração bioacessível de chumbo pela ingestão de materiais contaminados também pode ser estimada pela adição de alimentos no ensaio. Schroder *et al.*⁴⁶ simularam a fase gástrica com uma solução de pepsina e HCl, em pH 1,8 e a fase duodenal com NaHCO₃, extratos de bile e pancreatina e também extrato de proteínas para avaliar a influência do bolo alimentar na solubilidade do Pb. Os resultados mostraram uma bioacessibilidade máxima, na simulação do organismo em jejum, de 64% (meio gástrico) e 3,2% (meio duodenal), com médias de 36 e 1%, respectivamente, em um conjunto de 18 amostras de diferentes concentrações (1270 a 14200 mg kg⁻¹). A adição do extrato de proteínas reduziu a quantidade média de Pb solúvel na etapa gástrica para 23%, com valor máximo de 36%. Estes resultados foram comparados, no mesmo estudo, com os obtidos em ensaios *in vivo* em porcos, aos quais foi administrada a mesma alimentação e os mesmos solos. Os resultados dos dois ensaios apresentaram correlação forte, exceto os da fase duodenal na ausência do extrato de proteínas. Os autores concluíram que o ensaio *in vitro* pode ser usado para estimar a biodisponibilidade relativa de Pb, As e Cd em solos.

A bioacessibilidade do Pb em poeiras oriundas de solos contaminados também pode ser avaliada com testes *in vitro*. Yu *et al.*⁴⁷ aspiraram poeiras de carpetes de residências próximas a um distrito industrial de New Jersey (EUA) e usaram o método proposto por Hamel *et al.*⁴¹. Os resultados indicam elevada solubilidade relativa de chumbo nessas poeiras, com valor de até 77% (média de 64%) na solução gástrica e de até 32% (média de 12%) na solução duodenal. Os dados de bioacessibilidade foram aplicados ao modelo computacional IEUBK²⁸ (“Integrated Exposure Uptake Biokinetic Model for Lead in Children”). Os resultados indicaram que há correlação entre os dados de bioacessibilidade do Pb obtidos com a simulação gástrica e os níveis de Pb no sangue de crianças expostas às poeiras.

Além dos métodos discutidos e revisados neste trabalho, ou-

Tabela 2. Principais métodos de bioacessibilidade, tipo de experimento, constituintes das soluções simuladas, pH e tempo de contato de cada simulação. Todos testes são executados em temperatura controlada (37 °C), na proporção sólido:líquido (S/L) indicada. O último (TIM) é realizado em fluxo

Método	Solução simulada	pH	S/L	Tempo (h)	Ref.
SBET	Gástrica – Glicina	1,5	1/100	1	39
PBET	Gástrica – Pepsina, ac. málico, ac. acético, ac. láctico e ac. cítrico	2,5	1/100	1	38
IVG	Intestinal – Pancreatina, sais de bile e NaHCO ₃	7,0		3	
	Gástrica – Pepsina e NaCl	1,8	1/150	1	46
U.S.P	Intestinal – Pancreatina, extrato de bile e NaHCO ₃	5,5		1	
	Gástrica – Pepsina e NaCl	1,2	1/100	2	40
MB & SR	Saliva – Mucina, uréia, Na ₂ HPO ₄ , CaCl ₂ , KCl, NaCl	5,5	1/160	5 s	41
	Gástrica – Pepsina e NaCl	1,5	1/2160	2	
DIN	Intestinal – NaHCO ₃	7,0	1/4770	4	
	Gástrica – Pepsina, mucina	2,0	1/15	2	48
	Intestinal – Tripsina, pancreatina e extrato de bile	7,5	1/50	6	
SHIME	Gástrica – Pectina, Nutrilon plus, mucina, amido, cellobiose, glucose, proteose peptona e leite	5,2	1/2,5	3	39
	Intestinal – Pancreatina, blie bovina e NaHCO ₃	6,5	1/4	5	
RIVM	Saliva – Mucina, amilase, uréia, ac. úrico, NaOH, NaCl, KCl, Na ₂ SO ₄ , NaSCN	6,5	1/15	5 min	39
	Gástrica – Pepsina, glucose, ac. glucorônico, glucoseamina, BSA, mucina	1,1	1,40	2	
	Intestinal – Lípase, pancreatina, uréia, BSA e extratos de bile	5,5	1/100	2	
TIM	Saliva – Não especificado	5,0	1/5	5 min	39
	Gástrica – Lípase, pepsina	2,0	1/30	1,5	
	Intestinal – Pancreatina, extrato de bile, NaHCO ₃	7,2	1/50	6	

SBET- Simple Extraction Bioaccessibility Test; PBET- Physiologically Based Extraction Test; IVG- *In vitro* Gastrointestinal model; U.S.P- U.S. Pharmacopeia gastric model; MB & SR- Mass Balance and Soil Recapture; DIN- Static gastrointestinal model; SHIME- Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystems of Infants; RIVM- *In Vitro* Digestion model; TIM- Dynamic Gastrointestinal model.

Tabela 3. Comparação de resultados de bioacessibilidade de Pb (valores mínimos e máximos) obtidos em solos contaminados, suas respectivas concentrações e método utilizado

Tipo de amostra	Concentração (mg kg ⁻¹)	Método	Fluido simulado	Pb bioacessível (%)	Ref.
Solo (poeiras)	2600	PBET	Gástrico	77	49
Solos	1600-16200	PBET	Gástrico	11-37	50
Solos	400-4000	PBET	Gástrico + Duodenal	13-64	51
Solos	150-4800	SBET	Gástrico + Duodenal*	0,5-85	52
Solos	4000-7000	W-PBET**	Gástrico + Duodenal	12-27	53
Solos	215-1580	SBET	Gástrico	46-50	54
Solos	500-5000	Hamel ^{40,41}	Gástrico	50-80	55

*Simulação duodenal feita com NaHCO₃; ** PBET adaptado para simulação do trato gastro-intestinal de gansos

tros podem ser encontrados na literatura. A Tabela 2 resume alguns destes trabalhos, com o nome do método, as soluções empregadas e as condições experimentais de cada um deles. Alguns testes, como o DIN e o SHIME, também avaliam o efeito da adição de alimentos (leite, proteínas ou amido) na bioacessibilidade do Pb, simulando as condições gastro-intestinais após a alimentação.

A Tabela 3 apresenta uma comparação dos resultados de bioacessibilidade de Pb, em solos, apresentados na literatura. Os trabalhos podem apresentar algumas diferenças quanto à execução do método, como o tipo de agitação da solução+amostra, separação das frações e técnica analítica usada para determinar o chumbo na fração solúvel mas, de modo geral, apresentam os princípios dos métodos originais.

CONCLUSÕES

A presença de materiais contaminados em locais habitados ou remotos é indesejável à biota. Mas com frequência a sociedade se depara com a presença de concentrações anômalas e elevadas de elementos tóxicos em locais habitados. A origem destas anomalias pode ser geológica, mas muitas vezes é antrópica e, em geral, o risco associado deve ser avaliado. No caso do chumbo, bem como de muitos outros elementos-traço, a presença de elevadas concentrações em solos, por si só não é suficiente para tirar conclusões, pois a biodisponibilidade depende da sua especiação na matriz considerada.

A determinação da(s) fase(s) em que se encontra o chumbo idealmente é feita por meio de técnicas instrumentais, mas muitas

vezes a concentração individual das fases não é suficiente para a identificação, e a mistura de fases também pode adicionar dificuldades adicionais à caracterização. Apesar disto, a avaliação de risco objetiva responder se a ingestão acidental dos solos ou de suas poeiras implica em absorção do chumbo pelo organismo humano, especialmente por crianças, que são mais suscetíveis. Extrações sequenciais podem ser úteis na avaliação da solubilidade das frações com chumbo, mas não respondem à questão da solubilidade em condições gastro-intestinais.

Para efeito de avaliação de risco, os órgãos gestores do meio ambiente empregam dados de biodisponibilidade realizados com cobaias. Mas os testes *in vivo*, pelas suas características, requerem infra-estrutura e pessoal especializado, demandam tempo e são caros. Para superar essas limitações, vários ensaios de bioacessibilidade ou testes *in vitro*, executados em condições que tentam simular as condições físico-químicas do trato gastro-intestinal humano, foram propostos, testados e muitas vezes validados por comparação com resultados de testes *in vivo*. Os resultados destes ensaios são reprodutíveis e apesar de muitas vezes superestimarem a biodisponibilidade, são úteis porque a estimam de maneira confiável e rápida. Os testes de bioacessibilidade *in vitro* despertam grande interesse, empregam materiais e reagentes facilmente encontrados e possibilitam a avaliação de muitas amostras simultaneamente. Apesar disto, vários aspectos ainda devem ser melhorados, principalmente no que se refere às diferenças com os resultados de ensaios *in vivo*, a fim de limitar o uso destes.

REFERÊNCIAS

- Paoliello, M. M. B.; De Capitani, E. M.; *Rev. Environ. Contam. T.* **2005**, *184*, 59.
- Wedepohl, K. H.; *Geochim. Cosmochim. Acta* **1995**, *59*, 1217.
- Moreira, F. R.; Moreira, J. C.; *Pan American Journal of Public Health* **2004**, *15*, 119; Barbosa Jr., F.; Tanus-Santos, J. E.; Gerlach, R. F.; Parsons, P. J.; *Environ. Health Persp.* **2005**, *113*, 1669.
- Strydom, C.; Robinson, C.; Pretorius, E.; Whitcutt, J. M.; Marxand, J.; Bornman, M. S.; *Water SA* **2006**, *32*, 543.
- Claudio, E. S.; Goldwin H. A.; Magyar J. S.; *Prog. Inorg. Chem.* **2003**, *51*, 1.
- Koller, K.; Brown T.; Spurgeon J.; Levy, L.; *Environ. Health Persp.* **2004**, *112*, 987.
- Oomen, A. G.; Tolls, J.; Sips, A. J. A. M.; Groten, J. P.; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2003**, *44*, 116.
- Ruby, M. V.; Schoof, R.; Brattin, W.; Goldade, M.; Post, G.; Harnois, M.; Mosby, D. E.; Casteel, S. W.; Berti, W.; Carpenter, M.; Edwards, D.; Cragin, D. W.; Chappell, W.; *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 3697.
- Brown, G. E. Jr; Foster, A. L.; Ostergren, E.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1999**, *96*, 3388
- http://www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/3_series.htm, acessada em Dezembro 2006.
- Manceau, A.; Boisset M.; Sarret, G.; Hazemann, J.; Mench, M.; Cambier, P.; Prost, R.; *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 1540.
- Davis, A.; Ruby, M. V.; Bergstrom, P. D.; *Environ. Sci. Technol.* **1992**, *26*, 461.
- Ostergren, J. D.; Brown, G. E. Jr; Parks, G. A.; Tingle, T. E.; *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 1627.
- Bargar, J. R.; Towle, S. N.; Brown, G. E. Jr; Parks, G. A.; *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *185*, 473.
- Tessier, A.; Campbell, P. G. C.; Bisson, M.; *Anal. Chem.* **1979**, *51*, 844.
- Kim, N. D.; Fergusson J. E.; *Sci. Total Environ.* **1990**, *105*, 191; Sims, J. T.; Kline, J. S.; *J. Environ. Qual.* **1991**, *20*, 387; Sheppard, M. I.; Thibault D. H.; *Soil Sci. Soc. Am. J.* **1992**, *56*, 415.
- Gleyzes, C.; Tellier, S.; Astruc, M.; *Trends Anal. Chem.* **2002**, *21*, 461; Hlavay, J.; Prohaska, T.; Weisz, M.; Wenzel, W. W.; Stingeder, G. J.; *Pure Appl. Chem.* **2004**, *76*, 415.
- Ure, A.; Quevauviller, P.; Muntau, H.; Griepink, B.; *Int. J. Environ. Anal. Chem.* **1993**, *51*, 135.
- Quevauviller, P.; Rauret, G.; Muntau, H.; Ure, A. M.; Rubio, R.; LopezSanchez, J. F.; Fiedler, H. D.; Griepink, B.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1994**, *349*, 808.
- Rauret, G.; Lopez-Sanchez, J. F.; Sahuquillo, A.; Rubio, R.; Davidson, C.; Ure, A.; Quevauviller, P.; *J. Environ. Monit.* **1999**, *1*, 57.
- Baffi, F.; Ianni, C.; Ravera, M.; Soggia, F.; Magi, E.; *Anal. Chem. Acta* **1998**, *360*, 27.
- Environmental Protection Agency, USA; *Method 1311 – Toxicity Characteristic Leaching Procedure*, 1994.
- Sandstea, H. H.; *P. Soc. Exp. Biol. Med.* **1967**, *124*, 18.
- Ruby, M. V.; Davis, A.; Link, T. E.; Schoof, R.; Chaney, R. L.; Freeman, G. B.; Bergstrom, P.; *Environ. Sci. Technol.* **1993**, *27*, 2870.
- Dacre, J. C.; Haar, T.; *Environ. Contaminants Toxicol.* **1977**, *6*, 11.
- Organisation for Economic Co-operation and Development; *OECD Guideline 407*, 1995; *OECD Guideline 408*, 1998; *OECD Guideline 409*, 1998.
- Hettiarachchi, G. M.; Pierzynski, G. M.; *Environ. Prog.* **2004**, *23*, 78.
- Environmental Protection Agency, USA; *User's guide for the integrated exposure uptake biokinetic model for lead in children (IEUBK)*, 2002.
- Heard, M. J.; Chamberlain, A. C.; *Sci. Total Environ.* **1983**, *30*, 245.
- Lanphear, B. P.; Matte, T. D.; Rogers, J.; Clickner, R. P.; Dietz, B.; Bornschein, R. L.; Succop, P.; Mahaffey, K. R.; Dixon, S.; Galke, W.; Rabinowitz, M.; Farfel, M.; Rohde, C.; Schwartz, J.; Ashley, P.; Jacobs, D. E.; *Environ. Res.* **1998**, *79*, 51.
- Freeman, G. B.; Johnson, J. D.; Killinger, J. M.; Liao, S. C.; Feder, P. I.; Davis, A. O.; Ruby, M. V.; Chaney, R. L.; Lovre, S. C.; Bergstrom, P. D.; *Fund. Appl. Toxicol.* **1992**, *19*, 388.
- Schoof, R. A.; Butcher, M. K.; Sellstone, C.; Ball, R. W.; Fricke, J. R.; Keller, V.; Keen, B.; *Environ. Geochem. Health* **1995**, *17*, 189.
- Casteel, S. W.; Cowart, R. P.; Weis, C. P.; Henningsen, G. M.; Hoffman, E.; Brattin, W. J.; Guzman, R. E.; Starost, M. F.; Payne, J. T.; Stockham, S. L.; Becker, S. V.; Drexler, J. W.; Turk, J. R.; *Fundam. Appl. Toxicol.* **1997**, *36*, 177.
- Intawongse, M.; Dean, J. R.; *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2006**, *25*, 876.
- Basta, N.; Gradwohl, R.; *J. Soil Contam.* **2000**, *9*, 149.
- Oomen, A. G.; Tolls, J.; Sips, A. J. A. M.; van den Hoop, M. A. G. T.; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2003**, *44*, 107.
- Guyton, A. C.; Hall, J. E.; *Tratado de Fisiologia Médica*, 11th ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 2006.
- Ruby, M. V.; Davis, A.; Schoof, R.; Eberle, S.; Sellstone, C. M.; *Environ. Sci. Technol.* **1996**, *30*, 422.
- Oomen, A. G.; Hack, A.; Minekus, M.; Zeijdner, E.; Cornelis, S. C.; Schoeters G.; Verstraete, W.; van de Wiele, T.; Wragg, J.; Rompelberg, C. J. M.; Sips, A.; van Wijnen J. H.; *Environ. Sci. Technol.* **2002**, *36*, 3326.
- Hamel, S. C.; Buckeley, B.; Liroy, P. J.; *Environ. Sci. Technol.* **1998**, *32*, 358.
- Hamel, S. C.; Ellickson, K. M.; Liroy, P. J.; *Sci. Total Environ.* **1999**, *244*, 273.
- Fusayama, T.; Nomoto, S.; Katayori, T.; *J. Dent. Res.* **1963**, *42*, 1183.
- Maddaloni, M.; Lolocono, N.; Manton, W.; Blum, C.; Drexler, J.; Graziano, J.; *Environ. Health Perspect.* **1998**, *106* (Suppl 6), 1589.
- Ellickson, K. M.; Meeker, R. J.; Gallo, M. A.; Buckley, B. T.; Liroy, P. J.; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2001**, *40*, 128.
- Oomen, A. G.; Rompelberg, C. J. M.; Bruil, M. A.; Dobbe, C. J. G.; Pereboom, D. P. K. H.; Sips, A. J. A. M.; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **2003**, *44*, 281.
- Schroder, J. L.; Basta, N. T.; Casteel, S. W.; Evans, T. J.; Payton, M. E.; Si, J.; *J. Environ. Qual.* **2004**, *33*, 513.
- Yu, C. H.; Yiin, L.; Liroy, P. J.; *Risk Analysis* **2006**, *1*, 125.
- Hack, A.; Selenka, F.; *Toxicol. Lett.* **1996**, *88*, 199.
- Sonmez, O.; Pierzynski, G. M.; *Water, Air, Soil Pollut.* **2005**, *166*, 3.
- Carrizales, L.; Razo, I.; Tellez-Hernandez, J. I.; Torres-Nerio, R.; Torres, A.; Batres, L. E.; Cubillas, A. C.; D1az-Barriga, F.; *Environ. Res.* **2006**, *101*, 1.
- Lee, S. W.; Lee, B. T.; Kim, J. Y.; Kim, K. W.; Lee, J. S.; *Environ. Mont. Assess.* **2006**, *119*, 233.
- Navarro, M. C.; Perez-Sirvent, C.; MartInez-Sanchez, M. J.; Vidal, J.; Marimon, J.; *Chemosphere* **2006**, *63*, 484.
- Furman, O.; Strawn, D. G.; Heinz, G. H.; Williams, B.; *J. Environ. Qual.* **2006**, *35*, 450.
- Edwin F.; Barth, E. F.; Succop, P. A.; Evans, M. L.; *Environ. Mont. Assess.* **2005**, *110*, 257.
- Kientz, K.; Jimenez, B. D.; Perez, L.; Rodríguez-Sierra, C. J.; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **2003**, *70*, 927.