

**AValiação dos Métodos Analíticos para a Determinação de Metabólitos do Benzeno como Potenciais Biomarcadores de Exposição Humana ao Benzeno no Ar****Mauricio Xavier Coutrim**

Departamento de Química - ICEB - Universidade Federal de Ouro Preto - Campus Morro do Cruzeiro - 35400-000 - Ouro Preto - MG

**Lilian R. F. de Carvalho**

Instituto de Química - Universidade de São Paulo - CP 26077 - 05513-970 - São Paulo - SP

**Arline Sydneia Abel Arcuri**

FUNDACENTRO - R. Capote Valente, 710 - 05409-002 - São Paulo - SP

Recebido em 21/7/99; aceito em 16/3/00

**EVALUATION OF THE ANALYTICAL METHODS TO DETERMINATE BENZENE METABOLITES AS POTENTIAL BIOMARKERS FOR DETERMINING HUMAN EXPOSURE TO BENZENE IN AIR.** Increasing attention is being paid to the use of biomarkers for determining the exposure of humans to air toxics. Biomarkers include the nonreacted toxic substance, their metabolites, or the reaction products of these toxics with naturally substances in the body. Significant progress has been made in the measurement of biomarkers during the past several years. Much of this progress has been because of the development of advanced analytical techniques for identification and quantification of the chemical species in complex matrix, such as biological fluids. The assessment of the potential cancer risk associated with exposure to benzene at occupational and non-occupational ambient is necessary because of the toxicological implications of this air pollutant. Thus, in this review, the analytical methodologies used to determine the benzene metabolites, in special, urinary muconic acid and S-phenylmercapturic acid, are described and several problems affecting the precision of these procedures are discussed. Finally, in view of the difficulty pointed out for selecting the more adequate biomarker, further studies to evaluate the human exposure levels to benzene should be done.

**Keywords:** human exposure to air benzene; biomarkers; muconic acid determination; S-phenylmercapturic acid determination.

**INTRODUÇÃO**

O benzeno, um composto reconhecidamente carcinogênico, é uma substância onipresente na atmosfera devido às contribuições de emissões biogênicas e principalmente antropogênicas. Para algumas emissões antropogênicas, aquelas provenientes de indústrias que produzem ou manuseiam o benzeno, o controle deste poluente tem sido feito regularmente, entretanto, para outras não se têm o conhecimento de suas concentrações e implicações ambientais. Estima-se que mundialmente cerca de dois milhões de trabalhadores estejam expostos ocupacionalmente ao benzeno a cada ano<sup>1</sup>. Contudo, estratégias para reduzir o nível de exposição têm sido feitas para assegurar uma melhoria na qualidade de vida desses trabalhadores, como a melhoria de tecnologia dos meios de produção, a presença das políticas de vigilância à saúde ocupacional, a tendência mundial de substituição do benzeno como solvente nos processos industriais e o avanço tecnológico para a determinação de espécies no ar em concentrações muito baixas. Por outro lado, o aumento gradativo da concentração de benzeno em atmosferas urbanas tem indicado que a exposição ao benzeno em ambientes não ocupacionais não pode ser desprezada. Apesar das concentrações de benzeno em ambientes ocupacionais atingirem níveis até 100 vezes maiores do que em outros ambientes<sup>2</sup>, a exposição ao benzeno não ocupacional deve merecer atenção especial por se tratar de composto genotóxico e consequentemente sem limite seguro de exposição<sup>2,3</sup>. Além disso, o número de pessoas expostas em ambientes não ocupacionais é muito maior do que em ambientes de trabalho.

O benzeno pode ser proveniente de emissões antropogênicas não industriais, como por exemplo, gases de escapamento de veículos automotores e fumaça de cigarro. A emissão de

benzeno por veículos movidos à gasolina tem aumentado consideravelmente após a substituição parcial ou completa dos compostos antidetonantes contendo chumbo por benzeno e outros hidrocarbonetos aromáticos<sup>1</sup>. O controle deste poluente em ambientes de ar externo e interno, entretanto, não têm sido comumente realizado. Além disso, em grandes centros urbanos de muitos países do mundo não se tem idéia de quanto este poluente pode estar afetando a saúde de seus habitantes.

Uma grande preocupação com relação à exposição humana por benzeno em ambientes não ocupacionais recai sobre a atmosfera de grandes centros urbanos e ambientes internos com fumantes, em especial ambientes com circulação deficiente de ar. Assim, vários estudos em grande escala foram realizados para identificar e quantificar as principais fontes de benzeno em diversos ambientes<sup>4</sup>.

Um dos estudos mais importantes, TEAM-*Total Exposure Assessment Methodology Study*, foi realizado na década de 80 pela agência governamental americana US-EPA (*United States - Environmental Protection Agency*) e teve como objetivo principal avaliar a exposição humana à compostos orgânicos voláteis (COVs) presentes no ar e na água potável. Neste trabalho, muitas atividades normais diárias foram identificadas como fontes de exposição aos COVs<sup>5</sup>. Através de medidas do ar em ambientes internos e externos, medidas da água potável e do ar exalado, foram avaliadas as exposições de 800 pessoas distribuídas em 8 localidades diferentes dos Estados Unidos representando uma população de 800 mil pessoas. Os resultados deste estudo<sup>4</sup> mostraram aspectos importantes que auxiliam no entendimento sobre as possíveis rotas de contaminação pelo benzeno em ambientes não ocupacionais. Por exemplo: não foram encontradas quantidades significativas de benzeno na água potável, alimentos e bebidas; a concentração média de

benzeno na zona de respiração das pessoas em estudo, em média, foi maior do que no ar de ambientes internos e, por sua vez, foi maior que em exteriores; a concentração média de benzeno na zona de respiração de moradores vizinhos às indústrias químicas, refinarias ou depósitos de solventes não foi maior do que nas demais pessoas avaliadas e, finalmente, a principal fonte de exposição ao benzeno para os fumantes foi a fumaça de cigarro, enquanto que para os não fumantes foram as emissões de vapores de gasolina e exaustão veicular.

Apesar da importância da avaliação da exposição ao benzeno em ambientes não ocupacionais, poucos estudos nesta área têm sido realizados no Brasil<sup>6,7</sup>.

A mais de meio século existe a preocupação em se controlar a emissão do benzeno em ambientes ocupacionais. Em 1946 foi recomendado pela ACGIH (*American Conference of Governmental Industrial Hygienists*) o valor de 100 ppm (325 mg.m<sup>-3</sup>) como concentração máxima permitida para o benzeno no ar. Em 1947, esta organização americana propõe o limite de 50 ppm (163 mg.m<sup>-3</sup>). Com a introdução do conceito de TLV-TWA (*Threshold Limit Value – Time Weighted average*), o valor foi reduzido gradativamente para 35 ppm (114 mg.m<sup>-3</sup>) em 1948, 25 ppm (82 mg.m<sup>-3</sup>) em 1957, 25 ppm como valor teto (concentração que não pode ser excedida em nenhum momento da jornada de trabalho) em 1963 e 10 ppm (33 mg.m<sup>-3</sup>) em 1977<sup>8,9</sup>. A OSHA (*Occupational Safety and Health Administration*), cujos limites estabelecidos têm valor legal, estabeleceu o valor de 10 ppm em 1974 como nível de exposição permitido, alterando-o para 1 ppm em 1987.

Há um esforço mundial em restringir o máximo possível o limite de exposição ao benzeno, assim a NIOSH (*National Institute for Occupational Safety and Health*) estabeleceu o valor de 0,1 ppm (0,3 mg.m<sup>-3</sup>) e a ACGIH, em 1997, estabeleceu o valor de 0,5 ppm (1,6 mg.m<sup>-3</sup>) para o TLV-TWA<sup>10</sup>. Na Alemanha e no Brasil são utilizados valores de referência tecnológicos com níveis de 1,0 ppm (3,3 mg.m<sup>-3</sup>) e 2,5 ppm (8,1 mg.m<sup>-3</sup>), dependendo da tecnologia da fonte emissora<sup>11,12</sup>.

O estabelecimento de baixos limites de exposição, no entanto, reduz o risco de contaminação mas não assegura a proteção absoluta. Para não ocorrer incidência de câncer, a concentração ambiental do tóxico deve ser igual a zero<sup>3</sup>.

No Brasil, o início das ações legais para diminuir a exposição ao benzeno ocorreu em 1982 quando foi proibido em todo o território nacional a fabricação de produtos tais como tintas, vernizes, colas, misturas de solventes que contivessem benzeno em sua composição em uma concentração superior a 1% em volume. Sabe-se, no entanto, que quando se trata de exposição à substâncias cancerígenas o ideal para a proteção da saúde do trabalhador é a proibição do uso do agente. Devido à importância industrial do benzeno, esta condição é inviável. Em 1995, para garantir a diminuição da concentração de benzeno nos ambientes de trabalho foi instituído o Valor de Referência Tecnológico (VRT)<sup>12</sup>. O VRT é definido como a concentração de benzeno no ar considerada exequível do ponto de vista técnico; por exemplo, 2,5 ppm (8,1 mg.m<sup>-3</sup>) para as empresas siderúrgicas e 1,0 ppm (3,3 mg.m<sup>-3</sup>) para as demais empresas que produzem, transportam, armazenam, utilizam ou manipulam benzeno e suas misturas líquidas contendo 1% ou mais em volume<sup>12</sup>.

Quando o objetivo é diminuir a exposição a um poluente ao nível mais baixo possível, como no caso das substâncias cancerígenas, o Indicador Biológico de Exposição (IBE) desempenha um papel muito importante no acompanhamento da exposição humana total ao referido agente. Em diversas localidades do mundo, a monitoramento biológico da população exposta ocupacionalmente ao benzeno é feito através da avaliação dos níveis da substância ou de seus produtos de biotransformação em diferentes matrizes biológicas.

Em 1994, a ACGIH propôs vários limites biológicos para avaliar o nível de exposição ao benzeno. Foram estabelecidos

como limites biológicos a concentração de fenol urinário igual a 50 mg.g creat<sup>-1</sup> no fim do turno de trabalho, a concentração de benzeno no ar exalado igual a 0,12 ppm (0,38 mg.m<sup>-3</sup>) no início do turno e a concentração média de benzeno no ar expirado igual a 0,08 ppm (0,26 mg.m<sup>-3</sup>)<sup>16</sup>. Como o fenol urinário é um metabólito não específico, podendo estar presente na urina de indivíduos não expostos ocupacionalmente<sup>10</sup>, a ACGIH estabeleceu, a partir de 1997, a concentração de ácido S-fenilmercaptúrico urinário igual a 25 mg.g creat<sup>-1</sup> no final do turno, como índice biológico de exposição.

A Alemanha, por sua vez, não adota qualquer limite biológico para substâncias com possíveis efeitos mutagênicos ou carcinogênicos, como o benzeno, pelo fato de não haver um valor biológico considerado seguro. Para estas substâncias são propostos valores biológicos equivalentes (*EKA - Expositions äquivalente für Krebszerzeugende Arbeitsstoffe*) e no caso do benzeno são recomendados três indicadores biológicos de exposição que devem ser determinados no final do turno: benzeno no sangue, ácido *trans,trans*-mucônico e ácido S-fenilmercaptúrico na urina. São apresentadas as concentrações destes metabólitos nas respectivas matrizes correspondentes à valores de exposição ambiental que variam desde 0,3 ppm (0,98 mg.m<sup>-3</sup>) até 16 ppm (52 mg.m<sup>-3</sup>)<sup>11</sup>.

No Brasil, em 1983, foi estabelecido o valor limite de fenol igual a 50 mg.dm<sup>-3</sup> de urina, considerando 30 mg.dm<sup>-3</sup> como o valor normal<sup>13</sup>. Entretanto, para a exposição ao benzeno em concentrações inferiores a 10 ppm (32 mg.m<sup>-3</sup>) o fenol urinário não é adequado como IBE. Normalmente, esta substância aparece na urina devido a diversos fatores, como ingestão de alimentos contendo ácido benzóico usado como estabilizante, hábito de fumar e outros. Assim, em 1993, a utilização do fenol urinário como IBE ao benzeno deixou de ser recomendada pela Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo, mas uma alternativa não foi proposta<sup>14</sup>. Atualmente a legislação estabelece apenas critérios para a Vigilância da Saúde dos Trabalhadores para prevenção da exposição ocupacional ao benzeno e determina que os resultados das avaliações por IBE ao benzeno devem ser, entre outros, instrumentos utilizados com o propósito de vigilância da Saúde<sup>15</sup>. No Brasil, até o momento, não há um consenso sobre o IBE a ser utilizado para a avaliação da exposição ao benzeno.

Na primeira parte do texto, são consideradas as implicações do benzeno em ambientes internos e externos, não industriais e industriais e na segunda parte é apresentada uma revisão das metodologias analíticas para a determinação das substâncias usadas como IBEs ao benzeno, particularmente os metabólitos do benzeno: ácido *trans,trans*-mucônico e ácido S-fenilmercaptúrico. São apontadas as vantagens e desvantagens dos procedimentos e as dificuldades para escolher o indicador biológico(s) mais adequado(s).

O objetivo principal deste artigo é mostrar a necessidade de estudos futuros na área de saúde ambiental para melhorar os procedimentos de avaliação da quantificação de risco através da determinação de indicadores biológicos de exposição (IBE). Certamente, o progresso na tecnologia analítica para a identificação e quantificação de espécies químicas em matrizes complexas, como fluidos biológicos, contribuirá para esta finalidade.

## O BENZENO NO AR

O benzeno, por apresentar ótimas propriedades como solvente, muito solúvel em solventes orgânicos graxos, pouco solúvel em água e extremamente volátil à temperatura ambiente, tem um papel importante na indústria química e nas pesquisas científicas. Foi isolado em 1845 do carvão mineral e na segunda metade do século XIX começou a ser utilizado em escala industrial como matéria prima na fabricação de tecidos impermeabilizantes e produtos de borracha<sup>8,17,18</sup>.

O benzeno, no entanto, é um agente cancerígeno que causa efeitos prejudiciais à saúde humana<sup>10</sup> e o seu uso como solvente e matéria prima de produtos industriais se tornou preocupante

no momento em que se detectou a intoxicação pelo mesmo. Em 1987, foram relatados quatro casos fatais de benzenismo e, em 1916, ocorreram numerosos casos de pancitopenia e anemia aplásica em mulheres jovens que trabalhavam em uma indústria de pneus de bicicleta na Suíça<sup>8</sup>.

No começo do século, entre os anos 20 e 30, o benzeno foi largamente utilizado em vários processos industriais e como nesta época não existia controle das emissões nos ambientes de trabalho a exposição ocupacional ao benzeno atingiu níveis muito altos. Ao longo das duas últimas décadas, tem ocorrido uma tendência mundial para substituir o benzeno por outras substâncias similares nos processos industriais. Assim, visando uma melhoria nos ambientes de trabalho é possível prever uma diminuição da produção mundial de benzeno. Atualmente, os maiores produtores são Estados Unidos da América, Japão e a Europa Ocidental, sendo que no início da década de 90 a produção mundial foi 22 milhões de toneladas anuais. Enquanto os Estados Unidos produziram, em 1992, 4,5 milhões de toneladas, o Brasil produziu 600 mil toneladas<sup>18-20</sup>. As indústrias envolvidas com o benzeno no Brasil são as petroquímicas e siderúrgicas, produtoras de benzeno, as que utilizam o benzeno como matéria prima para a produção de etilbenzeno, cumeno, caprolactama, alquilbenzeno linear e anidrido maleico e finalmente as fábricas de álcool anidro que empregam o benzeno na destilação azeotrópica<sup>20</sup>.

Recentemente, uma ênfase crescente está sendo dada a poluição do ar em ambientes internos. Como as pessoas passam a maioria do tempo em interiores, a qualidade do ar interno é um fator importante a ser estabelecido no diagnóstico de exposição integrada total. Ambientes internos não industriais, como residências, escritórios, bibliotecas, museus e outros, têm despertado grande interesse nos estudos sobre os riscos à saúde humana por exposição à poluentes tóxicos no ar.

As maiores fontes de contaminação de benzeno em ambientes internos incluem o transporte dos gases de escapamento de veículos automotores e principalmente a fumaça de cigarro<sup>4</sup>. Sabe-se que a combustão incompleta do material orgânico do tabaco lança no ar mais de 4700 diferentes compostos na forma gasosa ou particulada, entre eles a nicotina, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, formaldeído, estireno, cloreto de vinila, óxido nitroso, dióxido de enxofre, monóxido de carbono, amônia, acroleína e, também, benzeno<sup>19</sup>. A concentração média de benzeno na fumaça de cigarro depende do tipo de tabaco.

Ambientes com fumantes apresentam uma concentração média de benzeno de 30 a 50% superior em relação à ambientes sem fumantes<sup>21</sup>. Um indivíduo fumante absorve cerca de 30 mg de benzeno a cada cigarro consumido e, fumando 20 cigarros diários, este indivíduo acumula cerca de 600 mg de benzeno diariamente, quantidade esta que pode ser até cinco vezes maior do que aquela encontrada em indivíduo não fumante<sup>19</sup>.

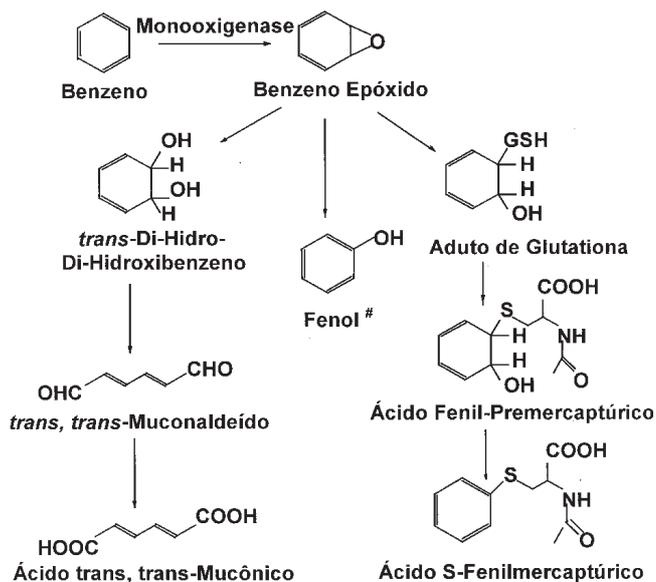
## INDICADORES BIOLÓGICOS DE EXPOSIÇÃO AO BENZENO

O desenvolvimento de métodos mais precisos para estabelecer a exposição humana aos poluentes no ar tem sido uma área de pesquisa de muito interesse durante os últimos anos. Nesse sentido, uma atenção especial está sendo dada para o uso de indicadores biológicos para determinar a exposição integrada de humanos aos tóxicos. Através de estratégias bem definidas é possível utilizar indicadores biológicos de efeito para avaliar os potenciais efeitos prejudiciais à saúde humana causados por exposição à uma dada substância exógena<sup>22</sup>.

Indicadores biológicos de exposição (IBE) ou biomarcadores podem ser substâncias tóxicas não reativas, os seus metabólitos ou os produtos de reação desses tóxicos com substâncias que ocorrem naturalmente no corpo. A presença destas substâncias em fluidos biológicos (sangue, urina), tecidos ou ar exalado indica se ocorreu ou não exposição à um determinado tóxico. Idealmente o IBE deve ser específico e o seu nível no organismo deve se

correlacionar com a extensão da exposição<sup>23</sup>. Dentre as matrizes biológicas utilizadas para a determinação da substância tóxica ou de seus metabólitos, a urina é a mais conveniente por ser coletada através de um processo não invasivo.

O metabolismo do benzeno, um composto lipossolúvel, ocorre principalmente no fígado. O benzeno é transformado a benzeno epóxido e a partir deste intermediário são formados os diversos compostos hidrossolúveis eliminados pela urina (Figura 1). Aproximadamente 40% do benzeno absorvido pelo organismo é transformado em compostos fenólicos<sup>11</sup>. O fenol, o mais importante desses compostos, é excretado principalmente pela urina, livre ou combinado com os ácidos glicurônico ou sulfúrico<sup>24-27</sup>.



# O fenol é o composto principal da rota fenólica e os intermediários são: catecol (1,2-dihidróxido benzeno), hidroquinona (1,4-dihidróxido benzeno) e *o*- e *p*-benzoquinona (1,2,4-trihidróxido benzeno).

Figura 1. Esquema do metabolismo do benzeno.

Apesar do fenol na urina estar sendo usado mundialmente como IBE ao benzeno, este não é um metabólito específico. A ingestão de determinadas substâncias químicas contidas em alimentos e fármacos pode produzir um aumento nos níveis de fenol urinário<sup>28</sup>. Indivíduos não expostos ao benzeno apresentam uma concentração de fenol urinário entre 19 e 81  $\mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$  e populações expostas à concentrações de benzeno inferiores à 10 ppm (32  $\text{mg} \cdot \text{m}^{-3}$ ) não podem ser distinguidas daquelas não expostas empregando o fenol urinário.

Como existe uma tendência em diminuir os limites de exposição ambiental ao benzeno, outros IBEs estão sendo sugeridos. Entre eles estão os ácidos *trans,trans*-mucônico e *S*-fenilmercaptúrico na urina.

Em um trabalho de revisão, Salgado & Pezzagno<sup>29</sup> sugeriram vários metabólitos do benzeno como possíveis indicadores biológicos de exposição.

Visando a substituição do fenol urinário Inoue *et al.*<sup>30</sup> avaliaram a utilização de catecol (1,2-dihidróxido benzeno) e hidroquinona (1,4-dihidróxido benzeno) urinários como IBE ao benzeno. Estudos de correlação entre a concentração destes metabólitos na urina e a concentração de benzeno na zona de respiração foram realizados com indivíduos expostos à concentrações de benzeno ambiental na faixa de 9 a 14 ppm (28,7 e 44,7  $\text{mg} \cdot \text{m}^{-3}$ ). Esses estudos mostraram resultados melhores do que aqueles obtidos com o fenol urinário, entretanto, a co-exposição ao tolueno interfere na utilização destes metabólitos como IBEs ao benzeno.

O 1,2,4-tri-hidróxi-benzeno, um outro metabólito, também foi avaliado para ser utilizado como IBE. Inoue *et al.*<sup>31</sup> determinaram a concentração deste composto em amostras de urina de indivíduos expostos ocupacionalmente e a concentração do benzeno no ar foi monitorada na zona de respiração. Eles constataram que apesar deste metabólito ser um indicador biológico específico, uma fração muito pequena de benzeno é biotransformada a 1,2,4-tri-hidróxi-benzeno e além disso sua concentração urinária é reduzida drasticamente em uma co-exposição ao tolueno.

O benzeno não metabolizado no sangue, no ar exalado e na urina também pode ser utilizado como IBE. Cerca de 30% de todo vapor de benzeno inalado é imediatamente eliminado pela expiração. Uma fração do benzeno absorvido pelo organismo é biotransformada principalmente no fígado e a outra permanece inalterada nos tecidos gordurosos, sangue e rins sendo eliminada pelo pulmão através da respiração, aproximadamente 50%, e pela urina<sup>32</sup>.

O ar exalado é uma mistura que depende não somente da exposição, mas também do nível de ventilação pulmonar de cada indivíduo e da atividade física exercida antes da coleta<sup>29</sup>. Por este fato, a determinação do nível de exposição ao benzeno empregando o ar exalado é discutível. Apesar disso, várias propostas para otimizar a determinação de benzeno no ar exalado têm sido apontadas na literatura<sup>33-38</sup>.

Por outro lado, o sangue tem sido usado como matriz biológica para a determinação de benzeno de indivíduos expostos ocupacionalmente. Apesar de algumas desvantagens, como amostras muito heterogêneas e processo invasivo para a coleta, muitos pesquisadores têm se dedicado à avaliação da exposição ao benzeno por esta via<sup>36-41</sup>. Ong & Lee<sup>42</sup> apresentaram um trabalho de revisão sobre a determinação de benzeno no sangue. A análise dos níveis de benzeno no sangue tem sido normalmente feita por cromatografia em fase gasosa acoplada à técnica de *headspace*.

Apesar de uma fração muito pequena, 0,07% a 0,2%, do benzeno inalado pelo homem ser eliminado sem alterações pela urina, a sua determinação nesta matriz também têm sido usada para a avaliação do nível de exposição a este agente<sup>32</sup>. Métodos analíticos muito sensíveis são requeridos para esta determinação. Ghittori *et al.*<sup>43</sup> propuseram métodos cromatográficos para a determinação de benzeno na urina com a técnica de *purge and trap* e Kok & Ong<sup>41</sup> com a técnica de *headspace*. Devido ao grande risco de contaminação, é necessário uma série de cuidados nas etapas de coleta e manuseio da amostra para a determinação do benzeno urinário.

A avaliação de possíveis alterações no organismo devido à exposição ao benzeno pode ser feita pelo uso de indicador biológico de efeito que permite prever eventos biológicos ou avaliar efeitos temporários e específicos relacionados com a exposição<sup>23</sup>. A determinação de N-7-fenilguanina na urina de indivíduos expostos tem sido usada para esta finalidade. O benzeno epóxido se liga ao DNA, RNA ou proteínas e estes intermediários liberam bases ariladas, entre elas a N-7-fenilguanina, como mecanismo de reparo. A concentração máxima deste metabólito na urina é atingida após 2 a 3 dias da absorção. A N-7-fenilguanina pode ser determinada na urina por HPLC-UV após pré-tratamento da amostra empregando cromatografia de íons e extração em fase sólida. Apesar da determinação ser específica e estar diretamente ligada à carcinogenicidade do benzeno, a sensibilidade do método analítico não permite avaliações de exposição à concentrações inferiores a 5 ppm (16 mg.m<sup>-3</sup>) de benzeno no ar<sup>44-45</sup>.

Nos últimos anos, os ácidos *trans,trans*-mucônico (AM) e S-fenilmercaptúrico (AFM) têm sido determinados na urina como IBEs. Vários trabalhos na literatura propõem o uso destes metabólitos para avaliar o nível de exposição ao benzeno presente no ar e algumas vantagens em relação aos outros IBEs são apontadas.

## Ácido *trans,trans*-Mucônico

Jaffé<sup>46</sup>, isolando o ácido mucônico da urina de cachorros e coelhos que haviam sido tratados com benzeno, foi o primeiro a relacionar este metabólito ao benzeno inalado. Parke & Williams<sup>47</sup>, com procedimentos semelhantes, conseguiram identificar e quantificar o ácido mucônico em urina de coelhos, verificando que este se apresentava quase que exclusivamente na forma *trans,trans* com uma fração muito pequena sob a forma *cis,cis* ou *cis,trans*. Estudando o metabolismo do benzeno, Zhang *et al.*<sup>48</sup> mostraram que o *trans*-di-hidro di-hidroxi-benzeno (benzeno di-hidrodiol) é biotransformado primeiramente a *cis,cis*-muconaldeído, em seguida a *cis,trans*-muconaldeído e, então a *trans,trans*-muconaldeído para finalmente ser oxidado ao ácido *trans,trans*-mucônico. Segundo os autores, o *cis,cis*-muconaldeído e o *cis,trans*-muconaldeído são muito instáveis para serem oxidados aos respectivos ácidos mucônico e somente o *trans,trans*-muconaldeído é convertido a ácido *trans,trans*-mucônico (AM). Este processo de biotransformação ocorre principalmente no fígado<sup>49</sup>.

Apesar de 0,12% a 0,18% do ácido sórbico, um preservante de alimentos, ser absorvido pelo organismo humano e excretado na urina como AM<sup>50,51</sup>, este metabólito não específico tem sido bastante estudado como IBE. Esta fração geralmente é desprezível na avaliação da exposição ocupacional ao benzeno<sup>50</sup>, mas pode ser um fator de confusão na avaliação de AM de indivíduos não fumantes expostos à níveis baixos de benzeno com uma dieta de aproximadamente 500 mg/dia de ácido sórbico<sup>51,52</sup>. Desta maneira, para as avaliações das exposições ambientais, os hábitos alimentares devem ser sempre conhecidos.

Para as avaliações de exposições ocupacionais de indivíduos com turnos de trabalho de 6 e 8 horas, a biotransformação do benzeno para AM fornece uma concentração máxima do produto em 5,1 horas sendo que 3,9% do benzeno absorvido é excretado pela urina na forma de AM<sup>53</sup>.

Em concentrações baixas de benzeno no ar, cerca de 0,1 ppm (0,3 mg.m<sup>-3</sup>), o AM apresenta uma boa correlação entre a sua concentração na urina e a concentração de benzeno na zona de respiração<sup>54-56</sup>. Esta condição desejável, entretanto, não ocorre em concentrações inferiores a 0,03 ppm (0,1 mg.m<sup>-3</sup>)<sup>57</sup> e o monitoramento biológico pelo AM urinário é considerado confiável apenas em exposições à concentrações de benzeno ambiental acima de 0,25 ppm (0,81 mg.m<sup>-3</sup>)<sup>58</sup> ou mesmo 1,0 ppm (3,3 mg.m<sup>-3</sup>)<sup>53,59</sup>.

Existem várias metodologias analíticas para a determinação de AM na urina. Como na estrutura molecular do AM existem duplas conjugadas, a detecção por espectrofotometria é recomendada. As vantagens analíticas na determinação do AM urinário, alta sensibilidade e fácil execução, evidenciam a potencialidade do AM como IBE. Várias metodologias analíticas foram desenvolvidas e as principais delas estão apresentadas resumidamente na Tabela 1, incluindo detalhes do pré-tratamento da amostra e o tipo do método cromatográfico.

O pré-tratamento da amostra é feito, em geral, em duas etapas: a extração do AM da urina para separar os possíveis interferentes presentes nessa matriz complexa e a derivatização do ácido para possibilitar as análises por cromatografia a gás com detecção por espectrometria de massas (GC-MS) ou ionização em chama (GC-FID). Comparando os dois métodos cromatográficos utilizados, cromatografia a líquido (HPLC-UV) e a gás (GC-FID ou GC-MS), pode se observar pelos limites de detecção apresentados que ambos oferecem sensibilidades similares. No entanto, a metodologia por cromatografia a líquido é mais simples e pode se observar um maior interesse no desenvolvimento dessas metodologias.

Atualmente, há uma grande preocupação em se avaliar as possíveis interferências na utilização do AM como IBE ao benzeno. Muitos estudos têm sido realizados com o objetivo de avaliar a correlação entre a concentração de benzeno ambiental e a de AM urinário em populações expostas ocupacionalmente.

**Tabela 1.** Metodologias analíticas para a determinação de AM urinário.

Ref.	Extração do AM da urina	Derivatização	Técnica Analítica	Deteccção	LD (mg.dm <sup>-3</sup> )
60	—	—	HPLC	UV (265 nm)	100
50	SAX <sup>a</sup>	—	HPLC	UV (259 nm)	50
61	Éter etílico	Tri-sil BSA <sup>b</sup>	GC	MS (m/z = 275)	10
62	SAX <sup>a</sup>	—	HPLC	UV (270 nm)	3000
54	Resina Dowex	—	HPLC	UV (265 nm)	25
63	SAX <sup>a</sup>	—	HPLC	UV - diode array (λ=230 a 350 nm)	20
63	Éter etílico	Diazometano	GC	FID	40
63	Éter etílico	BSTFA <sup>c</sup>	GC	MS (m/z = 271)	40
64	SAX <sup>a,d</sup>	—	HPLC	UV (λ=259 nm)	—
65	SAX <sup>a</sup>	BF <sub>3</sub> / MeOH	GC	MS (m/z=111; 139; 170)	10
66	SAX <sup>a</sup>	—	HPLC <sup>e</sup>	UV (259 nm)	3
67	Éter etílico	Diazometano	GC	FID	29
68	SAX <sup>a</sup>	—	HPLC <sup>f</sup>	UV - diode array (230 a 350 nm)	16
69	SAX <sup>a</sup>	—	HPLC	UV (263 nm)	6
70	SAX <sup>a</sup>	—	HPLC	UV (264 nm)	15

a - SAX = resina fortemente trocadora de ânions

b - Tri-silil N,O-bis(tri-metil-silil) acetamida

c - N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

LD = Limite de deteção

d - Dois cartuchos SAX em série

e - Utiliza a técnica de *column-switching*.

f - Coluna analítica à 40°C durante a análise

Nessas pesquisas, a concentração de benzeno na zona de respiração foi medida em um número grande de trabalhadores e as concentrações de AM urinário foram correlacionadas com a concentração de benzeno na zona de respiração. Nos estudos, também, são apresentadas equações de correlação entre a concentração de benzeno na zona de respiração e a concentração do AM urinário e os respectivos coeficientes de correlação. As equações e as suas aplicações em diferentes trabalhos estão apresentadas na Tabela 2.

Os resultados de estudos feitos para avaliar o nível de exposição ao benzeno nos seres humanos podem ser influenciados por vários fatores. Assim, os sistemas de coleta, por exemplo, amostradores passivos ou ativos (quando a coleta é feita com auxílio de sucção da amostra através do uso de bombas de amostragem individual), as metodologias analíticas, por exemplo, procedimentos, condições operacionais e variabilidade interlaboratorial, a absorção do benzeno por vias que não a respiração, por exemplo, cutânea, a ventilação pulmonar de acordo com o tipo do trabalho<sup>76</sup>, a capacidade individual de metabolizar o AM<sup>77</sup> são fatores que devem ser considerados ao se avaliar os resultados. De fato, examinando a Tabela 2 é possível observar discrepâncias entre os resultados dos diversos trabalhos.

É sabido também que os hábitos individuais contribuem muito para a variabilidade de resultados. Além do hábito de fumar<sup>80</sup> e a ingestão de ácido sórbico<sup>51,52</sup>, a co-exposição ao tolueno também interfere na avaliação da exposição ao benzeno<sup>60,81,82</sup>. Há suspeitas que hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) também interfiram nesta avaliação<sup>56</sup>. Javelaud *et al.*<sup>70</sup> constataram que o consumo de álcool elevou a concentração média de AM urinário em mais de cinco vezes.

Apesar do AM ser um indicador biológico de alta sensibilidade que responde em concentrações baixas de benzeno, as diferenças individuais no metabolismo do benzeno faz com que a curva dose/resposta não seja linear<sup>66,83</sup>.

Todos os fatores que contribuem para confundir os resultados devem ser considerados ao se avaliar a exposição em ambientes ocupacionais.

Muitos trabalhos realizados em ambientes não-ocupacionais têm estudado a contaminação no ar por benzeno proveniente da fumaça do tabaco através da determinação da concentração

de AM urinário. Resultados de estudos em populações de fumantes e não fumantes<sup>6,7,51,65,80,84</sup>, habitantes do campo e da cidade<sup>51</sup>, fumantes passivos<sup>67</sup> e pessoas expostas ao benzeno veicular<sup>68</sup> estão apresentados na Tabela 3. As concentrações médias de AM na urina da população em ambientes não ocupacionais diferem muito entre si. Além dos fatores citados anteriormente, em ambientes não-ocupacionais, as condições dos indivíduos sob investigação são menos controladas e um número menor de indivíduos é estudado.

### Ácido S-Fenilmercaptúrico

Parke & Williams<sup>85</sup>, administrando benzeno em coelhos, observaram que uma pequena quantidade deste é biotransformado em ácido S-fenilmercaptúrico (S-fenil-N-acetil-l-cisteína) e eliminado pela via urinária.

Atualmente sabe-se que o ácido S-fenilmercaptúrico (AFM) é um metabólito específico do benzeno. A glutatona, um tripeptídeo (γ-glutamil-cisteinilglicina), pela ação da enzima glutatona S-epóxido-transferase se liga ao benzeno epóxido formando o 1-glutationil-2-OH-3,5-ciclo-hexadieno<sup>86</sup>. Este, por sua vez, perde o resíduo glutamyl e, em seguida, a glicina; o composto resultante sofre a ação da acetil-coenzima-A produzindo o ácido S-fenil premercaptúrico, o qual perde uma molécula de água formando o AFM<sup>87</sup>.

Van Sittert *et al.*<sup>88</sup> observaram que apenas 0,11% do benzeno que penetra no corpo humano é biotransformado em AFM com tempo de meia vida de eliminação igual a 9,6 horas. Assim, este metabólito apresenta potencialidade para ser usado como IBE, preferencialmente em turnos longos de trabalho.

Na Tabela 4 são apresentadas várias metodologias analíticas para a determinação do AFM na urina incluindo os procedimentos de pré-tratamento, extração e derivatização, a técnica cromatográfica e os respectivos limites de deteção. A maioria dos métodos oferecem limites de deteção iguais ou inferiores a 1 µg.dm<sup>-3</sup>, valores que permitem diferenciar populações de fumantes e não fumantes não expostas ocupacionalmente. As metodologias que não utilizam o procedimento de derivatização<sup>89,91</sup> apresentam valores altos de limites de deteção, o que inviabiliza a utilização deste metabólito como IBE ao benzeno.

**Tabela 2.** Correlações entre a concentração de AM urinário e a concentração de benzeno na zona de respiração, em ambientes ocupacionais.

Ref.	Benzeno na zona de respiração, mg.m <sup>-3</sup> (faixa)	AM urinário, mg.g creat <sup>-1</sup> , vs benzeno na zona de respiração, ppm	AM urinário, mg.g creat <sup>-1</sup> , em diferentes concentrações de benzeno, ppm (mg.m <sup>-3</sup> )		
			0,1 (0,32)	1,0 (3,2)	2,5 (8,0)
53, 59	< 0,01 - 211,1 (n =58) turno=8h	<sup>a</sup> C <sub>b</sub> = 2,38 x C <sub>am</sub> - 0,900; r=0,959 turno=8h	0,51	1,72	3,74
	< 0,1 - 19,2 (n = 28) turno=12h	<sup>a</sup> C <sub>b</sub> = 1,98 x C <sub>am</sub> + 0,390; r=0,862 turno=12h	-0,04	1,42	3,84
54	f : 0,13 - 2,02 (n = 8) nf: 0,032 - 1,54 (n =11)	C <sub>am</sub> = 0,8502 x C <sub>b</sub> + 0,02; r= 0,88 (n = 19)	0,11	0,87	2,14
55, 75	GE: 1,850 ± 8,593 (n = 145)	log C <sub>am</sub> = 0,429 x log C <sub>benz</sub> - 0,304; r <sup>2</sup> = 0,58	0,18	0,50	0,74
60	GE <sub>1</sub> : 0 - 294 (n = 177) GE <sub>2</sub> : 0 - 672 (n = 188)	C <sub>am</sub> = 0,989 x C <sub>benz</sub> + 4,429; r <sup>2</sup> = 0,827	4,53	5,42	6,90
61, 72	GE: 14,0	GC: C <sub>am</sub> = 0,27 ± 0,21 (n = 8) GE: C <sub>am</sub> = 6,2 ± 3,1 (n = 14)			
64	GC: <1,0 GE: 2,6 (<1,0 - 13)	GC: C <sub>am</sub> = 0,69 ± 0,39 (n = 6) GE: C <sub>am</sub> = 1,28 ± 1,14 (n = 20)			
66, 76	GE: 0,25	log C <sub>am</sub> = 0,549 x log C <sub>benz</sub> - 0,18; r = 0,614	0,19	0,66	1,09
71	GE: 0,32 - 240 (n = 79)	log <sup>b</sup> C <sub>am</sub> = 0,924 x logC <sub>benz</sub> + 0,066; r = 0,907	<sup>b</sup> 0,14	<sup>b</sup> 1,17	<sup>b</sup> 2,72
73	GE: 0 - 6,4 (n = 38)	log C <sub>am</sub> = 0,86 x log C <sub>benz</sub> + 0,15; r <sup>2</sup> = 0,81	0,19	1,41	3,11
74	GE <sub>1</sub> : 0 - 3,2 (n = 22) GE <sub>2</sub> : 3,2 - 320 (n =42)	log C <sub>am</sub> = 1,05 x log C <sub>benz</sub> + 0,20; r <sup>2</sup> = 0,89	0,14	1,58	4,15
56	GE: 0,096 - 47,04	<sup>c</sup> C <sub>am</sub> = 17,1 x C <sub>benz</sub> + 6,3; r = 0,87 (n = 39)	<sup>c</sup> 1,14	<sup>c</sup> 3,32	6,97
57	GE: 0,009 - 0,123 (média = 0,045)	GE: <sup>a</sup> C <sub>am</sub> = 0,043 (0,015 - 0,216); (nf = 43) GE: <sup>a</sup> C <sub>am</sub> = 1,1. <sup>a</sup> C <sub>benz</sub> + 17,2; r=0,62	<sup>a</sup> 0,37	<sup>a</sup> 3,54	<sup>a</sup> 8,82
58	GC: 0,035 - 0,067 GE: 0,035 - 11,07	GC: C <sub>am</sub> = 0,14 ± 0,07; (nf = 40) GE: C <sub>am</sub> = 0,34 ± 0,90; (nf = 131) GE: log C <sub>am</sub> = 0,69 log x <sup>c</sup> C <sub>benz</sub> + 0,09; r <sup>2</sup> = 0,53	0,03	0,14	0,27
69		GE <sub>1</sub> : <sup>a</sup> C <sub>am</sub> = 0,077 (0,006 - 0,242); (nf=95) GE <sub>2</sub> : <sup>a</sup> C <sub>am</sub> = 0,169 (0,017 - 0,382); (f =36)			
70	GE: <0,005 - 23,06	GC: C <sub>am</sub> = 0,049 ± 0,046; n = 28 GE: log C <sub>am</sub> =0,481 x log <sup>b</sup> C <sub>benz</sub> +2,221 r <sup>2</sup> = 0,46; (n = 30)	0,10	0,29	0,45
77		GC: C <sub>am</sub> = 0,162 (0,010 - 0,637); (nf = 35) GE: C <sub>am</sub> = 0,297 (0,021 - 1,294); (n= 80)			
78	GE: 0,032 - 43,52	GE: C <sub>am</sub> = (0,01 - 5,84) ; (n = 280) GE: log C <sub>am</sub> = 0,385 x log C <sub>benz</sub> + 1,577 r <sup>2</sup> = 0,53	15,6	37,8	53,7
79	GE <sub>1</sub> : 0,032 - 0,48; n=21 GE <sub>2</sub> : 0,032 - 5,12; n=27	GE <sub>1</sub> : C <sub>am</sub> = (25 - 228) GE <sub>2</sub> : C <sub>am</sub> = (25 - 880) GE: log C <sub>am</sub> = 0,425 x log C <sub>benz</sub> +2,748 r = 0,83	0,21	0,56	0,83

a - Concentração de benzeno, mg.m<sup>-3</sup> GE = grupo de trabalhadores expostos

b - Concentração de AM, mg.dm<sup>-3</sup> GE = grupo controle

c - Concentração de AM, mmol.dm<sup>-3</sup> f = fumantes; nf = não fumantes

**Tabela 3.** Correlações entre a concentração de AM urinário e a concentração de benzeno na zona de respiração, em ambientes não ocupacionais.

Ref.	Grupo Avaliado	AM urinário (conc. média), mg.g creat <sup>-1</sup>	Técnica Analítica
6	f = 6; nf = 4	nf: <sup>a</sup> C <sub>am</sub> = 0,044 (0,005 - 0,093) f: <sup>a</sup> C <sub>am</sub> = 0,408 (0,102 - 0,721)	CE – UV (262 nm)
7	f = 18; nf = 10	nf: C <sub>am</sub> = 0,380 (0,051 - 0,729) f: C <sub>am</sub> = 0,606 (0,086 - 1,788)	CE – UV (260 nm)
51	f = 32; nf = 82	nf: C <sub>am</sub> = 0,065 (0,02 - 0,59) f: C <sub>am</sub> = 0,13 (0,06 - 0,39)	GC – MS (m/z = 111, 139, 170)
65	f = 10; nf = 10	nf: C <sub>am</sub> = 0,05 ± 0,02 f: C <sub>am</sub> = 0,09 ± 0,04	GC – MS (m/z = 111, 139, 170)
67	<sup>c</sup> nf = 5	Conc mín: <sup>b</sup> C <sub>am</sub> = 36 ± 2,6 Conc máx: <sup>b</sup> C <sub>am</sub> = 60 ± 12	GC – FID
68	nf = 79	nf: C <sub>am</sub> = 0,177 ± 0,342	HPLC – UV ( <i>diode-array</i> )
80	f = 42; nf = 42	nf: C <sub>am</sub> = 0,09 ± 0,02 (n=42) f: C <sub>am</sub> = 0,29 ± 0,04 (n=42)	HPLC – UV (264 nm)
84	f = 46; nf = 40	nf: C <sub>am</sub> = 0,14 ± 0,07 f: C <sub>am</sub> = 0,19 ± 0,09	HPLC – UV (265 nm)

a - Concentração de AM, mg.dm<sup>-3</sup>

b - Concentração de AM, mg.dia<sup>-1</sup>

c - Não fumantes expostos à fumaça de cigarro em ambiente fechado

CE = eletroforese capilar; FID = detetor de ionização de chama

f = fumantes; nf = fumantes

**Tabela 4.** Metodologias para a determinação de AFM urinário

Ref.	Extração do AFM da urina	Derivatização	Técnica Analítica	Detecção	LD (µg.dm <sup>-3</sup> )
89	Éter etílico	-	HPLC	UV (λ = 256 nm)	1400
90	Acetato de etila <sup>a</sup> SAX	HCl / MeOH HCl / n-ButOH	GC	MS (m/z = 236)	12
91	Resina aminopropil / éter etílico	-	HPLC	UV (λ = 255 nm)	3000
88	Acetato de etila	HCl / MeOH	GC	MS (m/z = 194) Fluorescência	1
92	Sep-Pak® C18 e <sup>a</sup> SAX	Ortoftaldeído / Mercaptoetanol	HPLC	(λ <sub>exc</sub> =330 nm; λ <sub>em</sub> =440 nm) Fluorescência	0,5
93	Sep-Pak® C18	Glicina / monobromobimano	HPLC	(λ <sub>exc</sub> = 395 nm; λ <sub>em</sub> = 470 nm)	1
94	Acetato de etila	Pentafluorobenzeno / Diisopropilamina	GC	ECD (pulso=50V / 0,1ms)	0,06
95	Acetato de etila	Diazometano / tolueno	GC	MS (m/z = 194 e 123)	1

a - Resina fortemente trocadora de ânions.

LD = Limite de detecção.

ECD = detetor de captura de elétrons.

Na determinação de um IBE, a sensibilidade e a simplicidade do procedimento analítico devem ser consideradas para selecionar o método analítico adequado. Como pode ser visto na Tabela 4, estes parâmetros estão comprometidos entre si, uma vez que ao eliminar a etapa de derivatização a sensibilidade é diminuída.

As diminutas concentrações de AFM na urina e as dificuldades analíticas para a determinação deste metabólito têm sido motivo de desencorajamento da utilização do AFM

como IBE. Apesar disso, vários trabalhos têm sido realizados com o objetivo de avaliar o AFM como IBE ao benzeno em ambientes ocupacionais através da correlação entre a concentração de benzeno na zona de respiração dos trabalhadores com a concentração do AFM urinário. Muitos desses trabalhos fornecem as concentrações médias de AFM urinário encontradas para uma determinada concentração de benzeno, a equação de correlação e o respectivo coeficiente de correlação (Tabela 5).

**Tabela 5.** Correlações entre a concentração de AFM urinário e a concentração de benzeno na zona de respiração.

Ref.	Benzeno na zona de respiração, mg.m <sup>-3</sup> (faixa)	AFM urinário, mg.g creat <sup>-1</sup> , vs benzeno na zona de respiração, ppm	AFM urinário, mg.g creat <sup>-1</sup> , em diferentes concentrações de benzeno, ppm (mg.m <sup>-3</sup> )		
			0,1 (0,32)	1,0 (3,2)	2,5 (8,0)
53, 59	<0,01 - 211,1 turno= 8 h <0,1- 19, 2 turno = 12 h	<sup>a</sup> C <sub>benz</sub> = 0,0758 x C <sub>afm</sub> - 0,317; r=0,968 turno = 8 horas	8,40	46,4	4
		<sup>a</sup> C <sub>benz</sub> = 0,0507 x C <sub>afm</sub> + 0,518; r=0,959 turno = 12 horas	-3,9	52,9	1
55, 75	GE: 1,850 ± 8,593	log C <sub>afm</sub> = 0,712 x log C <sub>benz</sub> + 1,644; r = 0,74	8,55	44,0	1
56	GE: (0,096 - 47,04)	C <sub>afm</sub> = 66,3 x C <sub>benz</sub> - 8,2; r = 0,97 (n = 41)	-1,57	58,1	156
64	GC: < 1,0 GE: 2,6 (<1,0 - 13)	GC: C <sub>afm</sub> = 12,5 ± 13,5 GE: C <sub>afm</sub> = 33,0 ± 56,0			
88	GE <sub>1</sub> : <0,02 - 0,33 GE <sub>2</sub> : 0,5 - 13,6	GC: C <sub>afm</sub> = <2,0 - 6,0 GE <sub>1</sub> : C <sub>afm</sub> = <5-10; GE <sub>2</sub> : C <sub>afm</sub> = 25-107 GE <sub>2</sub> : <sup>a</sup> C <sub>benz</sub> = 0,11 x C <sub>afm</sub> + 0,79; r = 0,847	-4,27	21,9	6
89		GE <sub>1</sub> : <sup>c</sup> C <sub>afm</sub> = <1400 - 2630 (n = 8) GE <sub>2</sub> : <sup>c</sup> C <sub>afm</sub> = 1900 - 5500 (n = 12)			
90	GE <sub>1</sub> : 0,016 - 0,48 GE <sub>2</sub> : 0,224 - 3,62	GC: C <sub>afm</sub> = 4,0 ± 4,0 GE <sub>1</sub> : C <sub>afm</sub> = 48,5 ± 64,5; GE <sub>2</sub> : C <sub>afm</sub> = 70,9 ± 109,2 GE: <sup>c</sup> C <sub>afm</sub> = 208,9.C <sub>benz</sub> - 0,73; r = 0,744	20 <sup>c</sup>	208 <sup>c</sup>	522 <sup>c</sup>
92	GE: 1,99 (0,02 - 67,6)	GC <sub>nf</sub> : C <sub>afm</sub> = 1,3 ± 1,5 GC <sub>f</sub> : C <sub>afm</sub> = 9,2 ± 5,6 GE: C <sub>afm</sub> = 46,6 (0,5 - 1127)			
94		nf: <sup>b</sup> C <sub>afm</sub> = 1,7 (0,9 - 2,4) (n = 12) f: <sup>b</sup> C <sub>afm</sub> = 6,1 (2,2 - 11,3) (n = 8)			
96	GE: 1,66 (0,032 - 67,5)	GC <sub>nf</sub> : C <sub>afm</sub> = 1,3 ± 1,0 GC <sub>f</sub> : C <sub>afm</sub> = 9,6 ± 6,4 GE: log C <sub>afm</sub> = 0,712 x log C <sub>benz</sub> + 1,284; r = 0,74	3,73	19,2	36,9

GC = grupo de controle; GE = grupo de trabalhadores expostos; f = fumantes; nf = não fumantes.

a - concentração de benzeno, mg.m<sup>-3</sup>; b - concentração de AFM, µg.dm<sup>-3</sup>; c - concentração de AFM, µg.dia<sup>-1</sup>

Através da concentração de AFM urinário de fumantes e não fumantes observa-se que este IBE é suficientemente sensível para estabelecer diferenças estatísticas entre estas duas categorias<sup>92-94,96</sup>. Como no caso do AM urinário, o hábito de fumar é um fator de confusão na avaliação da exposição ao benzeno através do indicador biológico AFM. Até o momento, não existem estudos de interferência baseados nas diferenças individuais de biotransformação do benzeno em AFM. Na Tabela 5 é possível observar que para um mesmo valor de concentração de benzeno ambiental foram encontrados valores de AFM urinários muito diferentes. Os vários fatores que influenciam nos resultados das avaliações de exposição, citados anteriormente, podem ser os responsáveis pelas discrepâncias dos resultados.

Dentre os possíveis IBEs ao benzeno, o AFM urinário é o que possui maior confiabilidade pela comunidade científica. Desde 1997, a ACGIH adota a determinação do AFM urinário no final de um turno de trabalho, estabelece o valor de 25 µg.g<sup>-1</sup> de creatinina como índice biológico de exposição ao benzeno e alerta que este valor inclui níveis altos de exposição não ocupacional<sup>10</sup>.

#### Índices Biológicos de Exposição para os Ácidos trans,trans-Mucônico e S-Fenilmercaptúrico propostos para o Brasil

Nas Tabelas 2 e 5 estão apresentados os resultados das concentrações de AM e AFM calculados pelas equações de correlações da literatura para as concentrações de benzeno no ar

iguais a 0,1 ppm (0,3 mg.m<sup>-3</sup>), que é igual ao menor limite oficial para exposição ocupacional, 1,0 ppm (3,3 mg.m<sup>-3</sup>) e 2,5 ppm (8,1 mg.m<sup>-3</sup>), que equivalem aos VRTs adotados pela Alemanha e Brasil.

As concentrações de AM calculadas pelas equações de correlação apresentadas na Tabela 2 variam desde valores negativos<sup>53,59</sup> até valores tão altos quanto 53,7 mg de AM por grama de creatinina<sup>78</sup>. Alguns resultados são concordantes, como as concentrações calculadas pelas equações propostas por Ghittori *et al.*<sup>55,75,76</sup>, Maestri *et al.*<sup>66</sup> e por Barbosa<sup>79</sup>, correspondendo às três concentrações de benzeno. Também, em concentração de 0,1 ppm (0,32 mg.m<sup>-3</sup>) de benzeno no ar, os resultados são concordantes ao aplicar as equações propostas por Lauwerys *et al.*<sup>73</sup>, Ghittori *et al.*<sup>55,66,75,76</sup> e Barbosa<sup>79</sup>. Comparações entre valores de referência estabelecidos na Alemanha e valores apresentados nesses estudos não podem ser feitas, uma vez que se tratam de diferentes concentrações de benzeno. Dentre os diversos estudos apresentados, destaca-se o estudo de Barbosa<sup>79</sup>, o qual foi realizado nas condições brasileiras. Estes resultados talvez possam ser extrapolados para outros grupos populacionais brasileiros com hábitos alimentares peculiares e que vivem em ambientes regionais típicos, desde que validados para estas populações.

Baseado nas considerações acima apresentadas, são sugeridos, de forma simplista, índices biológicos de exposição para 0,1, 1,0 e 2,5 ppm de benzeno no ar, os quais poderiam ser adotados no Brasil. Assim, o valor de 0,2 mg.g creat<sup>-1</sup> de AM

para 0,1 ppm (0,3 mg.m<sup>-3</sup>) de benzeno; o valor de 0,6 mg.g creat<sup>-1</sup> de AM para 1,0 ppm (3,3 mg.m<sup>-3</sup>) de benzeno e o valor de 0,9 mg.g creat<sup>-1</sup> de AM para 2,5 ppm (8,1 mg.m<sup>-3</sup>) de benzeno.

Quanto aos resultados das concentrações de AFM obtidos pelas equações de correlação apresentadas na Tabela 5 observa-se que não houve concordância entre os estudos, em todas as três concentrações de benzeno no ar. Nas concentrações de benzeno iguais a 0,1 ppm (0,3 mg.m<sup>-3</sup>) e 1,0 ppm (3,3 mg.m<sup>-3</sup>), entretanto, os resultados obtidos pelas equações propostas por Boogaard & van Sittert<sup>53,59</sup> e Ghittori *et al.*<sup>55,75</sup> são concordantes. Para 0,5 ppm (1,6 mg.m<sup>-3</sup>) de benzeno no ar, valores similares de concentração de AFM urinário, os quais coincidem com o valor adotado pela ACGIH<sup>10</sup>, foram obtidos pelas equações de Boogaard & van Sittert<sup>53,59</sup> e Ghittori *et al.*<sup>55,75</sup>. Para 1,0 ppm (3,3 mg.m<sup>-3</sup>), valores similares de concentração de AFM urinário, os quais coincidem com o valor de referência utilizado na Alemanha<sup>11</sup>, foram obtidos pelas equações de Boogaard & van Sittert<sup>53,59</sup> e Ghittori *et al.*<sup>55,75</sup>.

Como ainda não foram feitos estudos no Brasil que permitam estabelecer valores de referência para AFM, neste trabalho são propostos alguns valores, que poderiam ser usados como índices biológicos de exposição, baseados nas considerações acima apresentadas. Os valores sugeridos são 8,5 µg.g creat<sup>-1</sup> de AFM para 0,1 ppm de benzeno (0,3 mg.m<sup>-3</sup>), 45 µg.g creat<sup>-1</sup> de AFM para 1,0 ppm (3,3 mg.m<sup>-3</sup>) de benzeno e, finalmente, com os dados disponíveis não foi possível indicar um valor de referência para 2,5 ppm (8,1 mg.m<sup>-3</sup>) de benzeno.

## CONCLUSÕES

A importância do papel dos indicadores biológicos de exposição na avaliação da exposição humana aos poluentes tóxicos é reconhecida mundialmente. Por outro lado, a ineficiência do fenol urinário para a avaliação da exposição humana à concentrações baixas de benzeno ambiental está sendo apontada pelos pesquisadores e para estabelecer IBEs mais adequados, outras substâncias estão sendo investigadas.

Na busca de encontrar o melhor IBE para avaliar o nível de exposição ao benzeno com o maior grau de confiabilidade possível, o AM e o AFM na urina vêm demonstrando ter boas condições para este fim. Devido às facilidades analíticas, o AM urinário tem sido o mais estudado. No entanto, para avaliar a exposição ao benzeno em concentrações inferiores a 1 ppm (3,3 mg.m<sup>-3</sup>) este metabólito não tem se revelado um bom IBE existindo muita controvérsia quanto à viabilidade do seu uso. É consenso que o AM urinário usado como IBE ao benzeno apresenta um grau de confiabilidade menor em relação ao AFM para exposição a níveis muito baixos de benzeno no ar e também, requer uma avaliação mais criteriosa dos fatores de confusão.

Ainda, para o AFM urinário ser usado amplamente como IBE ao benzeno é necessário desenvolver uma metodologia analítica sensível com um maior grau de confiabilidade apresentando requisitos analíticos como simplicidade, rapidez e custo baixo. Nesse sentido, esforços deverão ser dirigidos para pesquisas no campo da química analítica a fim de se estabelecer uma metodologia atraente para a determinação de AFM urinário como IBE ao benzeno.

No Brasil, até o momento, não foi estabelecido oficialmente indicador(es) biológico(s) de exposição ao benzeno e, por outro lado, são várias as propostas apresentadas internacionalmente. Dada a relevância do assunto, é fundamental que a comunidade científica brasileira contribua para este propósito.

Com o objetivo de nortear futuros estudos, são apresentadas a seguir algumas questões relativas às áreas de saúde ocupacional, meio ambiente e química analítica, às quais estão sendo levantadas em muitos países do mundo por se tratarem de temas complexos ainda não suficientemente esclarecidos.

- É suficiente haver apenas um IBE ao benzeno ou deveria ser estabelecido mais que um IBE?
- Qual(is) a(s) melhor(es) metodologia(s) analítica(s) validada(s) para a determinação deste(s) IBE(s)?
- Qual a correlação entre a(s) concentração(ões) deste(s) IBE(s) na respectiva matriz biológica e a concentração de benzeno na zona de respiração? Qual a faixa de concentração na qual esta correlação é válida? Para tal, são necessários estudos considerando as diferenças climáticas, culturais, raciais, alimentares?
- Para o Brasil, onde a concentração ambiental estabelecida para o benzeno é definida como “valor de referência tecnológico (VRT)” seria melhor estabelecer valores limites para a concentração do(s) IBE(s) na respectiva matriz biológica como recomendado pela ACGIH, ou utilizar Valores Biológicos Equivalentes para nortear a avaliação da exposição, como adotado na Alemanha?
- O fenol urinário não deve ser utilizado como IBE ao benzeno ou poderia ser útil em avaliações de acidentes onde o nível de exposição ao benzeno é muito alto?
- A exposição humana ao benzeno deve ser controlada somente em ambientes ocupacionais? Em quais outros ambientes esta exposição deve ser controlada? A quem cabe fazer este controle? Como viabilizá-lo?

Finalmente, devem ser conduzidos estudos para distinguir com razoável confiança a exposição ocupacional da não ocupacional. No Brasil, este estudo apresenta uma particular importância pois deverá permitir uma melhor distinção das potenciais fontes de contaminação de benzeno em áreas destinadas para retorno de trabalhadores com alta, após serem afastados com diagnóstico de benzenismo. Devem ser incentivadas pesquisas brasileiras em colaboração entre órgãos governamentais, indústrias e universidades para permitir um avanço na área de saúde ambiental e possibilitar um controle eficiente da exposição ao benzeno.

## REFERÊNCIAS

1. Gilli, G.; Scursatone, E.; Bono, R.; *Environ. Health Perspect.* **1996**, *104* (sup. 6), 1137.
2. Scherer, G.; Ruppert, T.; Daube, H.; Kossien, I.; Riedel, K.; Tricker, A.R.; Adlkofer, F.; *Environ. Int.* **1995**, *21*, 779.
3. Johnson E. S.; Lucier, G.; *Am. J. Ind. Med.* **1992**, *21*, 749.
4. Wallace, L. ; *Environ. Health Perspect.* **1996**, *104* (sup. 6), 1129.
5. Wallace, L.; Pellizzari, E.; Hartwell, T. D.; Perritt, R.; Ziegenfuss, R.; *Arch. Environ. Health* **1987**, *42*, 272.
6. Coutrim, M. X.; Jager, A. V.; Carvalho, L. R. F.; Tavares, M. F. M.; *J. Capillary Electrophor.* **1997**, *4*, 39.
7. Coutrim, M. X.; *Tese de Doutorado*. Instituto de Química, USP, São Paulo 1998.
8. Bartolucci, G. B.; Alessandro, G.; Saia, B. In *Il Benzene – Tossicologia, Ambienti di Vita e di Lavoro*; Minoia *et al.*, Eds.; Morgan Edizioni Tecniche; Milano, 1995; p 69.
9. Mastrangelo, G. In *Il Benzene – Tossicologia, Ambienti di Vita e di Lavoro*; Minoia *et al.*, Eds.; Morgan Edizioni Tecniche; Milano, 1995; p 51.
10. ACGIH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists. 1997: Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices. Cincinnati, OH (1998).
11. Pezzagno, G. In *Il Benzene – Tossicologia, Ambienti di Vita e di Lavoro*; Minoia *et al.*, Eds.; Morgan Edizioni Tecniche; Milano, 1995; p 125.
12. MTb - Ministério do Trabalho - Secretária de Segurança e Saúde no Trabalho. Portaria nº 14, de 20 de dezembro de 1995. Brasil, 1995.
13. MTb - Ministério do Trabalho - Secretária de Segurança e Saúde no Trabalho. Portaria nº 12, de 06 de junho de 1983. Brasil, 1983.

14. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Resolução nº SS184, de 08 de junho de 1993. São Paulo, Brasil, 1993.
15. MTb - Ministério do Trabalho - Secretária de Segurança e Saúde no Trabalho. Instrução Normativa nº 02, de 20 de dezembro de 1995. Brasil, 1995.
16. ACGIH, American Conference of Governmental Industrial Hygienists. 1993-1994: Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices. Cincinnati, OH (1993).
17. Badger, G. M.; *Aromatic Character and Aromaticity*; Syndics of the Cambridge University Press, Cambridge, 1969.
18. Locatelli, C.; Maccarini, D.; Butera, R.; Varango, C.; Manzo, L. In *Il Benzene - Tossicologia, Ambienti di Vita e di Lavoro*; Minoia et al., Eds.; Morgan Edizioni Tecniche; Milano, 1995; p 27.
19. Fiordi, T.; Muzi, G.; Abbritti, G. In *Il Benzene - Tossicologia, Ambienti di Vita e di Lavoro*; Minoia et al., Eds.; Morgan Edizioni Tecniche; Milano, 1995; p 99.
20. De Carvalho, A. B.; Arcuri, A. S. A.; Bedrikow, B.; Augusto, L. G. S.; Oliveira, L. C. C.; Bonciani, M.; Kato, M.; Gramacho, M. I. P.; Freitas, N. B. B.; Novaes, T. C. P.; *Benzeno: Subsídio Técnico à Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho*. 2ª ed., FUNDACENTRO/FUNDUNESP; São Paulo, 1995; p 24-31.
21. Apostoli, P.; Alessio, L. In *Il Benzene - Tossicologia, Ambienti di Vita e di Lavoro*; Minoia et al., Eds.; Morgan Edizioni Tecniche; Milano, 1995; p 17.
22. Henderson, R. F.; *Toxicol. Lett.* **1995**, 379, 379.
23. Medeiros, A. M.; Bird, M. G.; Witz, G.; *J. Toxicol. Environ. Health* **1997**, 51, 519.
24. Timbrell, J. A.; Mitchell, J. R.; *Xenobiotica* **1977**, 7, 415.
25. Tunek, A.; Platt, K. L.; Bentley, P.; Oesch F.; *Mol. Pharmacol.* **1978**, 14, 920.
26. Greenlee, W. F.; Sun, J. D.; Bus, J. S.; *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **1981**, 59, 187.
27. Hinson, J. A.; Freeman, J. P.; Potter, D. W.; Mitchum, R. K.; Evans, F. E.; *Mol. Pharmacol.* **1985**, 27, 574.
28. Pekari, K.; *Biological Monitoring of Benzene, Toluene and Styrene*. Helsinki (1994). [Academic Dissertation, Faculty of Natural and Environmental Sciences, University of Kiopio]
29. Salgado, P. E. T.; Pezzagno, G.; *Rev. Bras. Saúde Ocup.* **1991**, 19, 25.
30. Inoue, O.; Seiji, K.; Kasahara, M.; Nakatsuka, H.; Watanabe, T.; Yin, S.-G.; Li, G.-L.; Cai, S.-X.; Jin, C.; Ikeda, M.; *Br. J. Ind. Med.* **1988**, 45, 487.
31. Inoue, O.; Seiji, K.; Nakatsuka, H.; Wantable, T.; Yin, S. N.; Li, G. L.; Cai, S. X.; Jin, C.; Ikeda, M.; *Br. J. Ind. Med.* **1989**, 46, 559.
32. Candura, S. M.; La Paglia, G.; Manzo, L. In *Il Benzene - Tossicologia, Ambienti di Vita e di Lavoro*; Minoia et al., Eds.; Morgan Edizioni Tecniche; Milano, 1995; p 3.
33. Wester, R. C.; Maibach, H. I.; Gruenke, L. D.; Craig, J. C.; *J. Toxicol. Environ. Health* **1986**, 18, 567.
34. Money, C. D.; Gray, C. N.; *Ann. Occup. Hyg.* **1989**, 33, 257.
35. Riedel, K.; Ruppert, T.; Conze, C.; Scherer, G.; Adlkofer, F.; *J. Chromatogr. A* **1996**, 719, 383.
36. Perbellini, G.; Faccini, G. B.; Pasini, F.; Cazzoli, F.; Pistoia, S.; Rosellini, R.; Valselcchi, M.; Brugnone, F.; *Br. J. Ind. Med.* **1988**, 45, 345.
37. Brugnone, F.; Perbellini, L.; Faccini, G. B.; Pasini, F.; Danzi, B.; Maranelli, G.; Romeo, L.; Romeo, L.; Gobbi, M.; Zedde, A.; *Am. J. Ind. Med.* **1989**, 16, 385.
38. Pekari, K.; Vainiotalo, S.; Heikkilä, P.; Palotie, A.; Luotamo, M.; Riihimäki, V.; *Scand. J. Work Environ. Health* **1992**, 18, 317.
39. Hajimiragha, H.; Ewers, U. Brockhaus, A.; Boettger, A.; *Int. Arch. Occup. Health* **1989**, 61, 513.
40. Angerer, J.; Scherer, G.; Schaller, K. H.; Müller, J.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1991**, 339, 740.
41. Kok, P. W.; Ong, C. N.; *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **1994**, 66, 195.
42. Ong, C.N.; Lee, B. L.; *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.* **1994**, 660, 1.
43. Ghittori, G.; Fiorentino, M. L.; Maestri, L.; Cordioli, G.; Imbriani, M.; *J. Toxicol. Environ. Health* **1993**, 38, 233.
44. Norpoth, K.; Stücker, W.; Krewet, E.; Müller, G.; *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **1988**, 60, 163.
45. Norpoth, K. H.; Müller, G.; Schell, C.; Jorg, E.; *Environ. Health Perspect.* **1996**, 104 (sup. 6), 1159.
46. Jaffé, M.; *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **1909**, 62, 58.
47. Parke, D. V.; Williams, R. T.; *Biochem. J.* **1952**, 51, 339.
48. Zhang, Z.; Xiang, Q.; Glatt, H.; Platt, K. L.; Goldstein, B. D.; Witz, G.; *Free Radical Biol. Med.* **1995**, 18, 411.
49. Grotz, V. L.; Ji, S.; Kline, S. A.; Golstein, B. D.; Witz, G.; *Toxicol. Lett.* **1994**, 70, 281.
50. Ducos, P.; Gaudin, R.; Robert, A.; Francin, J. M.; Maire, C.; *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **1990**, 62, 529.
51. Ruppert, T.; Scherer, G.; Tricker, A. R.; Adlkofer, F.; *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **1997**, 69, 247.
52. Maestri, L.; Coccini, T.; Imbriani, M.; Ghittori, S.; Manzo, L.; Bin, L.; Pezzagno, G. *Toxicol. Lett.* **1996**, 88 (Supl.1), 43.
53. Boogaard, P. J.; Van Sittert, N. J.; *Occup. Environ. Med.* **1995**, 52, 611.
54. Lee, B.-L.; New, A.-L.; Kok, P.-W.; Ong, H.-Y.; Shi, C.-Y.; Ong, C.-N.; *Clin. Chem.* **1993**, 39, 1788.
55. Ghittori, S.; Maestri, L.; Fiorentino, M.L.; Imbriani, M.; *Int. Arch. Occup. Health* **1995**, 67, 195.
56. Kivistö, H.; Pekari, K.; Peltonen, K.; Svinhufvud, J.; Veidebaum, T.; Sorsa, M.; Aitio, A.; *Sci. Total Environ.* **1997**, 199, 49.
57. Buratti, M.; Pellegrino, O.; Valla, C.; Fustinoni, S.; Colombi, A.; *Med. Lav.* **1997**, 88, 208.
58. Ong, C. N.; Kok, P. W.; Ong, C. Y.; Shi, C. Y.; Lee, B. L.; Phoon, W. H.; Tan, K. T.; *Occup. Environ. Med.* **1996**, 53, 328.
59. Boogaard, P. J.; Van Sittert, N. J.; *Environ. Health Perspect.* **1996**, 104, 1151.
60. Inoue, O.; Seiji, K.; Nakatsuka, H.; Watanabe, T.; Yin, S.-N.; Li, G.-L.; Cai, S.-X.; Jin, C.; Ikeda, M.; *Br. J. Ind. Med.* **1989a**, 46, 122.
61. Bechtold, W. E.; Lucier, G.; Birnbaum, L. S.; Yin, S. N.; Li, G. L.; Henderson, R. F.; *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **1991**, 52, 473.
62. Schad, H.; Schäfer, F.; Weber, L.; Seidel, H.J.; *J. Chromatogr.* **1992**, 593, 147.
63. Bartczak, A.; Kline, S. A.; Yu, R.; Weisel, C. P.; Goldstein, B. D.; Witz, G.; Bechtold, W. E.; *J. Toxicol. Environ. Health* **1994**, 42, 245.
64. Popp, W.; Rauscher, D.; Müller, G.; Angerer, J.; Norpoth, K.; *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **1994**, 66, 1.
65. Ruppert, T.; Scherer, G.; Tricker, A. R.; Rauscher, D.; Adlkofer, F.; *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.* **1995**, 666, 71.
66. Maestri, L.; Ghittori, S.; Fiorentino, M. L.; Imbriani, M.; *Med. Lav.* **1995**, 86, 40.
67. Yu, R.; Weisel, C. P.; *J. Toxicol. Environ. Health* **1996**, 48, 453.
68. Weaver, V. M.; Davoli, C. T.; Heller, P. J.; Fitzwilliam, A.; Peters, H. L.; Sunyer, J.; Murphy, S. E.; Goldstein, G. W.; Groopman, J. D.; *Environ. Health Perspect.* **1996**, 104, 318.
69. Buratti, M.; Fustinoni, S.; Colombi, A.; *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.* **1996**, 677, 257.
70. Javelaud, B.; Vian, L.; Molle, R.; Allain, P.; Allemand, B.; André, B.; Barbier, F.; Churet, A. M.; Dupuis, J.; Galand, M.; Millet, F.; Talmon, J.; Touron, C.; Vaissière, D.; Vechambre, D.; Vieules, M.; Viver, D.; *Int. Arch. Environ. Health* **1998**, 71, 277.

71. Ducos, P.; Gaudin, R.; Bel, J.; Maire, C.; Francin, J.M.; Robert, A.; Wild, P.; *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **1992**, *64*, 309.
72. Bechtold, W. E.; Henderson, R. F.; *J. Toxicol. Environ. Health* **1993**, *40*, 377.
73. Lauwerys, R. R.; Buchet, J.-P.; Andrien, F.; *Am. J. Ind. Med.* **1994**, *25*, 297.
74. Ong, C. N.; Kok, P. W.; Lee, B. L.; Shi, C. Y.; Ong, H. Y.; Chia, K. S.; Lee, C. S.; Luo, X.W.; *Occup. Environ. Med.* **1995**, *52*, 528.
75. Ghittori, G.; Fiorentino, M. L.; Maestri, L.; Zadra, P.; Imbriani, M. In *Il Benzene – Tossicologia, Ambienti di Vita e di Lavoro*; Minoia et al., Eds.; Morgan Edizioni Tecniche; Milano, 1995a; p 347.
76. Ghittori, S.; Maestri, L.; Rolandi, L.; Lodola, L.; Fiorentino, M. L.; Imbriani, M.; *Appl. Occup. Environ. Hyg.* **1996**, *11*, 187.
77. Gobba, F.; Rovesti, S.; Borella, P.; Vivoli, R.; Caselgrandi, E.; Vivoli, G.; *Sci. Total Environ.* **1997**, *199*, 41.
78. Kok, P. W.; Ong, M. K.; Wong, W. K.; Au, K. T.; Phdoon, W. H.; Ong, C. N.; *Environ. Monit. Assess.* **1997**, *44*, 425.
79. Barbosa, E. M. *Dissertação de Mestrado*. CESTEH, Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz. 1997.
80. Melikian, A. A.; Prahalad, A. K.; Hoffmann, D.; *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **1993**, *2*, 47.
81. Brondeau, M. T.; Ducos, P.; Gaudin, R.; Morel, G.; Bonnet, P.; Ceaurriz, J.; *Toxicol. Lett.* **1992**, *61*, 311.
82. Zielinska-Psujka, B.; Orłowski, J.; *Toxicol. Lett.* **1995**, *78* (Supl.1) 87.
83. Witz, G.; Kirley, T. A.; Maniara, W. M.; Mylavarapu, V. J.; Goldstein, B. D.; *Adv. Exp. Med. Biol.* **1991**, *283*, 613.
84. Ong, C. N.; Lee, B. L.; Shi, C. Y.; Ong, H. Y.; Lee, H. P.; *Int. J. Cancer* **1994**, *59*, 177.
85. Parke, D. V.; Williams, R. T.; *Biochem. J.* **1951**, *48*, 624.
86. Snyder, R.; Hedli, C. C.; *Environ. Health Perspect.* **1996**, *104* (sup. 6), 1165.
87. Devlin, T. M.; *Textbook of Biochemistry with clinical correlation*. 3<sup>a</sup> ed., John Wiley & Sons, Inc., N. York, 1993, 522.
88. Van Sittert, N. J.; Boogaard, P. J.; Beulink, G. D.; *Br. J. Ind. Med.* **1993**, *50*, 460.
89. Jongeneelen, F. J.; Dirven, H. A. A. M.; Leijdekkers, C.-M.; Henderson, P. T.; *J. Anal. Toxicol.* **1987**, *11*, 100.
90. Stommel, P.; Müller, G.; Stücker, W.; Verkoyen, C.; Schöbel, S.; Norpoth, K.; *Carcinogenesis* **1989**, *10*, 279.
91. Schäfer, F.; Schad, H.; Weber, L.; *J. Chromatogr.* **1993**, *620*, 239.
92. Maestri, L.; Bhattori, S.; Grignani, E.; Fiorentino M. L.; Imbriani, M.; *Med. Lav.* **1993**, *84*, 55.
93. Einig, T.; Dehnen, W.; *J. Chromatogr. A* **1995**, *697*, 371.
94. Einig, T.; Dunemann, L.; Dehnen, W.; *J. Chromatogr. B: Biomed. Appl.* **1996**, *687*, 379.
95. Angerer, J.; Schildbach, M.; Krämer, A.; *J. Anal. Toxicol.* **1998**, *22*, 211.
96. Maestri, L.; Ghittori, S.; Imbriani, M.; *Ind. Health* **1997**, *35*, 489.