

AValiação DA CONTAMINAÇÃO HUMANA POR HIDROCARBONETOS POLICÍCLICOS AROMÁTICOS (HPAS) E SEUS DERIVADOS NITRADOS (NHPAS): UMA REVISÃO METODOLÓGICA**Annibal D. Pereira Netto**

Departamento de Química Analítica - Instituto de Química - Universidade Federal Fluminense - Outeiro de São João Batista, s/n - Valonguinho - 24020-150 - Niterói - RJ

Josino C. Moreira, Ana Elisa X. O. Dias

Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana - Escola Nacional de Saúde Pública - Fundação Oswaldo Cruz (CESTE/ENSP/FIOCRUZ) - Av Brasil, 4365 - 21041-210 - Rio de Janeiro - RJ

Graciela Arbilla

Departamento de Físico-Química - Instituto de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro - Ilha do Fundão - Rio de Janeiro - RJ

Luiz Filipe V. Ferreira, Anabela S. Oliveira

Centro de Química-Física Molecular - Complexo Interdisciplinar - Instituto Superior Técnico - Av. Rovisco Pais, 1096 - Lisboa - Portugal

Jiri Barek

Department of Analytical Chemistry - Charles University - Albertov 2030 - Prague - Czech Republic

Recebido em 19/10/99; aceito em 30/5/00

EVALUATION OF HUMAN CONTAMINATION WITH POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS (PAHS) AND THEIR NITRATED DERIVATIVES (NHPAS): A REVIEW OF METHODOLOGY. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their nitroderivatives (NPAHs) are ubiquitous in the environment and they are produced in several industrial and combustion processes. Some of these compounds are potent carcinogens/mutagens and their determination in biological samples is an important step for exposure control. A review of the analytical methodologies used for the determination of PAHs and their metabolites in biological samples is presented.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons and nitroderivatives; human contamination; carcinogenic/mutagenic compounds.

INTRODUÇÃO

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) constituem uma família de compostos caracterizada por possuírem 2 ou mais anéis aromáticos condensados. Estas substâncias, bem como seus derivados nitrados e oxigenados, têm ampla distribuição e são encontrados como constituintes de misturas complexas em todos os compartimentos ambientais.

De maneira geral, tanto os HPAs quanto seus derivados estão associados ao aumento da incidência de diversos tipos de cânceres no homem¹⁻⁴.

A elevada taxa de mortalidade (cerca de 6,5 milhões de pessoas morrem de câncer anualmente) e o fato de que os tratamentos para estas doenças são dispendiosos, demorados e normalmente trazem muito sofrimento aos doentes, expõem claramente os benefícios potenciais que o entendimento, a avaliação e o controle da exposição humana a substâncias que possuam atividade carcinogênica/mutagênica podem trazer, particularmente quando sabe-se que a grande maioria dos cânceres resulta de interações genéticas e ambientais, sendo as causas externas (ambientais), em conjunção com fatores de suscetibilidade adquirida, as mais importantes⁷³. No caso dos HPAs e seus derivados, isto é feito geralmente através do monitoramento dos níveis ambientais desta substâncias, do conhecimento das suas vias de penetração no organismo, de seu metabolismo, bem como da avaliação precoce de seus efeitos biológicos. Vários componentes deste grupo são capazes de reagir diretamente, ou após sofrerem transformações metabólicas, com o DNA, tornando-se potenciais carcinógenos e eficientes mutágenos^{1,5-9}.

Dentre suas inúmeras fontes, podem ser citados os processos de combustão de material orgânico (particularmente a exaustão de motores a diesel ou a gasolina), a queima de carvão, as fotocopiadoras, a exaustão de plantas de incineração de

rejeitos, a fumaça de cigarro além de vários processos industriais como, por exemplo, a produção de alumínio e a gaseificação do coque, etc^{3,8-13}.

A composição e a complexidade das misturas de HPAs dependem das fontes emissoras. Em geral essas misturas são bastante complexas, contêm uma grande variedade de HPAs em diferentes níveis de concentração.

Os HPAs, por suas ubiqüidades, constituem uma ameaça potencial para a saúde de toda a população. No entanto, alguns grupos populacionais, como por exemplo aqueles constituídos por pessoas que residem ou trabalham em ambientes diretamente influenciados por estas fontes, estão submetidos a um risco maior.

A seriedade dos efeitos que a exposição aos HPAs pode ter sobre o organismo humano fez com que especial atenção fosse dedicada ao desenvolvimento de metodologias analíticas hábeis para identificação e determinação de bioindicadores da concentração absorvida (dose interna), da concentração presente nos sítios de ação biológica críticos (dose biológica efetiva) assim como de quaisquer efeitos precoces. Em todos os casos, a variabilidade da composição das misturas, a complexidade das amostras e as baixas concentrações que, em geral, são observadas, exigem a utilização de métodos analíticos altamente seletivos e de elevada sensibilidade.

Esta revisão apresenta alguns aspectos do metabolismo humano destas substâncias e sumariza as principais metodologias analíticas utilizadas para avaliação da exposição humana, procurando realçar a necessidade de maiores investimentos nesta área.

ABUNDÂNCIA, CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E EXPOSIÇÃO HUMANA

A exposição humana aos HPAs se dá principalmente através da contaminação ambiental. Estudos realizados na Inglaterra

estimam que um total de cerca de 54.000 toneladas destas substâncias contaminam atualmente o ambiente no território do Reino Unido. Processos de combustão de matéria orgânica seriam responsáveis pela introdução de cerca de 1000 toneladas/ano, das quais os veículos motorizados responderiam por cerca de 80 toneladas/ano. Esta contribuição é mais significativa (> 35%) nas grandes cidades^{11,14,15}, mas outros processos, como incêndios em florestas, também podem emitir quantidades significativas de HPA para atmosfera⁷⁷⁻⁷⁹.

Os níveis de HPAs encontrados em amostras ambientais e biológicas são mostrados da Tabela 1.

Tabela 1. Níveis de HPAs encontrados em amostras ambientais e biológicas⁴⁶.

Tipo de amostra	Concentração
Ar	1,3 a 500 ng/m ³
Solo	0,8 ng/kg – 100 mg/kg
Água	2,5 a 500 ng/L
Plantas	< 150 ug/kg
Alimentos	0,1 A 20 ug/kg

Em geral, as concentrações ambientais de seus derivados nitrados e oxigenados são cerca de 100 a 1000 vezes inferiores àquelas dos correspondentes HPAs.

Algumas propriedades físico-químicas importantes para se entender o comportamento ambiental e biológico de representantes do grupo dos HPAs são mostradas na Tabela 2.

Como pode ser observado na Tabela 2, estas substâncias são pouco solúveis em água e, em geral, sua solubilidade diminui com o aumento do número de anéis. HPAs apresentam também,

coeficientes de partição octanol/água superiores a 1000, demonstrando grande afinidade lipofílica que aumenta com o número de anéis aromáticos da molécula.

Por outro lado, a volatilidade destes compostos diminui com o aumento do peso molecular e, conseqüentemente, HPAs de pesos moleculares mais baixos são mais voláteis e apresentam maiores pressões de vapor que os mais pesados. O mesmo é observado com os valores da constante de Henry que diminui com o aumento do peso molecular destas substâncias¹⁶.

Como conseqüência destas propriedades, na atmosfera, estas substâncias podem ser encontradas tanto na fase gasosa quanto adsorvidas no material particulado. A concentração de cada componente em ambas as fases é função de sua volatilidade e de sua afinidade pelas superfícies das partículas atmosféricas.

No solo, HPAs encontram-se geralmente adsorvidos no material constituinte e ficam retidos nas camadas superiores. As meias vidas dos compostos de maior peso molecular são relativamente elevadas e indicam que sua degradação é lenta³⁷.

Em virtude de suas propriedades físico-químicas e da grande distribuição ambiental, o risco de contaminação humana por estas substâncias é significativo. De fato, devido ao seu caráter lipofílico, HPAs e seus derivados podem ser absorvidos pela pele, por ingestão ou por inalação, sendo rapidamente distribuídos pelo organismo.

A quantidade absorvida por inalação varia de acordo com o grau de contaminação atmosférico, que está diretamente relacionado com a urbanização, ao tráfego de veículos automotores (principalmente motores diesel) e com o tipo e a industrialização da área. Em ambientes fechados, a fumaça de cigarro e as fontes de aquecimento podem contribuir para o aumento dos níveis ambientais de HPAs. Alguns processos industriais (Tabela 3) também contribuem significativamente para o aumento da concentração atmosférica destas substâncias.

Tabela 2. Propriedades físico-químicas de alguns HPAs e NHPAs^{16,5}.

Substância	Peso molecular (g/mol)	Pressão de vapor (Pa, 25° C)	Log K _(o/a)	Constante de Henry	Solubilidade em água (mg/L)	tempo de meia vida no solo *
Naftaleno	128	36,8	3,37	1,74x10 ⁻²	31	<125 d
Acenaftileno	152	4,14	4,00	3,39x10 ⁻³	16,1	43 – 60 d
Fluoreno	166	0,71	4,18	3,18x10 ⁻³	1,9	32 d
Fenantreno	178	0,113	4,57	1,31x10 ⁻³	1,1	2 d
Antraceno	178	0,0778	4,54	1,60x10 ⁻³	0,045	50 d – 1,3 a
Pireno	202	0,0119	5,18	3,72x10 ⁻⁴	0,132	210 d – 5,2 a
Benzo[a]pireno	252	2,13x10 ⁻⁵	6,04	1,86x10 ⁻⁵	0,0038	269 d – 8,2 a
Benzo[ghi]perileno	276	2,25x10 ⁻⁵	6,5	3,03x10 ⁻⁵	0,00026	<9,5 a
Coroneno	300	1,98x10 ⁻¹⁰	6,75	1,72x10 ⁻⁷	0,00014	-
1-Nitronaftaleno	173	6,38x10 ⁻⁶	3,32	-	18	-
1-Nitropireno	247		4,69			

(*) d = dias e a = ano

Tabela 3. Evidências de carcinogenicidade e/ou mutagenicidade de alguns processos industriais e misturas complexas¹⁹.

Processos/misturas	Evidências epidemiológicas	Evidências experimentais	Classificação pelo IARC; grupo
Produção de alumínio	Suficientes	-	1
Gaseificação de carvão	Suficientes	-	1
Produção de coque	Suficientes	-	1
Produção de eletrodos de carbono	Suficientes	-	1
Betumes (extratos)	-	Suficientes	2 B
Negro de carvão	Inadequadas	Suficientes	2 B
Exaustão de motores a diesel	Limitadas	Suficientes	2 A
Exaustão de motores a gasolina	Inadequadas	Suficientes	2 B
Óleos minerais (não ou pouco tratados)	Suficientes	suficientes	1
Óleo de xisto	Suficientes	suficientes	1
Fuligem	Suficientes	-	1

A absorção dérmica é bastante importante em algumas atividades industriais, podendo ser a responsável por até 90% da quantidade absorvida pelo organismo^{17,18}.

Os alimentos são considerados outra importante fonte de exposição humana, tanto devido à formação de HPAs durante o cozimento, quanto devido à deposição atmosférica sobre grãos, vegetais e frutas.

Estudos realizados com pessoas não fumantes e não ocupacionalmente expostas estimam uma ingestão diária de cerca de 3,12 µg de 8 HPAs (benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, indeno[1,2,3-cd]pireno, dibenzo[a,h]antraceno e benzo[ghi]perileno) sendo os alimentos, responsáveis por cerca de 96% desta ingestão. O restante é absorvido diretamente do ar (1,6%), da água (0,2%) e do solo (0,4%).

Fumantes que consomem 1 maço de cigarros sem filtro por dia podem ingerir um adicional entre 1 - 5 µg¹⁷.

Quando absorvidos diretamente da fase gasosa, os HPAs são rapidamente metabolizados e eliminados pelo organismo (o BaP, por exemplo, é eliminado em cerca de 1 hora). Entretanto, quando estão associados a partículas respiráveis, esta eliminação é bem mais demorada podendo levar semanas. Por serem rapidamente metabolizados nos tecidos corpóreos, a bioacumulação não é observada, mesmo nos tecidos ricos em gorduras. As maiores rotas de eliminação destas substâncias após metabolismo hepático, são as fezes e a urina.

GENOTOXICIDADE (MUTAGENICIDADE E CARCINOGENICIDADE) DOS HPAs E DE SEUS DERIVADOS

O primeiro indício de carcinogenicidade química de produtos de combustão orgânica foi publicado em 1775, quando foi observada uma maior incidência de cânceres em limpadores de chaminés¹⁹. Muitos anos depois desta publicação esta atividade carcinogênica foi atribuída à presença de benzo[a]pireno (BaP) nas amostras.

Posteriormente foi comprovado experimentalmente que a presença do BaP, por si só, não justificava toda a atividade carcinogênica observada nestas amostras, sendo este "excesso de carcinogenicidade", atribuído à presença conjunta de outros membros da família dos HPAs e de alguns de seus derivados, principalmente nitroderivados. Dados sobre a carcinogenicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de alguns HPAs e seus derivados encontram-se na Tabela 4.

Estudos posteriores conduziram à identificação de vários processos industriais e misturas complexas dotados de potencial mutagênico e/ou carcinogênico atribuídos a presença destas substâncias. Alguns destes processos e misturas são mostrados na Tabela 3.

METABOLISMO DOS HPAs E DE SEUS DERIVADOS NITRADOS

A biotransformação dos HPAs envolve uma série de enzimas que catalisam reações de oxidação, redução e hidrólise (oxigenases de função mista, citocromo P 450, NADPH-citocromo-c-redutase) e de enzimas que catalisam reações de conjugação (sulfotransferase, epóxido hidrolase, glutathione-S-transferase e UDP-glicotransferase). Estas enzimas estão distribuídas em todos os tecidos orgânicos⁷⁵.

Monoxigenases dependentes do citocromo P 450 (CYP1A) são responsáveis pela oxidação enzimática dos HPAs. Elas agem principalmente sobre a região de elevada densidade eletrônica ou a nível da região angular da molécula do HPA formando óxidos de arenos (epóxidos) que podem espontaneamente formar fenóis ou, por ação das epóxido hidrolases, produzirem di-hidrodióis vicinais^{46,75}.

Destes fenóis, alguns são oxidados a quinonas e outros podem sofrer nova epoxidação levando à formação de epóxidos secundários (di-hidrodiolépóxidos). O carbono benzílico dos dihidrodiolépóxidos é capaz de reagir com as bases nucleofílicas

Tabela 4. Dados relativos aos efeitos carcinogênicos, genotóxicos e mutagênicos de alguns HPAs e NHPAs^{37,5}.

HPA	Carcinogenicidade	Genotoxicidade	Mutagenicidade
Fluoreno	I	L	-
Fenantreno	I	L	+
Antraceno	N	N	-
Fluoranteno	N	L	+
Pirene	N	L	+
Benzofluorenos	I	I	?
Benzofluorantenos	S	I	+
Ciclopenta[cd]pireno	L	S	+
Benzo[a]antraceno	S	S	+
Criseno	L	L	+
Trifenileno	I	I	+
Benzo[e]pireno	I	L	+
Benzo[a]pireno	S	S	+
Perileno	I	I	+
Indeno[1,2,3-cd]pireno	S	I	+
Dibenz[ac]antraceno	L	S	+
Dibenz[a]antraceno	S	S	+
Dibenz[aj]antraceno	L	I	+
Benzo[ghi]perileno	I	I	+
Antantreno	L	I	+
Coroneno	I	I	+
Dibenzo[ae]fluoranteno	L	N	-
Dibenzopirenos	S	I	+
2-nitronaftaleno	N	L	-
1-nitropireno	I	S	+
Dinitropireno			+

Dados disponíveis para a comprovação do efeito: S = suficientes; I = insuficientes; L = limitados; N = não carcinogênico. Genotoxicidade foi avaliada através dos testes de deterioração do DNA; aberração cromossômica, mutagenicidade. Mutagenicidade (teste de Ames): + (positivo); - (negativo); ? (inconclusivo)

do DNA, notadamente a guanidina e, eventualmente, iniciar um processo mutagênico. Reações semelhantes são observadas com outras macromoléculas tais como a albumina e a hemoglobina^{46,75}.

Os di-hidrodiolépidos são altamente instáveis e, quando não reagem rapidamente, são hidrolizados a tetróis, cuja formação pode ser utilizada como bioindicador da formação de diolépidos.

Os fenóis, as quinonas e os di-hidrofenóis podem sofrer conjugação formando sulfatos e glucuronatos. Os óxidos de aenos, as quinonas e os diolépidos também reagem com o glutatíon e podem ser eliminados através da urina sob a forma de tioéteres. Uma representação simplificada do metabolismo do BaP pode ser vista na Figura 1.

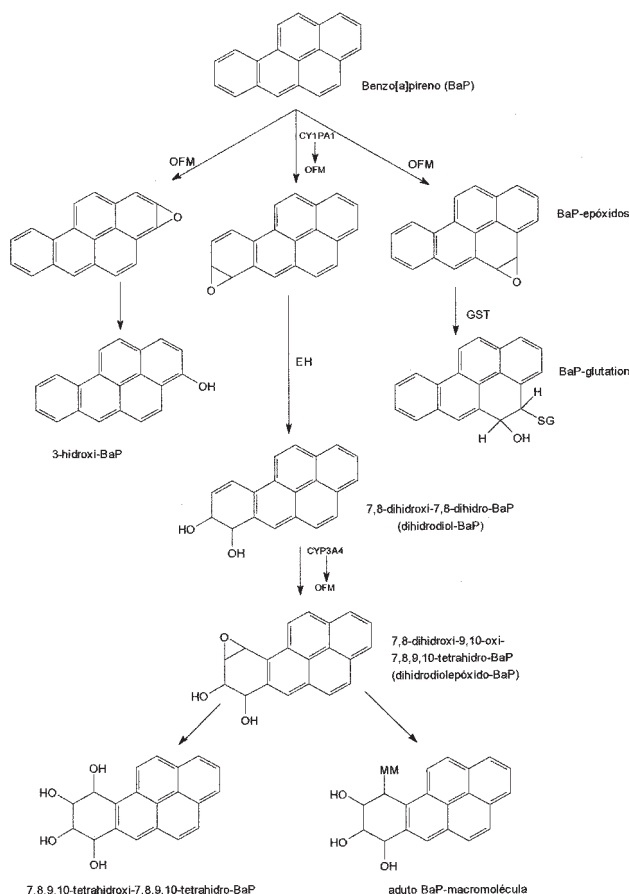


Figura 1. Representação esquemática simplificada do metabolismo de benzo[a]pireno em humanos⁷⁵.

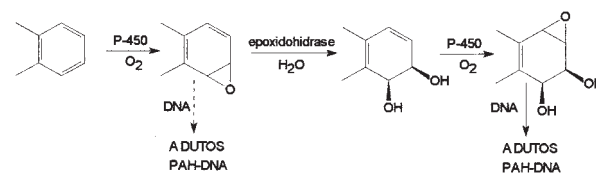
Os NHPAs são, comprovadamente, potentes mutágenos para *Salmonella typhimurium* (teste de Ames), para bactérias e células eucarióticas (células de ovário de hamsters, células epiteliais de ratos -RL4). Estas substâncias são capazes de provocar mutações mesmo sem sofrerem qualquer tipo de ativação metabólica. Mononitro derivados são geralmente metabolizados através de processos oxidativos gerando espécies semelhantes àquelas formadas pelos HPAs (diolépidos e aminodiolépidos) capazes de formar adutos por reação com a deoxiguanosina. Sofrem igualmente redução do grupo nitro a N-hidroxilamina com formação de um intermediário capaz de reagir com C-8 da deoxiadenosina formando adutos²¹. Os dinitro derivados sofrem geralmente redução de um dos grupos nitro envolvendo um ou dois elétrons. Em geral os dinitroderivados são mais potentes mutágenos que os mononitro. Estudos têm atribuído aos NHPAs cerca de 50% da mutagenicidade observada em material particulado coletado em residências urbanas²².

REATIVIDADE COM MACROMOLÉCULAS BIOLÓGICAS

Alguns trabalhos relacionando a atividade carcinogênica/mutagênica dos vários HPAs com suas estruturas químicas têm sido publicados²³⁻³⁴. Conforme dito anteriormente, os HPAs não são mutagênicos diretos e necessitam sofrer ativação metabólica preliminar para se tornarem capazes de reagir com o DNA e outras macromoléculas.

Quatro mecanismos³⁵ têm sido propostos para explicar a ativação de HPAs: 1) oxidação enzimática seguida de hidrólise com a formação de diolépidos (é o mecanismo mais aceito); 2) formação de ésteres benzílicos, eletrofílicos, através de uma série de reações de substituição³⁴; 3) produção de radicais catiônicos através da oxidação enzimática com envolvimento de um elétron e 4) de-hidrogenação enzimática dos metabólitos di-hidrodióis produzindo quinonas capazes de reagirem diretamente com o DNA ou capazes de reagirem com O₂ gerando espécies oxigenadas reativas, como radicais hidroxilas ou ânions superóxidos que atacam o DNA, conforme representado na Figura 2. Estes mecanismos não são excludentes, podendo ocorrer simultaneamente³⁵.

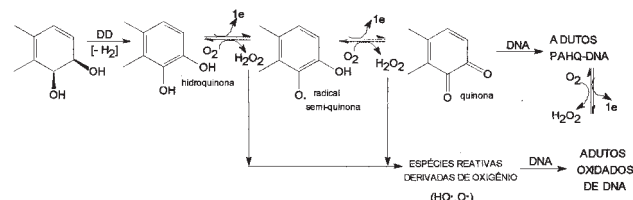
1) Mecanismo por formação de diol-epóxido:



2) Mecanismo por formação de radical-cátion:



3) Mecanismo via formação de quinona:



4) Mecanismo por oxidação benzílica:

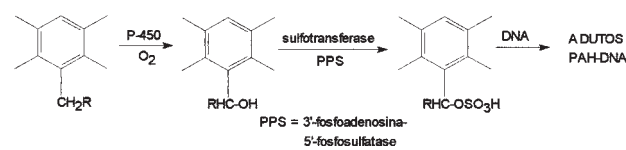


Figura 2. Representação esquemática dos diversos mecanismos de formação de adutos entre HPAs e DNA³⁵.

De acordo com a hipótese atualmente mais aceita, a ligação entre os diolépidos, resultantes da ativação metabólica destas substâncias e o DNA são favorecidas quando diolépidos vicinais são formados (região de "baía"), principalmente nas moléculas não lineares, como o benzo[a]antra ceno, cujo produto de ativação metabólica pode ser visto na Figura 3.

É provável que o ataque eletrofílico do DNA aos epóxidos ocorra através de um mecanismo do tipo SN1 e se processe através de estados de transição nos quais os hidrocarbonetos exibem significativo caráter de íon carbonium. Assim a reatividade com o DNA e, conseqüentemente a capacidade carcinogênica destes

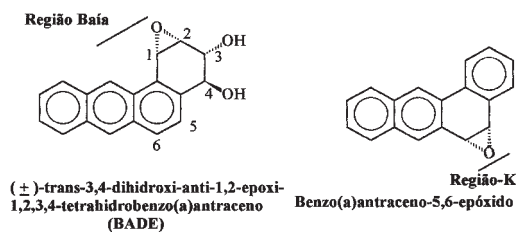


Figura 3. Representação esquemática do benz[a]antraceno com diolépoído na região de baía (A) e de fjord ou região K (B) adaptada das referências 28,30.

compostos, estaria diretamente relacionada com a facilidade de formação destes íons.

De fato, a reatividade observada para os metabólitos possuindo diolépoído na região de baía comparada com aqueles que a possuem na região K (fjord) mostram maior reatividade dos primeiros, provavelmente como resultado do acesso mais fácil aos orbitais π^{13} .

Algumas relações têm sido encontradas entre modelos teóricos que envolvem alguns parâmetros moleculares como o orbital molecular vago de mais baixa energia, a hidrofobicidade e o número de anéis aromáticos e a mutagenicidade³⁶

Resultados de testes laboratoriais realizados com diversos HPAs para a verificação de suas atividades carcinogênicas, mutagênicas ou genotóxicas mostraram que os efeitos dos diferentes compostos são variáveis, como mostrado na Tabela 4.

Também pode ser observado nos dados da Tabela 4 que a capacidade carcinogênica e mutagênica dos diferentes HPAs é significativa para aqueles que possuem mais de 4 anéis aromáticos fundidos e maior para os que têm 5 ou 6 anéis. A substituição de hidrogênio por grupos químicos, também pode afetar drasticamente a atividade dos HPAs dependendo da posição onde a substituição se dá e do grupo substituinte³⁷.

A presença simultânea de vários destes compostos no ambiente faz com que a avaliação de suas genotoxicidades a partir de amostras ambientais seja muito difícil. Isto também dificulta estudos de correlação pois a via de introdução de HPAs no organismo influencia seu poder carcinogênico/mutagênico bem como a localização dos tumores.

Estas características variam de uma espécie animal para outra³⁸ e na espécie humana, a via respiratória é considerada a mais importante, particularmente para indivíduos ocupacionalmente expostos, mas em muitos casos, a via dérmica pode ser tão ou mais importante³⁹. Muitas destas substâncias têm efeito negativo sobre o sistema imunológico animal, característica que parece estar associada à capacidade carcinogênica⁴⁰.

Um esquema proposto para a carcinogênese por exposição ambiental considera as seguintes etapas: exposição ambiental, ativação metabólica, formação de adutos entre os HPAs e o DNA, mutação em genes críticos como, por exemplo, o P 53 (gene repressor de tumor) e sucessão de mutações em outros genes⁴¹.

É importante realçar que o aparecimento do câncer é um processo que envolve várias etapas (não apenas a formação de adutos com o material genético), sendo também influenciado por suscetibilidade individual e outros fatores, tais como gênero, etnia, idade, estado de saúde, nutrição e polimorfismo genético^{73,75}. Em geral, maior concentração de adutos HPAs-DNA é encontrada em fumantes ou pessoas ocupacionalmente expostas⁷⁵.

MONITORAMENTO BIOLÓGICO DA EXPOSIÇÃO A HPAS E A SEUS DERIVADOS NITRADOS

O monitoramento biológico da exposição a estas substâncias pode ser feito através da avaliação das mesmas como mistura ou individualmente, da determinação da concentração dos seus metabólitos em fluidos biológicos ou ainda através do acompanhamento de um efeito bioquímico resultante de sua presença no organismo, como aqueles apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Bioindicadores utilizados na avaliação da exposição a HPAs e seus derivados adaptada das referências 42,44.

Bioindicador	Tipo de informação
Substância química e/ou seus metabólitos em material biológico (urina, etc)	Dose interna*
Mutagenicidade urinária	Dose interna
Tioéteres urinários	Dose interna
Adutos com proteínas	Dose biológica efetiva**
Adutos com DNA (RNA)	Dose biológica efetiva
Proteínas oncogênicas	Dose biológica efetiva
Mutações celulares	Efeito biológico precoce
Aberrações cromossômicas	Efeito biológico precoce
Troca de cromatídeos irmãs	Efeito biológico precoce
Micronúcleos	Efeito biológico precoce
Síntese não programada de DNA	Efeito biológico precoce

* - Um indicador biológico de dose interna indica a quantidade total da substância introduzida no organismo. É usualmente a própria substância ou um de seus metabólitos presentes em fluidos biológicos.

** - Um indicador de dose biológica efetiva indica a quantidade da substância que atingiu sítios biológicos significativos. Geralmente esta indicação é dada através de produtos de interação da substância ou seus metabólitos com macromoléculas celulares (DNA, RNA ou proteínas)⁴².

Técnicas Cromatográficas

Técnicas cromatográficas de cromatografia à líquido de alta eficiência com detecção fluorimétrica (CLAE-FLUO) e de cromatografia à gás de alta resolução acoplada à espectrometria de massas (CGAR-EM) têm sido utilizadas para estudos da exposição humana a HPAs através da determinação urinária alguns de seus metabólitos (fenantrenos hidroxilados⁴³ e principalmente, de 1-hidroxipireno⁴⁴). Em geral estas metodologias são bastante simples, não trabalhosas e podem ser utilizadas rotineiramente, como aquela preconizada para a determinação do 1-hidroxipireno. Entretanto a utilização destes procedimentos técnicos é bastante restrita como metodologia de avaliação geral, uma vez que a composição das misturas de HPAs é bastante variável e a avaliação de apenas um metabólito pode dar origem a uma avaliação equivocada da exposição a HPAs⁴⁴.

Geralmente, a determinação dos metabólitos excretados através da urina (indicadores de dose interna), não fornece informações exatas sobre o risco carcinogênico, sendo este, melhor avaliado por determinação de outros bioindicadores, tais como os adutos formados por reação com o DNA. De fato, a grande maioria das substâncias consideradas carcinogênicas para o homem formam adutos com o DNA. Embora a grande maioria dos adutos seja eliminada por processos de reparação, alguns persistentes podem causar mutações permanentes resultando em crescimento celular aberrante e câncer⁴⁵.

Técnicas que utilizam a Fluorescência

HPAs e seus metabólitos apresentam fluorescência molecular devido a sua estrutura eletrônica. O uso de espectroscopia de fluorescência convencional isto é, em solução, é limitada pelo alargamento das bandas de emissão causado pela multiplicidade de estados vibracionais e rotacionais, tem pouca seletividade e não consegue distinguir moléculas semelhantes como por exemplo os HPAs, seus metabólitos (diolépoídos) e os adutos correspondentes, exigindo uma etapa prévia de separação^{46,47}.

Para contornar os problemas observados na espectroscopia de fluorescência convencional, alguns métodos alternativos têm sido propostos, tais como, a espectroscopia de fluorescência

sincronizada (EFS), a espectroscopia de fluorescência com Efeito Shpol'ski (EFES) e a espectroscopia de fluorescência com varredura rápida (EFVR).

A EFS é uma técnica onde uma varredura simultânea dos comprimentos de onda de excitação e de emissão é feita a uma diferença de comprimento de onda constante, correspondente à diferença energética entre os estados S_2 e S_0 . Por exemplo, no caso do estudo de adutos de benzo[a]pireno esta diferença é de 34 nm. Esta técnica tem sido proposta para a determinação de adutos de HPA com macromoléculas e pode ser usada à temperatura ambiente⁴⁸.

A EFES é uma técnica de alta resolução na qual as medidas são realizadas em condições criogênicas, geralmente em soluções de hidrocarbonetos alifáticos, podendo ser usadas fontes convencionais ou lasers para a excitação. A estrutura policristalina formada favorece orientações moleculares bem definidas dando origem a espectros de linhas^{47,49,50} já que está em jogo apenas a diferença de energia entre o estado fundamental e o estado excitado. Esta técnica tem sido utilizada na determinação de HPAs tanto em amostras ambientais de diferentes origens⁵⁰⁻⁵² quanto biológicas⁵².

A EFVR também é uma técnica criogênica de alta resolução e seus detalhes foram descritos recentemente⁴⁸. Lasers (de corantes) são usados para a excitação das moléculas de interesse e os microambientes moleculares (devidos a diferentes grupos) podem ser usados na identificação de diferentes moléculas. Esta técnica tem sido proposta para a identificação de adutos de dibenzo[a,l]pireno e DNA produzidos *in vitro* em microsomas de fígado⁵³.

Estes métodos exigem, em geral, tratamento preliminar das amostras bastante simples.

A maioria dos HPAs e alguns de seus derivados são fluorescentes e esta propriedade pode ser usada para suas determinações nos mais diversos tipos de matrizes, com grande sensibilidade. Limites de detecção da ordem de 10^{-9} - 10^{-11} M são relatados.

Imunoensaios

Imunoensaios têm sido extremamente úteis para a determinação dos HPAs e de seus metabólitos em matrizes biológicas. A facilidade de aplicação destes métodos e a disponibilidade de "kits" para sua realização coloca-os como alternativas viáveis e baratas aos métodos que exigem o uso de equipamentos caros e sofisticados.

Vários imunoensaios têm sido utilizados na determinação de adutos de HPA-DNA com utilização de anticorpos específicos⁵⁴. Os tipos mais utilizados são o ELISA e os radioimunoensaios. Nos ensaios do tipo ELISA os anticorpos são imobilizados por adsorção em uma fase sólida (tubo plástico, partículas poliméricas ou magnéticas). Esta imobilização permite a separação entre os analitos de interesse e outros componentes da amostra, após reação, por simples lavagem. A amostra contendo os HPAs e uma concentração conhecida de HPA marcado com uma enzima (geralmente peroxidase) (HPA-E) é adicionada ao tubo contendo o anticorpo imobilizado. Tanto as moléculas de HPAs livres quanto as de HPA-E competem pelo anticorpo imobilizado e o equilíbrio é atingido em função das concentrações relativas de ambos. Após remoção da amostra e lavagem, um substrato capaz de reagir com a enzima imobilizada formando um produto colorido é adicionado. A cor desenvolvida é medida e correlacionada com a concentração do analito existente (relação inversa: quanto mais intensa a cor menor a concentração do analito). Testes de ELISA têm sido propostos para a determinação de metabólitos de NHPAs na urina. Neste procedimento o extrato é previamente purificado por passagem através de uma coluna de SPE, permitindo determinações entre 8,7 e 217 ng/ml^{55,56}.

Nos casos de radioimunoensaios utiliza-se um marcador radioativo ou um substrato previamente marcado (geralmente com um lantanídeo), uma vez que a determinação será feita radioquimicamente.

A sensibilidade relatada para estes tipos de procedimento é de 1 aduto para 10^8 DNA. Entretanto, reações cruzadas com outros HPA-DNA adutos podem conduzir a resultados errôneos e a especificidade dependerá exclusivamente do tipo de anticorpo utilizado.

Radioimunoensaios (RIA) têm sido utilizados na determinação de benzo[a]pireno e de seus metabólitos no soro sanguíneo. Este procedimento exige extração com hexano e *clean up* com sílica gel. Nestas condições, BaP pode ser medido entre 15 e 40 ng/ml⁵⁷. Vários HPAs e seus metabólitos podem também serem analisados em amostras de urina sem qualquer tratamento preliminar por RIA^{58,59}.

CLAE-FLUO utilizando como fase estacionária octadecil-sílica (C18) também tem sido utilizada na separação e quantificação de adutos. Antes da separação cromatográfica, o DNA é isolado dos leucócitos e o tetrol correspondente ao HPA é separado do DNA por hidrólise ácida. Limite de detecção de 1 aduto para 10^8 nucleotídeos. Esta mesma metodologia tem sido proposta para a determinação de adutos formados entre o benzo[a]pireno e o DNA em grupos de trabalhadores expostos a este HPA. Diferentes valores foram encontrados para diferentes atividades⁶⁰.

Tioéteres urinários

De modo geral, substâncias que são metabolizadas com a produção de intermediários eletrofílicos (potencialmente genotóxicas) sofrem reações de conjugação com grupamentos sulfidríla das moléculas de glutation (tripeptídeo formado por glicina, cisteína e γ -glutamina) catalizadas por enzimas da família glutation-S-transferase. Os produtos formados são normalmente eliminados através das fezes ou da urina, juntamente com produtos de seu catabolismo (uma série de tiocompostos dentre os quais os ácidos mercaptúricos, tióis e disulfetos)^{44,61,62}. A determinação destes tioéteres tem sido proposta para o monitoramento humano da exposição a substâncias eletrofílicas dentre as quais aquelas carcinogênicas/mutagênicas^{63,64}.

A metodologia analítica envolvida nestas determinações inclui, geralmente, três etapas: 1) extração com acetato de etila ou eter etílico em pH 1 ou 2; 2) hidrólise alcalina a 100° C, no escuro; e 3) derivatização com reativo de Ellmann (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitro-benzóico) seguida de determinação espectrofotométrica a 412 nm. Entretanto estes testes não são específicos, apresentam alguns confundidores sérios como por exemplo o fumo e não apresentam sensibilidade suficiente para avaliação da exposição a concentrações moderadamente baixas de HPAs (<10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$).

Outros testes relacionados na Tabela 3, como por exemplo, o de mutagenicidade urinária, são igualmente inespecíficos, pouco sensíveis e não são utilizados rotineiramente⁶⁵⁻⁶⁷.

DETERMINAÇÃO DE ADUTOS COM DNA E OUTRAS MACROMOLÉCULAS

Em geral, substâncias eletrofílicas são capazes de reagir com sítios nucleofílicos de macromoléculas biológicas formando adutos.

Uma vez que a formação de adutos com o DNA é uma etapa crítica na carcinogênese química, a determinação destes compostos pode servir como um bioindicador precoce para o câncer⁶⁸. Vários métodos têm sido propostos para se determinar a formação de adutos entre os HPAs e o DNA e entre HPAs e proteínas. Estes, em geral, utilizam ensaios com marcação através do ³²P, imunoensaios, espectroscopia por fluorescência e CLAE.

Pós marcação com ^{32}P

Um dos procedimentos mais utilizados para a quantificação dos adutos de DNA é aquele feito por pós marcação com ^{32}P ^{53,56}. Nestes casos o DNA modificado é isolado e hidrolizado enzimaticamente produzindo deoxiribonucleosídeo-3'-monofosfato. A seguir, a OH livre da posição 5' deste nucleosídeo é [^{32}P]fosforilada através de reação com [^{32}P]-ATP em presença de polinucleotídeo quinase, a pH 9,5, produzindo deoxiribonucleosídeo-3',5'-bifosfatos. Os produtos resultantes desta reação (nucleotídeos normais marcados e adutos marcados) podem ser separados por cromatografia em camada fina bidimensional em placas de celulose/polietilenoimina (PEI) ou CLAE. Sensitividade da ordem de 1 aduto para $10^7 - 10^8$ nucleotídeos normais pode ser obtida para adutos hidrofóbicos.

Procedimentos para melhorar este limite têm sido desenvolvidos e consistem basicamente na utilização de extração com butanol antes da marcação radioquímica⁶⁹ ou utilização de uma etapa prévia de digestão preferencial dos nucleotídeos normais com nuclease P1⁷⁰. Outros procedimentos, como por exemplo a utilização da imunoafinidade para o enriquecimento dos adutos ou a combinação do enriquecimento enzimático com a extração com solventes orgânicos e separação por CLAE também têm sido propostos. Estes procedimentos têm possibilitado determinação de 1 aduto para $10^9 - 10^{10}$ nucleotídeos normais ($0,3 - 3 \times 10^{-18}$ Mol/g DNA).

Como neste tipo de ensaio pode-se determinar o total de adutos formados pelos diferentes HPAs ou derivados, o mesmo é um bioindicador de exposição a HPA total.

Uma vantagem da utilização desta técnica é que ela não é específica para um dado tipo de aduto, possibilitando determinações múltiplas. Por outro lado, a inexistência de um protocolo analítico reconhecido internacionalmente, a falta de especificidade da análise dos adutos através da radiação β , a baixa capacidade resolutiva da cromatografia em camada fina e a inexistência de padrões dos diferentes adutos, constituem sérias limitações. Este último aspecto é particularmente importante nos casos de exposições múltiplas. Em geral, a identificação de adutos desconhecidos é ainda problemática devido a baixa sensibilidade da espectrometria de massas. Além disto, uma relação clara entre a exposição aos HPAs e a formação de adutos HPA-DNA ainda não está bem estabelecida. Estes procedimentos são operacionalmente muito trabalhosos, o que limita suas utilizações como metodologia de rotina.

Alguns métodos utilizados para a determinação de adutos de DNA são mostrados na Tabela 6.

Adutos com proteínas

A avaliação quantitativa do DNA quimicamente alterado por formação de adutos, normalmente não é fácil devido às pequenas concentrações em que estes produtos são formados, à eficiência dos mecanismos biológicos de reparo, à diluição dos adutos devido a divisão celular e à dificuldade de se

amostrar DNA humano, especialmente tendo-se em conta a grande variedade de órgãos-alvo dos diversos HPAs. Por isto, especial atenção tem sido dada ao estudo dos adutos formados nas reações entre os agentes carcinogênicos e proteínas, como indicadores dos níveis reação com o DNA. Ou seja, acredita-se que os intermediários eletrofílicos que reagem com os sítios nucleofílicos do DNA também reagirão com grupos nucleofílicos de outras macromoléculas, como a albumina, a hemoglobina, etc.

De fato, todas as substâncias químicas capazes de reagir com o DNA, já estudadas, reagem também com a hemoglobina⁴². A correlação entre as concentrações de adutos formados através de reações com proteínas e aquela formada por reação com o DNA tem sido observada em alguns casos, mas não se trata de um fator universal. Mesmo assim, as reações de formação de adutos com as proteínas são úteis no estudo da exposição a formas ativas de carcinogênicos.

O monitoramento feito por esta via apresenta uma série de vantagens como por exemplo a maior facilidade de se obter maiores quantidades dos adutos. As proteínas, por apresentarem baixa taxa de renovação, podem servir como indicadoras de exposição por vários meses.

A hemoglobina é uma das proteínas que tem sido utilizada nestas técnicas e tem um tempo de meia vida de aproximadamente 120 dias, podendo servir como indicador da exposição a agentes mutagênicos durante este período. A albumina também tem sido utilizada e tem um tempo de vida de cerca de 20-24 dias. Neste procedimento, os tetróis correspondentes aos HPA são isolados dos adutos por hidrólise ácida e purificados por extração em fase sólida antes da determinação por CLAE-FLUO.

Adutos de hemoglobina têm sido considerados como possíveis indicadores de exposição mas até agora apenas alguns poucos experimentos são disponíveis. Algumas limitações têm sido relacionadas a esta metodologia⁷². Por exemplo, a hemoglobina humana forma carboxilatos com anti-benzo[a]pireno-diolepóxido que pode ser hidrolisado a benzo[a]pireno-tetrol e utilizado para determinação da exposição a este HPA.

O metabolismo urinário dos HPAs produzem fenóis que são excretados livres ou associados a sulfato ou glucuronídeo. Pequenas quantidades de quinonas podem também ser formadas³⁵. O benzo(a)pireno, por exemplo, é metabolizado a 1-hidroxi-pireno que forma 1-hidroxi-pireno-glucuronídeo e 1,2-di-hidroxi-1,2-di-hidropireno que são excretados pela urina⁷⁴.

A formação de adutos com a hemoglobina humana, após proteólise enzimática e separação por imunocromatografia tem sido utilizada para a quantificação dos adutos em indivíduos expostos²⁰. O aduto crisen-Hb pode ser separado e quantificado por CLAE com detecção fluorométrica a partir de uma fração parcialmente purificada por imunoafinidade. A confirmação dos crisen tetrahidrotetrais é feita por CGAR-EM¹⁸. Adutos de hemoglobina com nitroderivados de HPAs têm sido utilizados como biomarcadores de exposição a gases de exaustão de motores a óleo diesel. Limites de detecção da ordem de 0,01 - 0,08 pMol/g de hemoglobina são relatados⁷⁶.

Tabela 6. Métodos para a detecção de adutos de DNA⁷¹.

Método	Quantificação Número de adutos por nucleotídeos normais	10^{-18} mol/ μg DNA	Quantidade mínima de DNA por ensaio
Marcação com ^3H ou ^{14}C	$1/10^7 - 10^9$	3 - 300	1 mg
CLAE com detecção por fluorescência	$1/10^7$	300	100 μg
Imunoensaios (RIA, ELISA, etc)	$1/10^8$	30	50 μg
Espectroscopia de fluorescência síncrona	$1/10^8$	30	100 μg
CLAE-EM ou CGAR-EM	$1/10^9$	3	100 μg
Marcação com ^{32}P	$1/10^{10}$	0,3	1 μg

CONCLUSÃO

A procura de bioindicadores confiáveis para a o estudo da exposição humana aos HPAs e seus derivados constitui ainda matéria para muita pesquisa. Alguns indicadores específicos, como por exemplo o 1-hidroxipireno, têm sido propostos e utilizados com sucesso nos estudos da exposição humana a determinados HPAs.

Muitos dos bioindicadores propostos para estudo da exposição a misturas apresentam limitações que vão desde a baixa sensibilidade até a grande variabilidade dos resultados obtidos, mostrando a influência de fatores não totalmente controlados sobre a metodologia e reforçando a necessidade da validação metodológica.

Em muitos casos, a existência de outros agentes que podem influenciar os resultados, tais como o hábito de fumar ou mesmo as dificuldades técnicas limitam a utilização. Várias técnicas, como por exemplo os imunoenaios, são bastante promissoras e constituem áreas de pesquisa ainda pouco exploradas e que necessitam desenvolvimento. A importância e atualidade do tema em conjunção com as limitações analíticas das técnicas atualmente disponíveis justificam investimentos científicos e fazem com que esta área seja bastante atraente para desenvolvimentos futuros.

AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de agradecer à CAPES e ao CNPq pelo suporte recebido.

REFERÊNCIAS

- O'Neil, I. K.; Fishbein, K.; *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* **1986**, *26*, 229.
- IARC; *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Chemicals, Industrial Processes and Industries Associated with Cancer in Humans*, vol. 1 - 55, IARC, Lyon, 1970 - 1997.
- IARC; *Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans: Polynuclear Aromatic Compounds*; vol. 32-35, Parts 1-4, IARC, Lyon, 1983 - 1995.
- International Programme on Chemical Safety (IPCS): *Environmental Criteria 202. Selected Non-heterocyclic PAHs*; World Health Organization, Geneva, 1998.
- Moreira, J. C.; Berek, J.; *Quim. Nova* **1995**, *18*, 362; Moreira, J. C.; Kuryiama, G. S.; Berek, J.; In *Idrocarburi policiclici aromatici negli ambienti de vita e di lavoro: esposizione ed effetti*; Apostoli, P.; Minoia, C.; Alessio, L., Eds.; ATTI, Gargnano, 1996, p 63; Cvacka, J.; Berek, J.; Fogg, A. G.; Moreira, J. C.; Zima, J.; *Analyst* **1998**, *123*, 9R; Berek, J.; Cvacka, J.; Moreira, J. C.; Zima, J.; *Chem. Listy* **1996**, *90*, 805.
- Wishnok, J. S.; *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1126 A.
- Selkirk, J. K.; In *Carcinogenesis: A Comprehensive Survey: Modifiers of Chemical Carcinogenesis*; vol 5; Slaga, T. J.; Ed.; Raven Press, N.Y., 1980.
- Fiedler, H.; Mucke, W.; In *The Handbook of Environmental Chemistry*; vol 3G; Hutzinger, O., Ed.; Springer Verlag, Berlin, 1991.
- Jacob, J.; Karcher, W.; Belliardo, J. J.; Dumler, R.; Boenke, A.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1991**, *340*, 755.
- White, C.M.; *Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, Huetchig, Heidelberg, 1985.
- Harvey, R. G.; In *Polycyclic Hydrocarbons and Carcinogenesis*, Harvey, R. G.; Ed.; American Chemical Society, Washington, DC, 1985, p. 371.
- Lopes, W. A.; de Andrade, J. B.; *Quim. Nova* **1996**, *19*, 497.
- Fetzer, S. M.; Huang, C-R.; Harvey, R. G.; LeBreton, P. R.; *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 2385.
- Wild, S. R.; Jones, K. C.; *Environ. Pollut.* **1995**, *88*, 91.
- Latimer, J. S.; Hoffman, E. J.; Hoffman, G.; Fashing, J. L.; Quinn, J. G.; *Water, Air, and Soil Pollut.* **1990**, *52*, 1.
- APARG - Air Pollution Abatement Review Group; *Report on the Abatement of Toxic Organic Micropollutants from Stationary Sources*; Oxfordshire, UK, 1995.
- VanRooij, J. G.; Bodelier-Bade, M. M.; Jongeneelen, F. J.; *Br. J. Ind. Med.* **1993**, *50*, 623.
- Idem; *Scand. J. Work Environ. Health* **1993**, *19*, 200.
- Pott, P.; Chirurgical observations relative to the cataract, the polypus of the nose, the cancer of the scrotum, the different kind of ruptures and the mortification of the toes and feet. Hawes, Clark & Collins, p 63-68, 1775. Apud: International Programme on Chemical Safety (IPCS): *Environmental Criteria 202. Selected Non-heterocyclic PAHs*; World Health Organization, Geneva, 1998.
- Day, B. W.; T. T., Skipper, P. L.; Wishnok, J. S.; Cogle, J.; Hammond S. K.; Gann, P.; Tannenbaum, S. R.; *Chem. Res. Toxicol.* **1990**, *3*, 340; Day, B.W.; Naylor, S.; Gan, L-S.; Sahali, Y.; Nguyen, T. T.; Skipper, P. L.; Wishnok, J.S.; Tannenbaum, S. R.; *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* **1991**, *562*, 563.
- Talaska, G.; Underwood, P.; Maier, A ; Lewtas, J.; Rothman, N.; Jaeger, M.; *Environ. Health Persp.* **1996**, *104*, 901.
- Nardini, B.; Granella, M.; Clonfero, E.; *Mutat. Res.* **1994**, *322*, 193.
- Urano, S.; Price, H. L.; Fetzer, S. M.; Briedis, A. V.; Milliman, A.; LeBreton, P. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 3881.
- Harvey, R. G.; *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Chemistry and Carcinogenesis*; Cambridge University Press, Cambridge, England, 1991.
- Conney, A. H.; *Cancer Res.* **1982**, *42*, 4875.
- Lehr, R. E.; Kumar, S.; Levin, W.; Wood, A. W.; Channg, R. L.; Coney, A. H.; Yagi, H.; Sayer, J. M.; Jerina, D. M.; In *Polycyclic Hydrocarbons and Carcinogenesis*; Harvey, R. G.; Ed.; American Chemical Society, Washington, DC, 1985, p. 63.
- LeBreton, P. R.; In *Polycyclic Hydrocarbons and Carcinogenesis*, Harvey, R. G.; Ed.; American Chemical Society, Washington, DC, 1985, p. 209.
- Zander, M.; In *The Handbook of Environmental Chemistry*; vol 3A; Hutzinger, O.; Ed.; Springer Verlag, Berlin, 1976.
- MacLeod, M. C.; Mansfield, B. K.; Selkirk, J. K.; *Carcinogenesis* **1982**, *3*, 1031.
- Harvey, R. G.; Geacintov, N. E.; *Acc. Chem. Res.* **1988**, *21*, 66.
- Geacintov, N. E.; Hibshoosh, H.; *Biophys. Chem.* **1984**, *20*, 121.
- MacLeod, M. C.; Selkirk, J. C.; *Carcinogenesis* **1982**, *3*, 287.
- Zegar, I. S.; Prakash, A. S.; Harvey, R. G.; LeBreton, P. R.; *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 7990.
- Stansbury, K. H.; Flesher, J. W.; Gupta, R. C.; *Chem. Res. Toxicol.* **1994**, *7*, 254.
- Harvey, R. G.; *Polycyclic Aromatic Compounds* **1996**, *9*, 1.
- Combariza, J. E.; Hajos, A. K. D.; Winston, G. W.; *J. Phys. Chem.* **1995**, *99*, 14539.
- Bouchez, M.; Blanchet, D.; Haeseler, F.; Vandecasteele, J-P.; *Rev Inst. Fr. Petr.* **1996**, *51*, 407.
- Harvey, R. G.; Dunne, F. B.; *Nature* **1978**, *273*, 566.
- Sartorelli, P.; Cenni, A.; Novelli, M. T.; Sciarra, G. F.; In *Idrocarburi policiclici aromatici negli ambienti de vita e di lavoro: esposizione ed effetti*; Apostoli, P.; Minoia, C.; Alessio, L.; Eds.; ATTI, Gargnano, 1996, p 199.
- Jones, D. W.; Matthews, R. S.; In *Progress in Medical Chemistry*, vol 10; Ellis, G.; West, G. B.; Eds.; North Holland, Amsterdam, 1974, p. 159.

41. White, K. L. J. R.; *Environ. Carcin. Revs (J. Environ. Sc. Hlth)* **1986**, C4, 163.
42. Farmer, P. B.; Neumann, H. G.; Henschler, D.; *Arch. Toxicol.* **1987**, 60, 251.
43. Grimmer, G.; Dettbarn, G.; Jacob, J.; *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **1993**, 65, 189.
44. Jongeneelen, F. J.; *Sci. Total Environ.* **1997**, 199, 141.
45. Bishop, J.; *Cell* **1991**, 64, 235.
46. Angerer, J.; Mannuschreck, C.; Gündel, J.; *Int. Arch. Environ. Health* **1997**, 70, 365.
47. Gooijer, C.; Ariese, F.; Hofstraat, J. W.; Velthrost, N. H.; *Trends in Anal. Chem.* **1994**, 13, 53.
48. Day, B. W.; Singh, K.; *Methods Enzimol.* **1994**, 231, 674.
49. Kirkbright, G. F.; Lima, C. G.; *Analyst* **1974**, 99, 338.
50. Ariese, F.; Gooijer, C.; Velthrost, N. H.; Hofstraat, J. W.; *Anal. Chim. Acta* **1990**, 232, 245.
51. Garrigues, P.; Ewald, M.; *Chemosphere* **1987**, 16, 485.
52. Kozin, I.; Gooijer, C.; Velthrost, N. H.; Hellou, J.; Zitko, V.; *Chemosphere* **1996**, 33, 1435.
53. Li, K.-M.; Todorovic, R.; Rogan, E. C.; Cavalieri, E. L.; Ariese, F.; Suh, M.; Jankoviak, R.; Small, G. J.; *Biochemistry* **1995**, 34, 8043.
54. Santella R. M.; *Mutat. Res.* **1988**, 205, 271.
55. Scheppers, P. T. J.; Thuis, H. J. T. M.; Martens, M. H. J.; Bos, P. P.; *Toxicol. Lett.* **1994**, 72, 191.
56. Scheppers, P. T. J.; Beenackers, M. F. M.; de Lepper, A. J. G. M.; Bos, R. P.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1992**, 343, 169.
57. Mastrangelo, G.; Fadda, E.; Marzia, V.; *Environ. Health Persp.* **1996**; 104, 1166.
58. Hagen, I.; Herikstadt, B. V.; *Hereditas* **1988**, 108, 119.
59. Herikstadt, B. V.; Ovrebø, S.; Haugen, A.; Hagen, I.; *Carcinogenesis* **1993**, 14, 307.
60. Pavanello, S.; Favretto, D.; Brugnone, F.; Mastrangelo, G.; Dal Pra, G.; Clonfero, E.; *Carcinogenesis* **1999**, 20, 431.
61. Sorsa, M.; Hemminki, K.; Vainio, H.; *Teratog. Carcinog. Mutag.* **1982**, 2, 137.
62. Berlin, A.; Draper, M.; Hemminki, D.; Vainio, H.; *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **1984**, 54, 369.
63. Chasseaud, L. F.; In *Glutathione conjugation: Mechanisms and biological significance*, Sies, H.; Kefferer, B., Eds.; Academic Press, N. Y., 1988, p 391.
64. Triebig, G.; Schaller, H. K.; Wagner, M.; Weltle, D.; Moser, W.; Valentin, H.; *Sci. Total Environ.* **1988**, 71, 231.
65. Clonfero E.; Zordan M.; Venier P.; *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **1989**, 61, 363.
66. Reutervall C.; Aringer L.; Elinder C. G.; *Scand. J. Work Environ. Health* **1991**, 17, 123.
67. Ferreira Jr, M.; Buchett J. P.; Burrion J. B.; *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **1994**, 65, 329.
68. Beach, A C.; Gupta, R. C.; *Carcinogenesis* **1992**, 13, 1053.
69. Gupta, R. C.; *Cancer Res.* **1985**, 45, 5656.
70. Reddym, M. V.; Randerath, K.; *Carcinogenesis* **1986**, 7, 1543.
71. Stiborová, M.; Frei, E.; Bieler, C. A.; Schmeizer, H. H.; *Chem. Listy* **1998**, 92, 661.
72. Ferreira Jr, M. F.; Tas, S.; dell'Omo, M.; *Occup. Environ. Med.* **1994**, 51, 451.
73. Perera, F.; *Science* **1997**, 278, 1068.
74. Jongeneelen, F. J.; Anziion, R. B.; Henderson, P. T.; *J. Chromatogr.* **1987**, 413, 227.
75. Mutti, A.; Bergamaschi, E.; In *Idrocarburi policiclici aromatici negli ambienti de vita e di lavoro:esposizione ed effetti*; Apostoli, P.; Minoia, C.; Alessio, L., Eds.; ATTI, Gargnano, 1996, p 213.
76. Zwirner-Baier, I.; Neumann, H. G.; *Mutat. Res.* **1999**, 441, 135.
77. Maslacet, P.; Cachier, H.; Lioussse, C.; Wortham, H.; *J. Atmos. Chem.* **1995**, 22, 41.
78. Ramdahl, T.; *Nature* **1983**, 306, 580.
79. Cecinato, A.; Cicciooli, P.; Brancaleoni, E.; Brachetti, A.; Vasconcellos, P. C.; *Annali di Chimica* **1997**, 87, 555.