



Eclética Química

ISSN: 0100-4670

atadorno@iq.unesp.br

Universidade Estadual Paulista Júlio de
Mesquita Filho
Brasil

Sakiara, K. A.; Andrade, S. J. De; Marchi, M. R. R.; Vilegas, W.; Bosso, R. M. V.; Conforti-Froes, N. D.
T.

Otimização e validação de uma metodologia analítica para determinação de 1-hidroxipireno em urina
de cortadores de cana-de-açúcar

Eclética Química, vol. 35, núm. 4, 2010, pp. 113-119
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho
Araraquara, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42919358015>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE UMA METODOLOGIA ANALÍTICA PARA DETERMINAÇÃO DE 1-HIDROXIPIRENO EM URINA DE CORTADORES DE CANA-DE-AÇÚCAR

K. A. Sakiara¹, S. J. De Andrade^{*1}, M. R. R. Marchi¹, W. Vilegas²
R. M. V. Bosso³, N. D. T. Conforti-Froes³

¹Departamento de Química Analítica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Caixa Postal 355, Araraquara (SP), CEP 14800-900, Brasil

* sandro_andrade2003@yahoo.com.br

²Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Caixa Postal 355, Araraquara (SP), CEP 14800-900, Brasil

Resumo: Este trabalho teve como objetivo otimizar e validar uma metodologia analítica para determinação de 1-hidroxipireno em urina de trabalhadores envolvidos na colheita da cana-de-açúcar. O método utilizado para determinação de 1-hidroxipireno em urina humana utilizado consiste na hidrólise enzimática, extração e *clean-up* por extração em fase sólida (SPE) e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência (CLAE/Flu). Quatro tipos de cartuchos foram testados para verificação da porcentagem de recuperação. Urina de cortadores de cana-de-açúcar (não-fumantes e de ambos os sexos) foram coletadas no período da safra (n=39) e entressafra (n=34) da cana-de-açúcar. Os melhores resultados de recuperação foram atribuídos aos cartuchos C18. Os mesmos apresentaram recuperação entre 79% e 108%, com coeficiente de variação entre 5% e 10%. O limite de quantificação do método foi de 74 ng de 1-hidroxipireno por litro de urina. A metodologia otimizada e validada foi utilizada para determinação de amostras reais. Os resultados encontrados na urina dos trabalhadores no período da safra variaram de 0,026 a 2,3 mol de 1-hidroxipireno por mol de creatinina. No período da entressafra os resultados variaram de 0,0023 a 0,38 mol de 1-hidroxipireno por mol de creatinina. A metodologia validada mostrou-se adequada para determinação de 1-hidroxipireno em urina humana. Os dados obtidos permitem concluir que há forte correlação entre excreção de 1-hidroxipireno e os períodos de safra e entressafra da cana de açúcar.

Palavras-chave: Saúde Ocupacional, Urina, 1-Hidroxipireno, Cortadores de Cana-de-Açúcar, Validação de Metodologia Analítica.

Introdução

O Brasil produz (safra 2007/08) aproximadamente 500 milhões de toneladas de cana-de-açúcar [1] fato que o destaca como o maior produtor mundial dessa cultura, seguido pela Índia e Austrália [2]. Apesar da crescente mecanização da colheita da cana-de-açúcar, estimulada principalmente pela Lei

11.241/2002 [3] que estipula um cronograma para a erradicação das queimadas no Estado de São Paulo (maior produtor brasileiro), ainda hoje, grande parte das plantações são queimadas antes da colheita para facilitar o trabalho dos cortadores e protegê-los de animais peçonhentos que se abrigam nas folhagens secas das plantas [2,4]. A queima de biomassa é uma importante fonte de aerossóis para a atmosfera [5].

Estima-se que sua contribuição mundial esteja na ordem de 104 Tg/ano [2,6].

Dentre as várias substâncias liberadas pela combustão da palha da cana de açúcar, encontram-se os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) [7]. Os HPAs constituem uma família de compostos caracterizada por possuírem 2 ou mais anéis aromáticos condensados [8,9]. Vários HPAs são reconhecidos como agentes mutagênicos/carcinogênicos [10]. O pireno, um HPA de quatro anéis condensados, ocorre em altas concentrações na mistura de HPAs atmosférico e é absorvido pelo organismo vivo através da inalação, via oral ou em contato com a pele. O pireno é quase exclusivamente metabolizado em 1-hidróxipireno (1-OHP) (Etapa 1) e depois sofre uma conjugação com ácido glucurônico ou sulfato (Etapa 2). Em ambos os casos, livre ou conjugado, o 1-hidróxipireno é eliminado pelo organismo através da urina [11]. As estruturas química do pireno, 1-OHP e do 1-OHP conjugado com ácido glucurônico são mostradas na Figura 1.

O 1-OHP, foi introduzido como biomarcador de exposição por Jongeneelen e colaboradores [12]. Em seu trabalho, foi desenvolvido um método que vem sendo utilizado em vários estudos envolvendo exposição ocupacional. O método consiste na hidrólise enzimática, seguida por um *clean-up* utilizando extração em fase sólida (SPE) e posterior determinação de 1-OHP por CLAE/Fluorescência. A hidrólise enzimática tem a função de converter o 1-OHP conjugado em 1-OHP livre.

Em nosso trabalho, uma metodologia analítica foi otimizada e validada com o objetivo de determinar 1-OHP em urina de cortadores de cana-de-açúcar da região de Araraquara/SP. A metodologia validada foi aplicada em amostras reais de trabalhadores no período da safra e da entressafra da cana-de-açúcar.

Experimental

Materiais

1-hidróxipireno (98%) (Aldrich, Milwaukee, Wisconsin, USA); -glucuronidase/arylsulfatase (30U/mL and 60 U/mL, respectivamente) (Merck, Darmstadt, Alemanha); metanol grau HPLC (Mallinckrodt, Kentucky, USA). Água deionizada foi obtida de um sistema Milli-Q (Millipore, França). Os cartuchos de SPE utilizados foram: Absolut NEXUS, 60mg (Varian, Harbor City, USA); Sep Pak C₁₈, 360 mg (Waters, Milford, Massachusetts); Supelco C₁₈, 1000 mg (Supelco, Bellefonte, USA); Bond Elut C₁₈, 200 mg (Varian, Harbor City, USA)

Preparação da curva analítica

Solução-estoque (20 µg mL⁻¹) foi preparada dissolvendo-se o analito (1-OHP) em metanol. Soluções-padrão com diferentes concentrações de 1-OHP foram obtidas pela diluição da solução-estoque em metanol. Todas as soluções foram estocadas em frasco âmbar com septo de PTFE. As curvas analíticas foram construídas com urina de pessoas não-expostas fortificada com as soluções-padrão, variando de 0,5 a 10,0 ng mL⁻¹ (Curva Analítica "Extraída").

Instrumentação

Todas as análises foram realizadas num sistema CLAE (Varian, Walnut Creek, USA) composto de uma bomba modelo Pro Star, um injetor automático (modelo 400) e um detector de fluorescência (modelo 360).

Utilizou-se uma coluna cromatográfica de octadecilpolisiloxano (C₁₈) com 250 mm (comprimen-

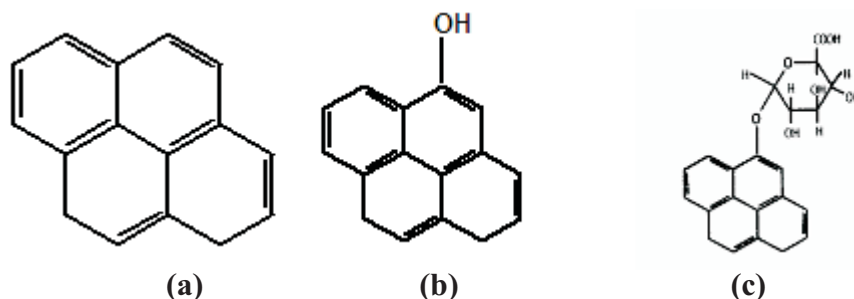


Figura 1. Estrutura química do pireno (a), 1-hidróxipireno (b) e do 1-hidróxipireno/ácido glucurônico (c).

to) x 4,6 mm (diâmetro interno) e 5 m (tamanho de partícula) (Varian, Walnut Creek, USA) protegida com uma pré-coluna. A fase móvel foi composta por um gradiente metanol/água (Gradiente linear: 0–15 min - 46 to 96% metanol, 15-20 min - 96 to 100% metanol). A vazão foi de 0,8 mL min⁻¹ e o volume de injeção foi de 20 L. Os comprimentos de onda de excitação e de emissão foram 242 e 388 nm, respectivamente.

Preparação da amostra

O método para determinação de 1-OHP em urina consistiu em hidrólise enzimática, extração e *clean-up* com cartuchos de SPE e determinação por CLAE/Fluorescência. O pH de uma alíquota de 20 mL de urina foi ajustado com ácido clorídrico 1,0 mol L⁻¹. O volume da solução foi aumentado para 30 mL com solução tampão acetato (pH=5). Essa mistura foi incubada por 2,5 horas com 12,5 L of β -glucuronidase/arylsulfatase à 37°C e centrifugada à 2000 rpm. Então, a amostra foi aplicada em cartuchos de SPE previamente lavados e condicionados. Os volumes de solvente utilizados na lavagem, condicionamento e eluição do 1-OHP foram otimizados. A Tabela I mostra o volume de solvente otimizado para cada cartucho de SPE. Depois da eluição do 1-OHP, o metanol foi evaporado até a secura sob fluxo de nitrogênio à 40-50°C. O resíduo foi dissolvido em 1,0 mL de metanol e o 1-OHP foi quantificado por CLAE/Fluorescência utilizando o método do padrão externo.

Estudos de Recuperação

Estudos de recuperação foram realizados nos níveis de concentração 0,074, 8,39 e 16,78 ng mL⁻¹ de

1-OHP em urina de pessoas não-expostas. Depois da fortificação, a urina foi estocada a -10°C por uma noite antes da análise. A recuperação foi calculada através da razão entre a área do analito na amostra e a área do analito na solução padrão, usando a curva analítica previamente construída.

Descrição das amostras reais

As amostras foram coletadas de trabalhadores envolvidos na colheita da cana-de-açúcar, em dois períodos: período de safra (abril a novembro) e período de entressafra (dezembro a março). As amostras foram coletadas sempre do mesmo grupo de trabalhadores, sendo 39 indivíduos no período da safra e 34 indivíduos no período da entressafra. Cada amostra foi formada por um *pool* de amostras individuais recolhidos no final do turno de trabalho de pelo menos três dias. As amostras foram congelada (-18 °C) e transportadas para o laboratório. As análises foram realizadas 30 dias após a coleta. O procedimento de análise utilizado foi o estabelecido na validação da metodologia.

Resultados e Discussão

Quatro tipos de cartuchos de SPE comerciais foram utilizados com o objetivo de avaliar a recuperação de 1-OHP em urina. A Tabela I mostra os volumes de solventes otimizados para cada cartucho, enquanto que a Tabela II apresenta a recuperação, o tempo e o volume de metanol requerido para a eluição do 1-OHP. A Figuras 2 mostra os cromatogramas do branco. A Figura 3 mostra os cromatogramas

Tabela 1. Volumes de condicionamento, lavagem e eluição usados para os quatro cartuchos comerciais de SPE.

Cartucho	Condicionamento		Lavagem	Eluição
	V _{água} (mL)	V _{metanol} (mL)	V _{água} (mL)	V _{metanol} (mL)
Sep Pak	5	10	8	10
Supelco	10	20	15	20
Bond Elut	5	10	8	12
NEXUS	Fabricante não recomenda condicionamento		8	10

Table 2. Recuperação, tempo requerido e volume usado de metanol.

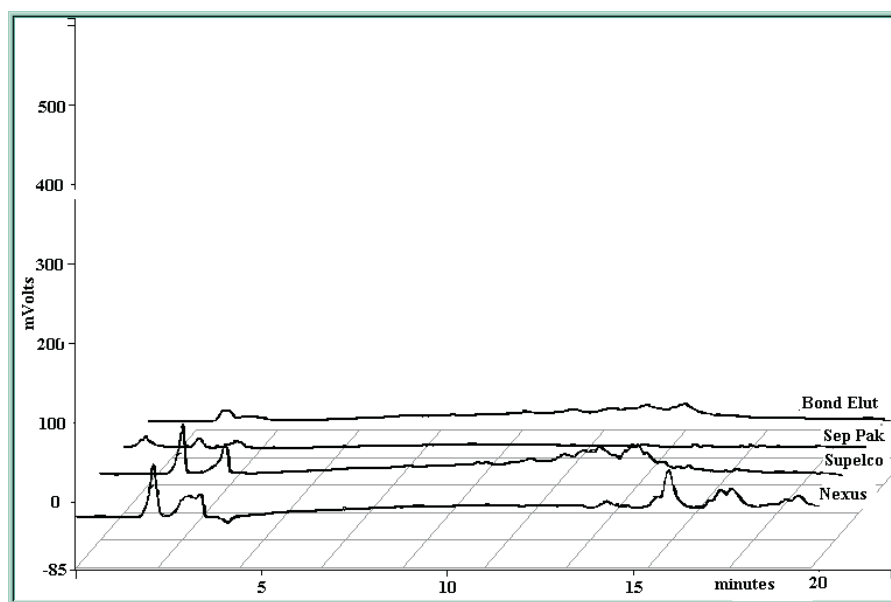
Cartucho	0,074 ng mL ⁻¹	8,39 ng mL ⁻¹ R(%)CV(%)	16,78 ng mL ⁻¹	Tempo (min)*	Consumo de Metanol (mL)
Sep Pak	76 3	74 1	77 1	85	15
Bond Elut	108 10	82 1	79 5	35	17
Supelco	80 9	94 5	110 3	80	30
NEXUS	89 13	58 5	75 8	30	10

*Inclui o tempo de secagem da amostra.

R – Recuperação.

CV – Coeficiente de variação.

Valores da média e do CV foram obtidos através de 3 determinações.

**Figura 2.** Cromatogramas obtidos do branco com cada cartucho.

obtidos de urina fortificada no nível alto (16,78 ng mL⁻¹). O perfil dos cromatogramas nos níveis baixo (0,074 ng mL⁻¹) e médio (8,39 ng mL⁻¹) são semelhantes ao apresentado no nível alto.

Nas condições cromatográficas empregadas, o 1-OHP elui em 13,9 minutos. No intervalo de 10-20 minutos, o cartucho Sep-Pak apresentou melhores resultados, pois obteve-se um cromatograma mais “limpo”. Os cartuchos Supelco e Bond Elut apresentaram cromatogramas similares, sem picos significativos em 13,9 minutos. O cartucho Nexus apresentou um intenso pico próximo à região de eluição do 1-OHP.

Para urina de pessoas não-expostas, os cartuchos Supelco, Bond Elut e Sep-Pak apresentaram cromatogramas com picos alargados entre 2-11 minutos. O cartucho Nexus mostrou um cromatograma totalmente diferente com picos apenas entre 2-3,5 minutos.

A mais alta recuperação obtida foi com cartuchos Bond Elut (108 ± 10 %) e a mais baixa, com cartuchos Sep-pak (76 ± 3 %).

Os picos foram claramente identificados sem interferências em relação a urina, solventes ou cartuchos. Entretanto, através da análise da Tabela II,

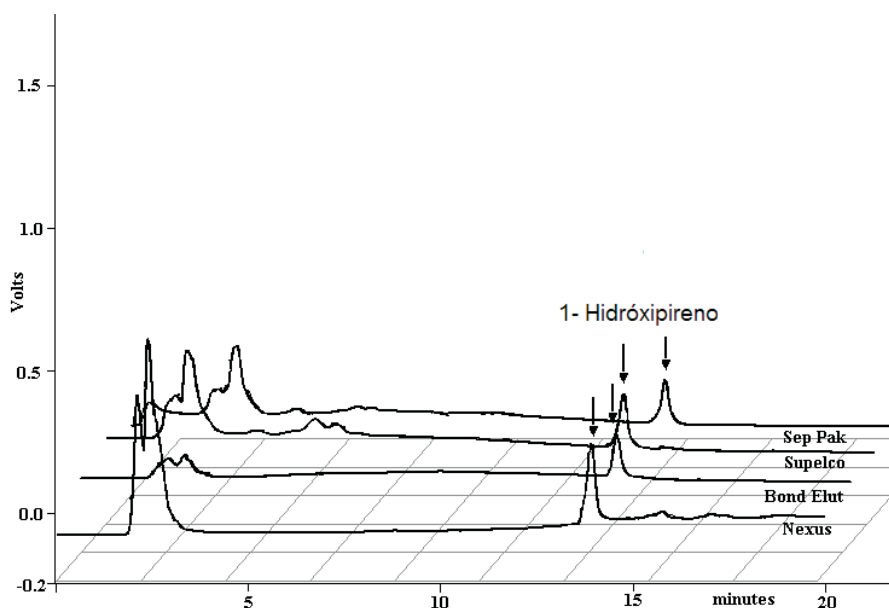


Figura 3. Cromatogramas obtidos com urina de pessoas não-expostas fortificadas no alto nível de concentração ($16,78 \text{ ng mL}^{-1}$).

pode-se verificar que os cartuchos Nexus permitem uma maior recuperação do analito em todos os níveis enquanto que os cartuchos Supelco apresentam melhor recuperação em todos os níveis. Os cartuchos Bond Elut, apresentam resultados intermediários, com recuperação de aproximadamente 80%.

O tempo requerido de *clean-up* foi distinto. Os cartuchos Sep-Pak e Supelco requerem aproximadamente 80 minutos, enquanto que os cartuchos Bond Elut e Nexus requerem apenas 30 minutos.

O consumo de solvente (condicionamento e eluição) foi mais alto para os cartuchos Supelco (~30 mL) e mais baixo para os cartuchos Nexus (~10 mL). Valores intermediários foram obtidos para os cartuchos Sep-Pak e Bond Elut (~16 mL).

Em relação à recuperação do 1-OHP, nos três níveis de concentração, os cartuchos Bond Elut apresentaram melhores resultados com tempos de extração e consumo de solventes aceitáveis.

Os cartuchos Supelco mostraram recuperação irregular, alto tempo de extração e maiores volumes de solvente. Apesar do baixo volume de metanol consumido e baixo tempo de extração, os cartuchos Nexus também apresentaram recuperação de 1-OHP irregular.

Diante do que foi apresentado, considerando-se os parâmetros avaliados, conclui-se que o uso de

cartuchos Bond Elut é a melhor alternativa para análise de 1-OHP em urina, pois apresentou satisfatória capacidade de recuperação associada com baixo consumo de metanol e baixo tempo de extração.

Dessa forma, o método foi aplicado na determinação de 1-OHP de urina de pessoas envolvidas com a colheita da cana-de-açúcar (cortadores de cana). Os picos foram comprovados pela adição de padrão e pela técnica CG/EM. As concentrações de 1-OHP em urina variaram $0,026\text{--}2,3 \text{ } \mu\text{mol mol}^{-1}$

Table 3. Alguns trabalhos mostrando a relação de excreção de 1-OHP em função da ocupação do trabalhador.

Ocupação	Concentração de 1-hidroxipireno ($\mu\text{mol mol}^{-1}$ de creatinina)	Referência
Indústria de borracha (vulcanização)	0,071 (controle) 0,14 (expostos)	16
Coletores de lixo	0,01–0,51 (controle) 0,03–0,62 (expostos)	17
Motorista de ônibus	0,05–1,60	18
Policiais de trânsito	0,021–0,974	19
Cozinheiros	0,30–0,83	20

creatinina ($n = 39$) no período da safra e de $0,0023-0,38 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de creatinina ($n = 34$) no período da entressafra. Os resultados foram expressos em função do teor de creatinina, para corrigir a diluição da urina que pode variar significativamente. A excreção de creatinina num indivíduo normal é praticamente constante num período de 24 horas [13,14].

Em seu artigo de revisão, Hansen e colaboradores [15] apontam que estudos envolvendo determinação de 1-OHP em urina de trabalhadores vem sendo realizados nos mais diversos segmentos, como trabalhadores rurais envolvidos com queima de madeira, carvoarias, fundição, produção de alumínio, vulcanização da borracha, pavimentação (asfalto), coletores de lixo, motoristas de ônibus, policiais e muitas outras atividades. A Tabela III apresenta o resultado de alguns desses estudos [16-20].

Comparando-se os resultados deste trabalho com os resultados apresentados nos trabalhos da Tabela III, pode-se concluir que a eliminação de 1-OHP na urina dos cortadores de cana-de-açúcar é muito superior que a dos trabalhadores envolvidos em atividades como vulcanização da borracha, coleta de lixo, motoristas de ônibus, policiais de trânsito e cozinheiros.

A grande diferença de concentração de 1-OHP na urina dos trabalhadores quando comparado os períodos de safra e entressafra da cana-de-açúcar pode ser explicada pela maior exposição dos trabalhadores aos HPAs no período da safra da cana-de-açúcar. Em seu trabalho com material particulado atmosférico (MP_{10}), Andrade e colaboradores [21] encontraram na atmosfera de Araraquara/SP, concentrações de MP_{10} três vezes maiores no período da safra do que no período da entressafra. Em relação à concentração dos HPAs, os valores encontrados no período da safra foram aproximadamente quatro vezes superiores ao do período da entressafra. Neste trabalho, os valores de concentração de 1-OHP foram aproximadamente seis vezes maiores no período da safra em relação à entressafra. Portanto, superior às razões encontradas por Andrade e colaboradores para MP_{10} e HPAs. Isso pode ser explicado pelo fato de, na

fuligem, os HPAs ainda não terem sofrido reações significativas de transformação em seus derivados, o que ocorre no material particulado atmosférico [22].

Segundo Jongeneelen [23], pode-se classificar a concentração de 1-OHP eliminado pela urina em três categorias: Nível 1 - $0,24$ e $0,76 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de creatinina, para pessoas não-expostas ocupacionalmente, não-fumantes e fumantes, respectivamente; Nível 2 - $1,4 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de creatinina, para pessoas expostas ocupacionalmente. Esse é a menor concentração em que não há evidências de efeitos genotóxicos; Nível 3 - $2,3$ e $4,9 \mu\text{mol mol}^{-1}$ de creatinina, para trabalhadores de coqueria e de plantas de fabricação de alumínio, respectivamente. Este nível corresponde ao limite de exposição profissional.

Diante dessa classificação, pode-se concluir que a exposição dos cortadores de cana-de-açúcar pode atingir o terceiro nível de exposição, fato, no mínimo preocupante.

Conclusão

A metodologia otimizada e validada mostrou-se adequada para a quantificação do 1-OHP em urina humana. Os resultados encontrados apontam uma expressiva diferença entre os valores obtidos no período da safra e da entressafra da cana-de-açúcar sugerindo uma importante exposição dos trabalhadores aos HPAs na sua atividade ocupacional.

Agradecimentos

Os autores agradecem a FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo, Brasil) pelo suporte financeiro (Processo 98/01514-5) e a bolsa de mestrado à K.A.Sakiara (proc. 98/12097-7). Agradecem, também, a Prof. Dra. Regina Célia Vendramini (Faculdade de Ciências Farmacêuticas/UNESP, Araraquara) pela determinação da creatinina urinária.

K. A. Sakiara, S. J. De Andrade, M. R. R. Marchi, W. Vilegas, R. M. V. Bosso, N. D. T. Conforti-Frões. Optimization and validation of analytical methodology for determination of 1-hydroxypyrene in urine of sugar cane workers.

Abstract: This study aimed to optimize and validate an analytical methodology for determination of 1-hydroxypyrene in urine of workers involved in harvesting sugar cane. The method used for determining 1-hydroxypyrene in human urine is the enzymatic hydrolysis, extraction and *clean-up* by solid phase extraction (SPE) and quantified by high performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC / Flu). Four types of cartridges were tested to verify the percentage of recovery. Urine of sugar-cane workers (non-smokers and of both sexes) were collected during the harvest (n = 39) and non-harvest season (n = 34) of cane sugar. The best recovery results were attributed to the C18 cartridges. They presented recovery between 79% and 108%, with a coefficient of variation between 5% and 10%. The limit of quantification was 74 ng of 1-hydroxypyrene per liter of urine. The optimized and validated methodology was used for determination of real samples. The results found in the urine of workers at harvest period ranged from 0.026 to 2.3 mol of 1-hydroxypyrene per mol creatinine. During the non-harvesting season the results ranged from 0.0023 to 0.38 mol of 1-hydroxypyrene per mol creatinine. The validated methodology proved suitable for determination of 1-hydroxypyrene in human urine. The data indicate that there is strong correlation between excretion of 1-hydroxypyrene and the periods during and between harvests of sugar cane.

Keywords: Occupational health, Urine, 1-hydroxypyrene, Sugar-cane workers, Validation of analytical methodology.

Referências Bibliográficas

- [1] <http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>. Acesso em julho/2009.
- [2] D. Magalhães, R.E. Bruns, P.C. Vasconcellos, *Quim. Nova*. 30 (3) (2007) 577.
- [3] LEI N. 11.241, DE 19 DE SETEMBRO DE 2002 (Dispõe sobre a eliminação gradativa da queima da palha da cana-de-açúcar e dá providências correlatas).
- [4] A.F.L. Godoi, K. Ravindra, R.H.M. Godoi, S.J. Andrade, M. Santiago-Silva, L. Van Vaeck, R. Van Grieken, *J. Chromatogr. A*, 1027 (2004) 49.
- [5] R.H.M. Godoi, A.F.L. Godoi, A. Worobiec, S.J. Andrade, J. Hoog, M.R. Santiago-Silva, R. Van Grieken, *Microchim. Acta* 145 (2004) 53.
- [6] C.Y.M. Santos, D.A. Azevedo, F.R. Aquino Neto, *Atmos. Environ.* 36 (18) (2002) 3009.
- [7] G.C.M. Zamperlini, M.R.R. Marchi, W. Vilegas, *Chromatographia* 46 (11) (1997) 655.
- [8] C. Bosetti, P. Boffetta, C. La Vecchia, *Annals of Oncology* 18 (2007) 431.
- [9] H.C.A. Brandt, W.P. Watson, *Ann. occup. Hyg.* 47 (5) (2003) 349.
- [10] L. Qiu, S. Leng, Z. Wang, Y. Dai, Y. Zheng, Z. Wang, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 16 (6) (2007) 1193.
- [11] M. dell'Omo, G. Muzi, G. Marchionna, L. Latini, P. Carrieri, P. Paolemi, G. Abbritti, *Occup. Environ. Med.* 55 (1998) 401.
- [12] F.J. Jongeneelen, R. Anzion, P.T. Henderson, *J. Chromatogr.* 413 (1987) 227.
- [13] C. Viau, M. Lafontaine, J.P. Payan, *Int. Occup. Environ. Health* 77 (2004) 177.
- [14] E. Liotta, R. Gottardo, L. Bonizzato, J.P. Pascali, A. Bertaso, F. Tagliaro, *Clin. Chim. Acta* 409 (2009) 52.
- [15] Å.M. Hansen, L. Mathiesen, M. Pedersen, L.E. Knudsen, *Int. J. Hyg. Environ. Health* 211 (2008) 471.
- [16] L.S. Jönsson, K. Broderg, A. Axmon, U. Bergendorf, M. Littorin, B.A.G. Jönsson, *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 82 (2008) 131.
- [17] K. Hara, T. Hanaoka, Y. Yamano, T. Itani, *Sci. Total Environ.* 199 (1997) 159.
- [18] Å.M. Hansen, H. Vallin, M.L. Binderup, M. Dybdahl, H. Autrup, S. Loft, L.E. Knudsen, *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* 557 (2004) 7.
- [19] M. Ruchirawat, C. Mahidol, C. Tangjarukij, S. Pui-Ock, O. Jensen, O. Kampeerawipakorn, J. Tuntaviroon, A. Aramphongphan, H. Autrup, *Sci. Total Environ.* 287 (2002) 121.
- [20] B. Chem, Y. Hu, T. Jin, L. Zheng, Q. Wang, Y. Shen, Y. Zhou, *Toxicol. Letters* 171 (2007) 119.
- [21] S.J. Andrade, J. Cristale, F.S. Silva, G.J. Zocolo, M.R.R. Marchi, *Atmos. Environ.* 44 (2010) 2913.
- [22] W.L. Lopes, J.B. Andrade, *Quim. Nova* 19 (1996) 497.
- [23] F.J. Jongeneelen, *Ann. occup. Hyg.* 45 (1) (2001) 3.

