

Influência do hábito de fumar na excreção urinária do ácido *trans, trans*-mucônico

Maico de Menezes, Marina Salviato Balbão, Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira, Isarita Martins*

Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Laboratório de Análises Toxicológicas,
Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Alfenas

*O hábito de fumar é considerado a maior fonte individual de benzeno para indivíduos não expostos ocupacionalmente e, em vista de sua comprovada carcinogenicidade, este solvente representa sério risco, tanto para a população em geral quanto para os trabalhadores. Um dos bioindicadores mais utilizados para avaliar a exposição benzênica é o ácido *trans,trans*-mucônico (AttM) em urina, o qual apresenta sensibilidade suficiente para a monitorização biológica da exposição a baixos níveis de benzeno. O objetivo deste trabalho foi verificar a influência do hábito de fumar na excreção urinária do AttM. A identificação e quantificação do analito foram realizadas por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando-se coluna de fase reversa e detecção a 264 nm, após prévia extração em fase sólida. O método foi previamente validado demonstrando linearidade, no intervalo de 0,006 a 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ($r= 0,996$), limites de detecção e de quantificação de, respectivamente, $1,41 \times 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$ e $6,0 \times 10^{-3} \mu\text{g mL}^{-1}$ e coeficientes de variação de 1,79 a 2,91% (precisão intracorridas) e, de 3,53 a 18,37% (precisão intercorridas). Foi observada correlação positiva entre a excreção do AttM e o hábito de fumar, comparando o grupo de fumantes e o de não-fumantes ($p= 0,005388$). Contudo, o número de cigarros fumados por dia não influenciou significativamente a excreção deste produto de biotransformação do benzeno.*

Unitermos

- Ácido *trans,trans*-mucônico
- Benzeno/identificação em urina
- Hábito de fumar/toxicidade
- Cromatografia líquida de alta eficiência/análise quantitativa

*Correspondência:

I. Martins
Laboratório de Análises Toxicológicas
Departamento de Análises Clínicas e
Toxicológicas
Universidade Federal de Alfenas
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 714
37130-000 – Alfenas - MG, Brasil
E-mail: isarita@unifal-mg.edu.br

INTRODUÇÃO

O risco relacionado à exposição ao benzeno, por muitos anos, foi avaliado sob o ponto de vista quase sempre ocupacional. Contudo, é demonstrado que, também em populações não ocupacionalmente expostas, há probabilidade de que este solvente seja introduzido no organismo,

oriundo de diferentes fontes (Salgado, Pezzagno, 1991).

Segundo Costa e Costa (2002), cerca de 95% da produção nacional de benzeno provém dos parques de produção petroquímica e refino de petróleo. Os 5% restantes são produzidos através da destilação fracionada de óleos leves de alcatrão, BTX (benzeno, tolueno e xilenos), obtidos nas companhias siderúrgicas. Embora venha ocorrendo pro-

gressivamente uma diminuição do uso, este solvente é considerado um importante contaminante universal.

O benzeno pode ser encontrado na gasolina automotiva, como impureza ou como um componente de misturas carburantes, que podem ser utilizadas sem controle, como solvente de limpeza, em ambientes caseiros, indústrias gráficas e oficinas mecânicas, aumentando assim a probabilidade do aparecimento de intoxicações decorrentes da exposição. Em 1996, estudos demonstraram os efeitos relacionados ao benzeno na gasolina, mesmo em concentrações abaixo de 1 ppm, o que levou os Estados Unidos, em 2001, a assumir a existência de risco de exposição da população em geral ao benzeno presente no petróleo (Machado *et al.*, 2003).

A fumaça do cigarro é uma das principais fontes de exposição não-ocupacional ao benzeno (Fustinoni *et al.*, 2005), expondo os fumantes a concentrações médias de 55 µg de benzeno por cigarro (Costa, Costa, 2002).

A corrente primária de fumaça de cigarro de tabaco é composta por duas fases: a chamada fase particulada e fase gasosa. Todos os compostos orgânicos e inorgânicos, presentes no cigarro de tabaco, tendem a se fracionar entre essas duas fases, com mecanismos, velocidades e localização no trato respiratório dependente de cada substância (Pankow *et al.*, 2004).

Inúmeros compostos são formados durante a combustão do tabaco por diversos processos, tais como destilação, pirólise, pirossíntese, oxidação, entre outros. O benzeno pode ser oriundo da pirólise do ácido málico, um dos ingredientes do tabaco, adicionado como flavorizante (Baker *et al.*, 2004).

Em ambientes fechados como as residências, o benzeno pode atingir níveis de 500 µg m⁻³. Os fumantes inalam, em média, aproximadamente 1800 µg de benzeno dia⁻¹, comparados aos 50 µg dia⁻¹ dos não-fumantes. Os níveis sanguíneos de benzeno entre os fumantes são 90% superiores aos dos não-fumantes e o hábito de fumar aumenta em 5-20 vezes a concentração urinária de benzeno (Pezzagno, 1995).

O benzeno induz ao aparecimento de leucemia tanto em humanos quanto em animais, com forte associação entre a exposição a esse agente e a manifestação de leucemia mielóide aguda. Korte *et al.* (2000) concluíram que o benzeno é responsável por 12 a 58% da leucemia mielóide aguda induzida pelo cigarro de tabaco.

Geralmente, a avaliação da exposição ao cigarro de tabaco é feita pela aplicação de questionário. Todavia, importantes variáveis intra-individuais devem ser consideradas, tais como o número, a frequência e intensidade das tragadas, profundidade de inalação, a retenção da fumaça e variações metabólicas. Assim, a exposição ao tabaco

pode ser avaliada pelos indicadores de dose interna, tais como o 1-pirenoil urinário, nicotina e seus produtos de biotransformação e o ácido *trans,trans*-mucônico (*AttM*) (Pavanello *et al.*, 2002).

O *AttM* é produto secundário de biotransformação, originado de um intermediário altamente reativo, o aldeído *trans,trans*-mucônico, ao qual tem sido atribuída, dentre outros produtos da biotransformação benzênica, a ação mielotóxica e leucemogênica do benzeno (Cooper, Snider, 1988; Scherer *et al.*, 1998).

Um aumento dos produtos de biotransformação do benzeno, todavia não na mesma proporção do inalterado, tem sido relatado em fumantes. Melikian *et al.* (1999) encontraram teores de ácido fenilmercaptúrico (AFM), também produto de biotransformação do benzeno, em torno de 9,1 µg g⁻¹ de creatinina em fumantes e de 4,8 µg g⁻¹ de creatinina em não-fumantes.

Os produtos *AttM* e AFM são os indicadores biológicos preconizados para o controle e a prevenção de intoxicações decorrentes da exposição ao benzeno, no ambiente de trabalho, todavia, o aspecto analítico se torna crítico uma vez que são propostos limites cada vez mais baixos para o benzeno no ambiente de trabalho, 0,5 ppm, nos EUA (ACGIH, 2007) e 1,0 e 2,5 ppm, no Brasil (1993).

Estudos demonstram correlação linear entre o *AttM* urinário e a concentração ambiental do benzeno, característica esta essencial para a validade de um bioindicador. Valores de *AttM* urinário em torno de 0,9 a 1,9 mg g⁻¹ de creatinina correlacionam-se com a exposição a 1,0 ppm de benzeno (Scherer *et al.*, 1998). Dentre as vantagens do uso desse biomarcador, destacam-se a sensibilidade e a simplicidade analítica para a sua determinação (Ducos *et al.*, 1990) sendo a principal desvantagem o fato de sua concentração basal ser influenciada por fatores e características individuais (Pezzagno, 1999).

A medida do *AttM* permitiria avaliar o risco decorrente da exposição ao benzeno, seja ambiental ou ocupacionalmente, apesar de sua inespecificidade, uma vez que esse metabólito é formado também durante a biotransformação do ácido sórbico e seus sais, utilizados como conservantes de alimentos e de preparações farmacêuticas e cosméticas (Negri *et al.*, 2005). Todavia, há ainda a necessidade de demonstrar se há influência do hábito de fumar nos níveis de *AttM* na urina, visto que a literatura é contraditória e escassa com relação a esses dados (Paula *et al.*, 2003).

O final da jornada de trabalho é considerado o melhor período para a coleta das amostras de urina para a determinação do *AttM* urinário, visando à biomonitorização da exposição ocupacional ao benzeno, e é, portanto, o recomendado pela ACGIH (2007). Em estudo conduzido em

1999, Martins e Siqueira obtiveram valores de *AttM* urinário, em trabalhadores fumantes e não-fumantes de uma refinaria, significativamente maiores nas amostras coletadas no final da jornada de trabalho, em relação às amostras coletadas no início da jornada e no dia seguinte.

Wiwanitkit, Suwansaksri e Soogarun (2005) sugerem ainda que o *AttM*, utilizado como biomarcador da exposição de fumantes ao benzeno, permite o acompanhamento de indivíduos em tratamento da dependência ao tabaco.

Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar a concentração de *AttM* urinário em amostras de fumantes e não-fumantes, visando verificar a influência do hábito de fumar e do número de cigarros fumados na excreção urinária deste bioindicador.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras

Foram analisadas 40 amostras de urina de indivíduos não expostos ocupacionalmente ao benzeno, divididos em 4 grupos, de 10 indivíduos cada, de acordo com o hábito de fumar e o número de cigarros fumados/dia: grupo A: não fumantes; grupo B: fumantes de até 10 cigarros/dia; grupo C: fumantes de 11-20 cigarros/dia e grupo D: fumantes de mais de 20 cigarros/dia. Os voluntários encontravam-se na faixa etária de 18-30 anos, sendo 29 homens e 10 mulheres, fumantes de diferentes marcas de cigarro, todos com filtro, e responderam a um questionário no momento da coleta, fornecendo informações sobre hábitos e características individuais, tais como gênero, idade, uso de cigarro, ingestão de bebidas alcoólicas, uso de medicamentos etc. O protocolo desta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alfenas/ UNIFAL-MG.

Para conservação das amostras, foi adicionado 1 mL de HCl 6 mol L⁻¹ para cada 100 mL de urina e realizada a determinação da creatinina. As amostras foram então conservadas a -20 °C até o momento da determinação do *AttM*.

As amostras destinadas à validação do método analítico foram preparadas a partir de *pool* de urina, obtidas de funcionários e alunos da Universidade. As amostras foram colhidas, homogeneizadas e enriquecidas com solução padrão de ácido *trans,trans*-mucônico em diferentes concentrações, para o preparo da curva analítica, estudo da linearidade, precisão, limite de detecção e de quantificação.

Padrões

- padrão analítico Sigma-Aldrich® de ácido *trans,trans*-mucônico 98%;

- padrão de ácido vanílico Sigma-Aldrich® 97% (padrão externo).

Foram preparadas soluções-padrão estoque de ácido *trans,trans*-mucônico e de ácido vanílico a 1000 mg L⁻¹ e 20 mg L⁻¹ respectivamente, em solução de metanol a 80%. Esta solução era conservada a -20 °C, por um período máximo de 1 mês.

Equipamentos e Acessórios

- cromatógrafo líquido Shimadzu® com detector UV e coluna cromatográfica Supelcosil TM (15 cm x 4,6 mm, 5 µm);
- fase móvel constituída de ácido acético: metanol (90:10), filtrada através de filtro Millipore 0,45 µm e desgaseificada, sob pressão;
- cartuchos SAX, 500 mg – Supelco®;
- sistema de suporte e extração *manifold* Supelco®.

Método

A determinação do *AttM* foi realizada com base no método de Ducos *et al.* (1990), que preconizam a detecção e a quantificação pela técnica de cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando-se coluna de fase reversa e detector ultravioleta.

O método, já utilizado anteriormente no laboratório, foi revalidado parcialmente quanto aos parâmetros: linearidade, precisão, limites de detecção e de quantificação.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método constituído por extração em fase sólida e detecção/quantificação do analito por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção em UV, utilizando-se coluna de fase reversa, para a determinação de *AttM* urinário, tem sido recomendado por diversos autores (Ducos *et al.*, 1990; Buratti, Fustinoni, Colombi, 1995; Melikian *et al.*, 1999; Marrubini *et al.*, 2001; Paula *et al.*, 2003).

Assim, esse método foi escolhido para a determinação do analito no presente estudo e foi validado parcialmente, conforme recomendado no item 2.6 da Resolução-RE nº 899, de 29 de maio de 2003, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA (ANVISA, 2003), uma vez que houve mudança de analista e mais de 18 meses decorridos de seu último emprego no laboratório.

A linearidade mostrou-se satisfatória, com coeficiente de correlação de 0,996, no intervalo de 0,006 a 10,0 µg mL⁻¹ de *AttM* na urina. Os limites de detecção de 1,41 x 10⁻³ µg mL⁻¹ e de quantificação de 6,0 x 10⁻³ µg mL⁻¹,

permitem a aplicação do método na biomonitorização de indivíduos expostos a concentrações de benzeno recomendadas, 0,5 ppm, nos EUA (ACGIH, 2007), e 1,0 e 2,5 ppm no Brasil (Brasil, 1993).

Os coeficientes de variação médios obtidos foram de 1,79 a 2,91% e de 3,53 a 18,37%, após a análise das replicatas das concentrações 0,006, 1 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, no mesmo dia, para o teste de repetibilidade, e em sete dias consecutivos, para a precisão intermediária, respectivamente.

Assim, o método demonstrou ser adequado para a determinação do *AttM* em urina, dentro dos parâmetros preconizados pela RE nº 899/03 da ANVISA (ANVISA, 2003).

A Figura 1 ilustra a diferença estatisticamente significativa na concentração de *AttM* urinário somente no grupo A, em relação aos demais grupos. Isso foi verificado através da aplicação do teste de Kruskal-Wallis, com valor de $p=0,005388$, comparando-se o grupo de fumantes, como um único grupo, com o de não-fumantes, sendo estes grupos constituídos por indivíduos não expostos ocupacionalmente ao benzeno.

Todavia, entre os grupos B, C e D, de fumantes, não houve diferença significativa na concentração do bioindicador, quando as medianas (Tabela I) foram comparadas, aplicando-se o teste de Mann-Whitney, o qual apresentou valor de $p>0,05$.

Os resultados deste estudo estão de acordo com os de Melikian *et al.*, que, em 1999, obtiveram, para o *AttM* urinário, valores 0,14 a 0,61 mg g^{-1} creatinina para fumantes e 0,05 a 0,21 mg g^{-1} de creatinina para não-fumantes. Já, Pavanello *et al.*, 2002 avaliaram 118 fumantes,

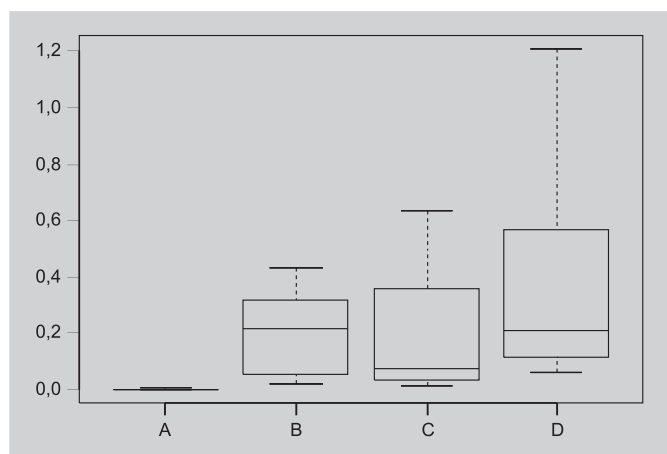


FIGURA 1 - Comparação múltipla da concentração do ácido *trans,trans*-mucônico urinário em grupos de não fumantes e fumantes (Grupo A = não-fumantes, Grupo B = 01-10 cigarros/dia, Grupo C = 11-20 cigarros/dia e Grupo D = >20 cigarros/dia). (Diferença significativa entre A e demais grupos, $p=0,005388$, teste Kruskal-Wallis).

TABELA I - Concentração de ácido *trans,trans*-mucônico (mg g^{-1} de creatinina) em amostras de urina de indivíduos não-fumantes e fumantes, divididos de acordo com quantidade de cigarros fumados

grupo	nº de cigarros fumados	mediana (mg g^{-1} de creatinina)
A (n=10)	0	0,01
B (n=10)	01 – 10	0,21
C (n=10)	11 – 20	0,17
D (n=10)	> 20	0,21

número médio de 18 cigarros por dia, e encontraram níveis de *AttM* urinário que variaram de 4,5 a 699 $\mu\text{g g}^{-1}$ de creatinina.

Paula *et al.* (2003) observaram correlação positiva pequena entre *AttM* urinário e o hábito de fumar ($p=0,048$), quando compararam indivíduos não expostos ocupacionalmente ao benzeno, fumantes e não-fumantes. Para os fumantes, o número de cigarros fumados por dia não demonstrou influenciar significativamente a concentração do solvente. Já, quando analisaram uma população de indivíduos expostos ocupacionalmente ao benzeno, esses autores, encontraram correlação positiva entre o hábito de fumar e os valores de *AttM* na urina ($p=0,0058$).

Em estudo conduzido em 2005, Wiwanitkit, Suwansakri e Soogarun determinaram níveis nove vezes maiores de ácido *trans,trans*-mucônico em indivíduos fumantes, em relação aos não-fumantes, com valores de 2,19 e 0,24 mg g^{-1} de creatinina, respectivamente.

Os achados do presente estudo sugerem que além do número de cigarros fumados, o modo com que o cigarro é fumado deve ser avaliado, visto que alguns voluntários relataram no questionário não ter o hábito de tragar, apesar de fumar mais que 20 cigarros/dia. De acordo com Scherer (2005), a dose interna de benzeno pode variar amplamente entre os fumantes, em função do volume tragado, número de tragadas por cigarro, duração da tragada e o intervalo entre as tragadas entre outros fatores, afetando assim, significativamente a excreção urinária dos seus produtos de biotransformação.

CONCLUSÕES

O *AttM* urinário mostrou ser indicador adequado para a avaliação da exposição a baixas concentrações de benzeno, como aquelas observadas quando do uso de cigarro. O hábito de fumar afetou significativamente os teores de *AttM* urinário, porém não foi observada correlação entre este bioindicador e o número de cigarros fumados por dia.

ABSTRACT**Influence of tobacco smoking on urinary excretion of *trans,trans*-muconic acid**

Tobacco smoking is the major individual benzene source for no occupationally exposed subjects. This solvent is a volatile carcinogen and can induce serious health problems. Several biomarkers for benzene have been proposed, the most used is its metabolite trans,trans-muconic acid (ttMA) in urine, a suitable indicator since it reflects the internal dose of low benzene exposure. The present study aimed to evaluate the influence of smoking on urinary ttMA excretion. The analysis was performed by High Pressure Liquid Chromatography in a reversed-phase column and UV detection, after extraction of ttMA from urine using SAX cartridges. The method was validated, showing linearity between 0.006 to 10 µg mL⁻¹ (r= 0.996), detection and quantification limits of 1.41 x 10⁻³ µg mL⁻¹ and 6.0 x 10⁻³ µg mL⁻¹ respectively, CVs from 1.79 to 2.91% (intra assay precision) and 3.53 to 18.37% (interassay precision). A significant positive correlation was observed between ttMA excretion and smoking (p= 0.005388). However, the cigarette number smoked by day seems have no influence on the urinary ttMA excretion.

UNITERMS: Trans, trans-muconic acid. Benzene/urinary identification. Smoking/toxicity. High Performance Liquid Chromatography/quantitative analysis.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Programa de Bolsas de Iniciação Científica – PROBIC - concedido pela UNIFAL-MG.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº899 de 23 de maio de 2003. *Guia para validação de métodos analíticos*. [on line]. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public>. Acesso em: 03 set. 2007.
- AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENISTS. *Threshold limit values for chemical substances and physical agents. Biological exposures indices*. Cincinnati: ACGIH, 2007. p.256.
- BAKER, R.R.; MASSEY E.D.; SMITH, G. An overview of the effects of tobacco ingredients on smoke chemistry and toxicity. *Food Chem. Toxicol.*, v.42S, p. S53-S83, 2004.
- BRASIL. Ministério da Previdência Social. *Benzenismo: norma técnica sobre a intoxicação ao benzeno*. Brasília, 1993. 28p.
- BURATTI, M.; FUSTINONI, S.; COLOMBI, A. Fast liquid chromatographic determination of urinary trans, trans-muconic acid. *J. Chromatogr.*, v.677, p.257-263, 1996.
- COOPER, K.R.; SNYDER, R. Benzene metabolism. In: AKSOY, M. *Benzene carcinogenicity*. Miami: CRC Press, 1988. p. 33-58.
- COSTA, M.A.F.; COSTA, M.F.B. Benzeno: uma questão de saúde pública. *Interciência*, v.27, p.201-204, 2002.
- DUCOS, P.; GAUDIN, R.; ROBERT, A.; FRANCIN, J.M.; MAIRE, C. Improvement in HPLC analysis of urinary trans, trans-muconic acid, a promising substitute for phenol in the assessment of benzene exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, v.62, p.529-534, 1990.
- FUSTINONI, S.; BURATTI, M.; CAMPO, L.; COLOMBI, A.; CONSONNI, D.; PESATORI, A.C.; BONZINI, M.; FARMER, P.; GARTE, S.; VALERIO, F.; MERLO, D.F.; BERTAZZI, P.A. Urinary t,t-muconic acid, S-phenylmercapturic acid and benzene as biomarkers of low benzene exposure. *Chem. Biol. Interact.*, v.153-154, p.253-256, 2005.
- KORTE, J.E.; HERTZ-PICCIOTTO, I.; SCHULZ, M.R.; BALL, L.M.; DUELL, E.J. The contribution of benzene to smoking-induced leukemia. *Environ. Health Perspect.*, v.108, p.333-339, 2000.
- MACHADO, J.M.H.; COSTA, D.F.; CARDOSO, L.M.; ARCURI, A. Alternativas e processos de vigilância em saúde do trabalhador relacionados à exposição ao benzeno no Brasil. *Ciênc. Saúde Colet.*, v.8, p.913-921, 2003.
- MARRUBINI, G.; HOGENDOORN, E.A.; COCCINI, T.; MANZO, L. Improved coupled column liquid chromatographic method for high-speed direct analysis of urinary trans, trans-muconic acid, as a biomarker of exposure to benzene. *J. Chromatogr.*, v.751, p.331-339, 2001.
- MARTINS, I.; SIQUEIRA, M.E.P.B. Trans, trans-muconic acid in urine samples collected in three periods from benzene handling workers in a Brazilian refinery. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, v.40, p.197-202, 2004.

- MELIKIAN, A.A.; O'CONNOR, R.; PRAHALAD, A.K.; HU, P.; LI, H.; KAGAN, M.; THOMPSON, S. Determination of the urinary benzene metabolites S-phenylmercapturic acid and *trans, trans*-muconic acid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Carcinogenesis*, v.20, p.719-726, 1999.
- NEGRI, S.; BONO, R.; MAESTRI, L.; GHITTORI, S.; IMBRIANI, M. High pressure chromatographic-mass spectrometric determination of sorbic acid in urine: verification of formation of *trans, trans*-muconic acid. *Chem.-Biol. Interact.*, v.153-4, p.243-6, 2005.
- PAULA, F.C.S.; SILVEIRA, J.N.; JUNQUEIRA, J.G.; LEITE, E.M.A. Avaliação do ácido *trans, trans*-mucônico urinário como bioindicador de exposição ao benzeno. *Rev. Saúde Pub.*, v.37, p.780-785, 2003.
- PANKOW, J.F.; LUO, W.; TAVAKOLI, A.D.; CHEN, C.; ISABELLE, L.M. Delivery levels and behaviour of 1,3-butadiene, acrylonitrile, benzene, and other toxic volatile organic compounds in mainstream tobacco smoke from two brands of commercial cigarettes. *Chem. Res. Toxicol.*, v.17, p.805-813, 2004.
- PAVANELLO, S.; SIMIOLI, P.; CARRIERI, M.; GREGORIO, P.; CLONFERO, E. Tobacco-smoke exposure indicators and urinary mutagenicity. *Mutat. Res.*, v.521, p.1-9, 2002.
- PEZZAGNO, G. Monitoraggio biologico delle popolazioni esposte a benzene. In: MINOIA, C.; APOSTOLI, B.; BARTOLUCCI, G.B. (Ed.). *Il benzene: tossicologia, ambienti di vita e di lavoro*. Milano: Morgan, 1995. p.125-145.
- PEZZAGNO, G.; MAESTRI, L.; FIORENTINO, M.L. *Trans, trans*-muconic acid, a biological indicator to low levels of environmental benzene: some aspects of its specificity. *Am. J. Ind. Med.*, v.35, p.511-518, 1999.
- SALGADO, P.E.T.; PEZZANO, G. Indicadores biológicos da exposição ao benzeno. *Rev. Bras. Saúde Ocup.*, v.19, p. 25-31, 1991.
- SCHERER, G.; RENNER, T.; MEGER, N. Analysis and evaluation of *trans-trans*-muconic acid as a biomarker for benzene exposure. *J. Chromatogr. B*, v.717, p.179-199, 1998.
- SCHERER, G. Biomonitoring of inhaled complex mixtures- Ambient air, diesel exhaust and cigarette smoke. *Exp. Toxicol. Pathol.*, v.57, p.75-110, 2005.
- WIWANITKIT, V.; SUWANSAKSRI, J.; SOOGARUN, S. Monitoring of urine *trans,trans*-muconic level among smokers and non-smokers. *Respir. Med.*, v.99, p. 788-791, 2005.

Recebido para publicação em 27 de fevereiro de 2007

Aceito para publicação em 25 de março de 2008