

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação da genotoxicidade causada por diferentes xenobióticos

GABRIELA GÖETHEL

Porto Alegre, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Avaliação da genotoxicidade causada por diferentes xenobióticos

Dissertação apresentada por **Gabriela
Göethel** para obtenção do GRAU DE
MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Solange Cristina Garcia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado – da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 20.03.2014 pela Banca Examinadora constituída por:

Prof^a. Dr^a. Cláudia da Silva Funchal
Centro Universitário Metodista IPA

Prof. Dr^a Andreia Buffon
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Mirna Bainy Leal
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Göethel, Gabriela
Avaliação da genotoxicidade causada por diferentes xenobióticos / Gabriela Göethel. -- 2014.
107 f.

Orientadora: Solange Cristina Garcia.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Genotoxicidade. 2. Toxicologia Ocupacional. 3. Frentistas. 4. Taxistas. I. Garcia, Solange Cristina, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Este trabalho foi desenvolvido sob a orientação da Prof^a. Dr. Solange Cristina Garcia no laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia do Rio Grande do Sul. A pesquisa foi financiada pelos projetos CNPq/Universal (n° 479613/2009-5 e n° 484096/2011-7), Fapergs (n° 1017503 PqG 06/2010) Fapergs auxílio PPSUS (2013). Gabriela Göethel recebeu bolsa de mestrado CAPES Reuni.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pelo dom da vida, pelas bênçãos que sempre me concedeu, por me dar um caminho de felicidade e muita força e proteção, sempre realizando sonhos, como este que agora se torna realidade.

A Prof.^a Solange agradeço pela confiança, pela paciência que teve comigo, pela compreensão e pela oportunidade de compor o seu grupo de pesquisa e pela orientação deste trabalho. Muito obrigado por tudo!

Aos meus pais Verena e Rogério por todos os esforços e apoio incondicional. Mãe e pai: este trabalho só foi possível pelo amparo, amor e pela base que sempre recebi, por acreditarem em mim e me manterem durante a vida acadêmica. Amo muito vocês!

Ao meu namorado Diego pelo companheirismo e carinho de todas as horas. Agradeço a você que me fez sorrir em muitos momentos difíceis e me fez acreditar que sou capaz. Obrigada, Te Amo!

Aos meus avós paternos Ervino e Nadir que começaram esta caminhada comigo, mas não conseguiram ver a finalização deste sonho. Fica a certeza de que o amor por vocês é eterno!

A toda a família: (primos): Rose, João, Carol, João Pedro, Mari, Valmir, Guto, Dudu, Pri, Grazi, Alexandre, Pati, Caio, Pedro, Dani, Clara, Luciano, Diego, Marcelo, Marione, Bruna, Júlia, (tios): Victória e Eugênio, Vera e Juca, Rejane e Arno, Renato e Márcia, Terezinha. Muito obrigado pelo apoio, carinho e torcida em todos os momentos.

A pessoas especiais: Arcélio, Dica, Dado e Vó Tita. O carinho e o amor de vocês é uma benção divina!

Aos colegas do LATOX: Ane, Ângela, Bruna, Carol, Elisa, Mariele, Marília, Natália, Rachel, Juliano, Rafael, Sabrina, Yuri, Johana, Louise, Bruna D, Gustavo. Agradeço pela ajuda de cada um de vocês neste trabalho, pelo companheirismo, conversas, risadas, momentos de descontração e pelas grandes amizades e parcerias formadas nesse grupo, tenho certeza que somos uma grande família.

Aos amigos de Venâncio: Boneca, Dóris, Fabi, Carol, Pri, Guto. Agradeço pela amizade, parceria, paciência e simplesmente por dividir tantos bons momentos durante todos esses anos de amizade verdadeira.

Aos professores Cláudia Funchal, Andréia Buffon e Mirna Bainy Leal por aceitarem o convite para compor a banca examinadora desta dissertação.

A UFRGS e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela estrutura para realizar este curso.

A todos os amigos e demais pessoas que não foram citados, mas que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

A CAPES pelo fomento através da concessão da bolsa.

RESUMO

Alguns trabalhadores, como atendentes de postos de gasolina e taxistas estão ocupacionalmente expostos a diversos xenobióticos, que podem ser prejudiciais à sua saúde. Entre estes xenobióticos, destacam-se os poluentes ambientais e o benzeno, que podem levar a vários tipos de danos no DNA. Ensaio de genotoxicidade e mutagenicidade são importantes para detectar e avaliar os efeitos causados por esses poluentes. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar a genotoxicidade e mutagenicidade em trabalhadores ocupacionalmente expostos a diferentes xenobióticos. Para isso, foram determinados biomarcadores de exposição, tais como o ácido *t,t*-mucônico (*t,t*-MA) e a carboxihemoglobina (COHb). Além disso, também foram analisados os biomarcadores de efeito, 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG), ensaio cometa e micronúcleos (MN). Os grupos de estudo foram compostos por 43 frentistas, 34 taxistas e 22 indivíduos não expostos a xenobióticos. Os níveis de (*t,t*-MA) no grupo dos frentistas se mostraram significativamente elevados quando comparados com o grupo não exposto ($p < 0,001$). Para a (COHb) os níveis não se mostraram diferentes entre o grupo dos taxistas v.s. o grupo não exposto ($p > 0,05$). Foi possível observar um aumento significativo no índice de danos no DNA (ID) para ambos os grupos frentistas e taxistas em relação ao grupo não exposto ($p < 0,001$). Houve uma diferença significativa para os taxistas e o grupo não exposto ($p < 0,01$) em relação a frequência de micronúcleos. No grupo dos taxistas, a frequência de MN não apresentou diferença significativa quando comparado com o grupo não exposto ($p > 0,05$). A correlação de spearman mostrou que a frequência de MN/1000 células foi positivamente associada com a (8-OHdG). Também foi observada uma correlação positiva entre os índices de dano no DNA (ID) e a (8-OHdG). Neste estudo foi possível perceber que a exposição ocupacional ao benzeno e aos poluentes ambientais está ligada a genotoxicidade e a aos danos oxidativos.

Palavras-chave: genotoxicidade; ensaio cometa; xenobióticos; micronúcleos; 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG).

ABSTRACT

Some workers, such as gas station attendants and taxi drivers are occupationally exposed to several xenobiotics, which could be harmful to their health. Among these xenobiotics, we highlight the environmental pollutants, as well as benzene, which may lead to several kinds of DNA damage. Genotoxicity and mutagenicity assays are important to detect and to evaluate the effects caused by these pollutants. This study aimed to evaluate the genotoxicity and mutagenicity in workers occupationally exposed to different xenobiotics. For that, biomarkers of exposure such as *t,t*-muconic acid (*t,t*-MA) and carboxyhaemoglobin (COHb) were determined. In addition, biomarkers of effect, 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG), comet and micronucleus (MN) assay were also analyzed. The study groups were composed of 43 gas station attendants (GSA), 34 taxi drivers (TD) and 22 subjects not exposed to xenobiotics (NE). The (*t,t*-MA) levels in the GSA group were significantly elevated compared to the NE group ($p < 0.001$). (COHb) levels were not different in TD group vs. NE group ($p > 0.05$). It was possible to observe a significant increase in DNA damage index (DI) for both GSA and TD groups in relation to the NE group ($p < 0.001$). Micronuclei frequency showed a significant difference between GSA and NE groups ($p < 0.01$). In the TD group, MN frequency presented no significant difference when compared with the NE group ($p > 0.05$). Spearman correlation showed that frequency of MN/1000 cells was positively associated with (8-OHdG). A positive correlation between DNA DI levels and (8-OHdG) was also observed. In conclusion our results indicate that the occupational exposure to benzene and environmental pollutants is linked to genotoxicity and oxidative damage.

Keywords: genotoxicity; comet assay; xenobiotics; micronucleus; 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG).

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação está estruturada na seguinte maneira: Parte I: Introdução e Objetivos. Parte II: Artigo científico submetido, Discussão, Conclusões. Parte III: Referências Bibliográficas e Anexos.

LISTA DE ABREVIATURAS

BAP	Benzo[a]pireno
BER	Reparo por Excisão de Base
BTX	Benzeno, Tolueno e Xileno
CO	Monóxido de Carbono
COHb	Carboxihemoglobina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNTPs	Desoxiribonucleotídeos Trifosfatados
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
GC-MS	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas
Hb	Hemoglobina
HPAs	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IARC	Agência Nacional para Pesquisa do Câncer
IBE	Indicadores Biológicos de Exposição
ID	Índice de Dano
LC-MS	Cromatografia Líquida Acoplada à Espectrometria de Massas
MN	Micronúcleo
MP	Material Particulado
NO	Óxido Nítrico
NO _x	Óxidos de Nitrogênio
NO ₂	Dióxido de Nitrogênio
NR-15	Norma Regulamentadora n°15
OMS	Organização Mundial da Saúde
PPM	Partes por Milhão
RNA	Ácido Ribonucléico
SO ₂	Dióxido de Enxofre
<i>t,t</i> -MA	Ácido trans, trans-mucônico urinário
VRT	Valor de Referência Tecnológico
O ₃	Ozônio
1-OH- pireno	1-Hidroxipireno
8-OHdG	8-hidroxi-2-deoxiguanosina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	19
OBJETIVOS	23
Objetivos gerais.....	25
Objetivos específicos.....	25
REVISÃO DE LITERATURA	27
ARTIGO	43
Evaluation of genotoxicity in workers exposed to benzene and atmospheric pollutants	
DISCUSSÃO	69
CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
ANEXOS	95
ANEXO I: Carta de Aceite do Artigo	97
ANEXO II A: Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa.....	98
ANEXO II B: Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa.....	99
ANEXO III A: Termo de Consentimento.....	100
ANEXO III B: Termo de Consentimento.....	102
ANEXO IV – A: Questionário de Avaliação – Frentistas.....	103
ANEXO IV – B: Questionário de Avaliação – Taxistas	106

Os organismos vivos estão frequentemente expostos a substâncias mutagênicas que podem causar danos nas células, os quais podem ser induzidos por agentes químicos, físicos ou biológicos que afetam processos vitais como a duplicação, a transcrição gênica e as alterações cromossômicas, levando a processos cancerosos e a morte celular. Pelo motivo de causarem lesões no material genético, essas substâncias são conhecidas como genotóxicas (COSTA; MENK, 2000).

Sabe-se, que existem diversos agentes químicos que levam a danos no DNA (ácido desoxirribonucleico), presentes no ambiente ocupacional. Um destes agentes é o benzeno, um hidrocarboneto aromático, presente na gasolina (COSTA e COSTA, 2002). A gasolina é uma mistura complexa de compostos de baixa massa molecular, especialmente de parafinas, naftalenos, oleofinas e compostos aromáticos, que podem causar mutações e câncer (KERETETSE *et al.*, 2008). O benzeno, com fórmula molecular C_6H_6 , é um componente perigoso, sendo classificado como carcinógeno humano pela Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC). Em função dos riscos associados, ao longo das duas últimas décadas, tem ocorrido uma tendência mundial para substituir o benzeno por outras substâncias similares nos processos industriais (COUTRIM, CARVALHO, ARCURI, 2000).

Diversos estudos *in vivo* e *in vitro* tem demonstrado a genotoxicidade do benzeno. Dentre as alterações cromossômicas mais frequentemente observadas em humanos, destacam-se a hipo e hiperdiploidia, exclusões, trocas de cromátides irmãs, quebras e falhas nas duplas fitas (ATSDR, 2007; DOUGHERTY *et al.*, 2008).

Além do benzeno, a contaminação atmosférica por poluentes ambientais, também tem se tornado um agravante para a saúde humana. Trazendo problemas como infecções respiratórias, disfunções cardiovasculares, alergias e câncer de pulmão (BATALHA *et al.*, 1999; BRAUER *et al.*, 2002; BRUNEKREEF *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2002).

Dentre os poluentes ambientais destacam-se o material particulado (MP), o monóxido de carbono (CO), o ozônio (O_3), o óxido de nitrogênio (NO_x), o dióxido de enxofre (SO_2) e os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), especialmente, o benzo[a]pireno (BaP), (POPE *et al.*, 2002).

Sendo assim, sabe-se que compostos genotóxicos podem causar a quebra na molécula do DNA e formar a 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG), uma das lesões mais comuns do DNA resultante do ataque de espécies reativas de oxigênio (EROs), que pode resultar em um emparelhamento incompatível das bases nucleotídicas e introdução de mutações no genoma (MANINI *et al.*, 2010). O reparo por excisão de base (BER) é o processo celular mais importante na remoção da 8-OHdG, (KUNRATH *et al.*, 2008). A 8-hidroxi-2-deoxiguanosina é um biomarcador de estresse oxidativo, que avalia os danos oxidativos do DNA (MANINI *et al.*, 2010).

Uma das metodologias usadas para avaliar danos causados por xenobióticos nos organismos é o ensaio de micronúcleo (MN) (SCHIMID, 1976). Esse tipo de teste tem principalmente a capacidade de detectar agentes clastogênicos (quebra de cromossomos) e agentes aneugênicos (segregação cromossômica anormal) requerendo, no entanto, proliferação celular para a observação do biomarcador de efeito (FENECH, 2000).

Outra metodologia para avaliação da genotoxicidade é o ensaio cometa, este teste tem uma ampla utilização para testar agentes genotóxicos de dejetos industriais, domésticos e agrícolas, indução de danos e reparo no DNA, biomonitoramento de populações expostas, bem como em aplicações clínicas (WHITE E RASMUSSEN, 1998; HARTMANN *et al.*, 2003).

Diante destes fatos, o presente estudo teve como objetivo avaliar a genotoxicidade e a mutagenicidade em trabalhadores ocupacionalmente expostos a diferentes xenobióticos.

OBJETIVOS

1. Objetivo geral

- ✓ Avaliar a genotoxicidade em frentistas e taxistas expostos a diferentes xenobióticos, visando à detecção dos danos causados por diferentes agentes.

2. Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o efeito genotóxico e mutagênico de diferentes xenobióticos em dois grupos expostos: taxistas e frentistas;
- ✓ Avaliar o perfil social e a atividade profissional dos frentistas e taxistas incluídos no estudo;
- ✓ Quantificar o biomarcador de exposição urinário ao benzeno através da medida do metabólito *t,t*-MA urinário;
- ✓ Determinar os níveis de carboxihemoglobina em taxistas expostos aos poluentes atmosféricos;
- ✓ Avaliar as consequências da exposição ocupacional em frentistas e taxistas pela excreção do marcador biológico de efeito 8-OHdG;
- ✓ Estudar possíveis correlações entre os biomarcadores de danos causados pela exposição ao benzeno e poluentes atmosféricos e o biomarcador de dano oxidativo 8-OHdG;
- ✓ Verificar a influência do tempo de exposição nos biomarcadores de danos causados pelo benzeno e poluentes atmosféricos;

A presença de agentes tóxicos no ambiente de trabalho vem sendo cada vez mais preocupante, representando significativo risco à saúde do trabalhador. Inúmeros são os agentes químicos, potencialmente tóxicos, sob os quais os trabalhadores encontram-se diariamente expostos. Em decorrência disso, diversas doenças podem ser desencadeadas ou agravadas (ATSDR, 2007).

O benzeno, também conhecido como benzol, é um hidrocarboneto aromático que em temperatura ambiente encontra-se sob a forma líquida e incolor (FUNDACENTRO, 1995; ATSDR, 2007; INCA, 2010). É um composto orgânico volátil, altamente inflamável, com odor característico capaz de ser identificado no ar em concentrações da ordem de 1,5 - 4,7 ppm e na água a 2,0 ppm (ATSDR, 2007; INCA, 2010). Este solvente orgânico pode ser encontrado no ambiente em geral como contaminante atmosférico, e também em diferentes meios ocupacionais (DOUGHERTY *et al.*, 2008). No meio ambiental, a exposição ao benzeno deriva de diferentes fontes, dentre elas, a fumaça do cigarro e de veículos automotivos, composta por derivados petrolíferos. Os produtos petrolíferos são umas das mais importantes fontes de benzeno ambiental, principalmente através da combustão e evaporação da gasolina (BOND, 1986; SNYDER *et al.*, 1993; FISHBEIN, 1998; DOUGHERTY *et al.*, 2008). A exposição ocupacional ao benzeno ocorre geralmente em ambientes industriais que utilizam intensamente petróleo, combustíveis derivados do petróleo ou outros solventes orgânicos em larga escala (WIWANITKIT, 2005; ATSDR, 2007; WEISEL, 2010).

A gasolina é uma mistura complexa de mais de 500 hidrocarbonetos saturados e insaturados. Componentes da gasolina podem variar de acordo com as técnicas de processamento, com a origem do petróleo bruto e em relação aos aditivos que são utilizados para aumentar desempenhos ou atender certas especificações regulamentares (KEENAN *et al.*, 2010). A gasolina contém, em média, aproximadamente 14% de hidrocarbonetos aromáticos, 80% de parafinas e 6% de olefinas, além de álcoois, éteres, metais pesados, detergentes, inibidores de corrosão, antioxidantes entre outros (KEENAN *et al.*, 2010).

A gasolina, um dos principais produtos acabados do petróleo, apresenta aproximadamente 1% de benzeno na sua composição final (KEENAN *et al.*,

2010). Além do benzeno, outros hidrocarbonetos aromáticos voláteis também são encontrados na composição da gasolina. Sendo que, os solventes orgânicos, benzeno, tolueno e xileno (BTX) representam alguns dos compostos mais perigosos presentes na gasolina (MACDONALD, 2000; CHEN *et al.*, 2008). Apesar das baixas concentrações de benzeno presentes na gasolina, esta representa uma das principais fontes de exposição ocupacional e ambiental ao benzeno, atingindo principalmente frentistas de postos de combustíveis, entre outros grupos de trabalhadores expostos (DOUGHERTY *et al.*, 2008).

A avaliação dos riscos causados pela exposição ocupacional ao benzeno, através do monitoramento ambiental e monitorização biológica, aliado aos conhecimentos relativos dos efeitos na saúde, permitem estabelecer as prioridades e as formas efetivas de intervenção para proteger precocemente uma população dos riscos. Vários são os parâmetros biológicos que podem estar alterados em decorrência da interação do organismo com xenobióticos. A quantificação destes parâmetros, usados como biomarcadores é de extrema importância na avaliação da intensidade da exposição e do efeito provocado pela substância (AMORIM, 2003).

Embora não se conheça exatamente a toxicodinâmica do benzeno, estudos têm apontado que a exposição ao benzeno e seus metabólitos podem gerar espécies reativas de oxigênio (EROs). Estes metabólitos reativos do benzeno podem sofrer ciclos redox aumentando a produção intracelular de EROs. Que por sua vez, podem induzir a danos oxidativos a macromoléculas celulares, como por exemplo, o DNA, os lipídeos e as proteínas. O que pode levar a interrupção do funcionamento celular. Caso este dano, não seja corretamente reparado, pode levar a aberrações cromossômicas e possivelmente ao câncer (CHANVAIVIT *et al.*, 2007; NISHIKAWA *et al.*, 2011).

No Brasil, o desenvolvimento tecnológico e econômico norteado pelo aumento do parque industrial, crescimento da frota leve e pesada e expansão da fronteira produtiva, acarretou novos desafios para a determinação dos impactos da poluição à saúde humana. De um lado, temos a introdução de novos combustíveis, cujo potencial de interferir com os níveis de poluição para mais ou para menos, ainda não foi determinado. Por outro lado, a expansão das fontes levou a problemas de poluição atmosférica a áreas desprovidas de

capacidade de monitoramento e gestão do risco. A velocidade da transição energética e da expansão das áreas potencialmente afetadas pela poluição faz surgir à necessidade de que estudos de risco sejam implementados rapidamente. Doenças desencadeadas ou agravadas pela contaminação ambiental resultante dos poluentes do ar vêm sendo cada vez mais preocupantes (BRUNEKREEF, HOLGATE, 2002).

O benzeno é reconhecidamente uma substância carcinogênica e tem sido objeto de controle em âmbito mundial dada sua característica de contaminante universal e seus potenciais efeitos à saúde humana (BARALE, 1995). É classificado no grupo A1 pela Agência Internacional para Pesquisa do Câncer (IARC) e considerado a quinta substância de maior risco, segundo os critérios do programa das Nações Unidas de segurança química (IARC, 2002; MACHADO *et al.*, 2003). Entretanto na sua forma inalterada, o benzeno não é tido como uma substância tóxica, sendo sua toxicidade relacionada às interações biológicas que ocorrem principalmente entre os seus metabólitos e os diferentes alvos celulares, especialmente a medula óssea. Dentre os principais metabólitos tóxicos do benzeno destacam-se hidroquinona, p-benzoquinona, catecol e muconaldeído, que podem atuar isoladamente ou em conjunto (SNYDER E HEDLI, 1996; WITZ *et al.*, 1996).

A carcinogenicidade do benzeno é bem documentada em diversos grupos ocupacionais (ATSDR, 2007). Vários estudos têm apontado o benzeno como principal agente causador de leucemia mieloide aguda e síndromes mielodisplásicas, mesmo em doses relativamente baixas de exposição (GLASS *et al.*, 2004; , KIRKELEIT *et al.*, 2008; WILBUR *et al.*, 2008;). Além de carcinogênico, o benzeno ainda apresenta ação hematotóxica, genotóxica e imunotóxica (WIWANITKIT, 2005). Os diversos efeitos tóxicos observados em estudos envolvendo humanos e animais expostos ao benzeno, contribuíram para a criação de normas de trabalho em diversos países, as quais restringem, ao máximo, as concentrações de benzeno no ambiente de trabalho (WEISEL, 2010). As restrições ao uso do benzeno iniciaram no final do século 19, com a disseminação dos processos industriais na Europa, mais precisamente no ano de 1897, com casos de anemia em mulheres de uma fábrica de pneus de bicicletas na Suécia e um caso de hemorragia em trabalhador de processo de lavagem a seco na França (MACHADO *et al.*, 2003). Com a 1ª Guerra Mundial

houve um incremento da indústria química e do uso generalizado do benzeno como solvente em vários processos industriais, resultando em novos relatos sobre os efeitos tóxicos ocasionados por este xenobiótico (MACHADO *et al.*, 2003). Em 1928, o primeiro caso de leucemia relacionado com a exposição ao benzeno foi descrito por Delore & Borgomano no *Journal de Medicine de Lion* (DELORE E BORGOMANO, 1928). Após o término da Guerra, uma onda de regulamentação de trabalhos envolvendo o benzeno foi iniciada, com objetivo de redução dos níveis de exposição ocupacional. No Brasil, a primeira iniciativa de redução da exposição ao benzeno ocorreu através da resolução interministerial de 1983, na qual os ministérios da saúde e do trabalho e do emprego, juntamente com representações industriais, estabeleceram a redução da contaminação pelo benzeno dos produtos acabados em até 1% do seu volume (MACHADO *et al.*, 2003).

Atualmente, o anexo 13-A da Norma Regulamentadora nº 15 (NR-15), de 20 de dezembro de 1995, da Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho é responsável por regulamentar ações, atribuições e procedimentos de prevenção à exposição ocupacional ao benzeno, visando à proteção da saúde do trabalhador. O presente anexo definiu um Valor de Referência Tecnológico (VRT), para o benzeno e posteriormente uma categoria de VRT, o VRT-MPT, que corresponde à concentração média de benzeno no ar ponderada pelo tempo, para uma jornada de 8 horas de trabalho. Os valores estabelecidos para os VRT-MPT são: a) 1 ppm para as indústrias químicas e petroquímicas; b) 2,5 ppm para as indústrias siderúrgicas (BRASIL, 1995). O cumprimento do VRT é obrigatório no Brasil (BRASIL, 1995), entretanto não assegura a proteção à saúde dos indivíduos expostos, uma vez que não existe um limite seguro de exposição para substâncias cancerígenas, como o benzeno (WEISEL, 2010). Além disso, a Instrução Normativa nº 2 de 20 de dezembro de 1995, que dispõe sobre a Vigilância da Saúde dos Trabalhadores na Prevenção da Exposição Ocupacional ao Benzeno, também tem por objetivo promover a saúde do trabalhador, buscando detectar, o mais precocemente possível, os efeitos nocivos causados pelo benzeno (BRASIL, 1995).

O monitoramento dos níveis ambientais de benzeno é de extrema importância para caracterização e controle dos riscos causados por este xenobiótico. Atualmente, estudos epidemiológicos com objetivo de evidenciar

os efeitos tóxicos do benzeno frente à exposição ambiental, têm observado alterações sanguíneas e outros efeitos adversos em diferentes níveis de exposição ao benzeno (WEISEL, 2010). O monitoramento ambiental aliado à monitorização biológica possibilita a avaliação total da exposição sob a qual o indivíduo encontra-se exposto (OGA, 2008). A monitorização biológica tem por objetivo detectar de forma precoce e preferencialmente reversível os sinais biológicos, que são indicativos da condição de exposição, e podem resultar, em longo prazo, em danos à saúde (MANNO, *et al.*, 2009).

Vários são os parâmetros biológicos que podem estar alterados em decorrência da interação do organismo com xenobióticos. Entretanto, a quantificação destes parâmetros, usados como biomarcadores somente será possível se existir correlação entre a intensidade da exposição e o efeito provocado pela substância (AMORIM, 2003). Os biomarcadores são definidos como alterações em componentes celulares ou bioquímicos, estruturas ou funções do organismo que podem ser quantificadas em qualquer sistema ou amostra biológica (WHO, 1996; MANNO *et al.*, 2009). Os biomarcadores podem ser subdivididos em: biomarcadores de exposição, biomarcadores de efeito e biomarcadores de suscetibilidade, de acordo com a sua importância toxicológica (NRC 1987; WHO, 2001; IUPAC, 2007).

Os biomarcadores de exposição, também denominados indicadores biológicos de exposição (IBE) são definidos como o xenobiótico propriamente dito e/ou seus metabólitos ou ainda, como produtos de interação entre o xenobiótico e alguma molécula-alvo ou célula do organismo (NRC, 1987; MANNO *et al.*, 2009).

Vários trabalhos avaliam a relação de diferentes biomarcadores de exposição ao benzeno com os efeitos tóxicos causados por este solvente orgânico (MAFFEI *et al.*, 2005; RUCHIRAWAT *et al.*, 2007; NAVASUMRIT *et al.*, 2008; SHEN *et al.*, 2008). Dentre os biomarcadores urinários de exposição, destacam-se o ácido fenilmercaptúrico, ácido trans, trans-mucônico, hidroquinona, fenol e catecol, todos provenientes da biotransformação hepática e medular do benzeno (QU *et al.*, 2000; OGA, 2008). A exposição ocupacional e/ou ambiental ao benzeno também pode ser avaliada através das concentrações sanguíneas ou urinárias deste solvente orgânico e ainda pelos níveis do solvente no ar inalado (WEISEL, 2010).

Apesar da ampla variedade de biomarcadores utilizados, ainda objetiva-se adotar aquele que apresente sensibilidade suficiente para avaliar os baixos níveis de exposição ao benzeno e que permita uma detecção precoce dos danos causados pelo benzeno. No Brasil, o ácido trans, trans-mucônico urinário é o biomarcador mais utilizado, preconizado pela portaria nº34 de 2001 (BRASIL, 2001). A correlação entre este biomarcador urinário e o benzeno é detectada em níveis ambientais do solvente menores do que 1 ppm (SCHERER *et al.*; 1998; BARBOSA, 1999). Esses níveis viabilizam a utilização do ácido trans, trans-mucônico urinário como principal biomarcador de exposição no Brasil, onde se considera que a concentração de benzeno permitida no ar ocupacional varia de 1 a 2,5 ppm (FREITAS e ARCURI, 1998, OGA, 2008). O ácido trans, trans-mucônico é um biomarcador bastante sensível, apresentando concentrações elevadas de benzeno a partir de 0,1 ppm. Os níveis de ácido trans, trans-mucônico correlacionam tanto com exposições isoladas realizadas em horas anteriores a análise, como com exposições crônicas em diferentes ambientes ocupacionais (WEISEL, 2010). Entretanto, sua principal desvantagem como indicador biológico de exposição é o fato de sua concentração basal ser influenciada por fatores e características individuais, como hábito de fumar e dieta, podendo ser encontrado na urina de indivíduos não expostos ao benzeno, uma vez que o ácido trans, trans-mucônico também é metabólito do ácido sórbico, usado largamente como aditivo em diferentes alimentos (PEZZAGNO *et al.*, 1999).

Em relação aos biomarcadores de efeito, estes são caracterizados como qualquer alteração bioquímica ou fisiológica mensurável, dentro do organismo, que dependendo da magnitude pode ser reconhecido como um distúrbio potencial da saúde ou doença propriamente dita (NRC, 1987; MANNO *et al.*, 2009).

Adicionalmente aos biomarcadores de exposição e efeito, os biomarcadores de suscetibilidade também são de extrema importância na avaliação de riscos, uma vez que permitem identificar eventuais subgrupos com maior suscetibilidade à exposição (BOLOUFER *et al.*, 2006; SMITH, 2010). Estes biomarcadores indicam uma condição adquirida ou congênita, baseada na capacidade limitada do organismo, frente à exposição a uma substância química específica (NRC, 1987; OGA, 2008).

A ação genotóxica causada por este xenobiótico pode ser avaliada através de biomarcadores de efeito que incluem alterações cromossômicas como hipo e hiperdiploidia, exclusões, trocas de cromátides irmãs, quebras e falhas nas duplas fitas (ATSDR, 2007; DOUGHERTY *et al.*, 2008). Os mecanismos através dos quais os metabólitos do benzeno atuam provocando genotoxicidade incluem a geração de EROs, formação de aductos e dano às proteínas ligadas ao DNA, com conseqüente quebra de fitas de DNA, recombinação mitótica, translocações cromossômicas e aneuploidia (SMITH, 1996; WHYSNER *et al.*, 2004).

Durante situações de estresse oxidativo, caracterizado pelo desequilíbrio entre as espécies oxidativas e agentes antioxidantes, é possível que estes mecanismos se tornem saturados, levando a danos celulares oxidativos (MORENA *et al.*, 2002; BADHAM E WINN, 2010), representados principalmente por modificação de proteínas e/ou enzimas, com perda de função biológica; peroxidação lipídica que colabora para a perda da integridade de membranas celulares e, ainda dano de DNA, levando à perturbação da função celular. Tal fato contribui para que o estresse oxidativo seja considerado como causa principal ou secundária na etiologia de diversas doenças, incluindo a carcinogênese (GERIN *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2005).

Além disso, outros fatores importantes também podem influenciar no mecanismo de toxicidade do benzeno e dos poluentes ambientais. Variações marcantes na toxicidade destes xenobióticos podem estar correlacionadas a fatores biológicos, como sexo, idade, genética e quantidade de tecido adiposo; bem como a influências ambientais, tais como vias de exposição, atividade física, casos de co-exposição, tabagismo, consumo de álcool e hábitos alimentares (SMITH, 2010).

Em relação aos contaminantes ambientais atmosféricos sabe-se que estes desencadeiam diversas intoxicações e sintomas em indivíduos que permanecem em contato com estes xenobióticos por um período diário maior (CANÇADO, 2006). A poluição do ar tem sido amplamente discutida, pois, com os avanços tecnológicos e o aglomerado de veículos nas cidades, tal fator torna-se inevitável. Agravos à saúde, oriundos dela, afetam vários sistemas, sendo os mais acometidos o respiratório e o cardiovascular, intimamente ligados e interdependentes das trocas gasosas (MENDES *et al.*, 2010).

Trabalhadores que realizam suas atividades “a céu aberto” estão expostos às temperaturas altas e baixas, ventos, poluição ambiental ocasionada pela exposição CO, SO₂, O₃, NO_x, NO₂ e óxido Nítrico (NO). Estes trabalhadores são mais suscetíveis a ficarem doente e à ocorrência de acidentes. Aqueles que são fumantes possuem mais chances de ter problemas de saúde, pois a fumaça produzida da combustão do cigarro contém substâncias prejudiciais, incluindo-se o CO (CANÇADO *et al.*, 2012).

A poluição atmosférica pode ocorrer pela emissão de poluentes derivados de processos industriais variados, das queimadas em plantações e da combustão dos veículos movidos a motor, gerando CO. Esse gás é um dos mais expressivos em toxicidade e atua diretamente no sistema respiratório. Cerca de 80 a 90% desse elemento absorvido liga-se ao átomo de ferro da fração heme da hemoglobina (Hb), presente no eritrócito, formando o complexo carboxihemoglobina (COHb). Os sintomas decorrentes dessa ligação estão diretamente relacionados ao aumento dos seus valores (PERES, 2005). Para a população urbana, o tabagismo é uma fonte importante de CO, bem como o escape dos veículos a motor (MAJDANIK *et al.*, 2007).

A poluição do ar pode produzir concentrações de COHb em não fumantes semelhantes às observadas em fumantes. Exposições de CO podem prejudicar o desempenho de tarefas psicomotoras mais complexas. O papel do CO, em acidentes automobilísticos, pode ser considerado, por dados que mostram maiores níveis de COHb em condutores envolvidos em acidentes do que em policiais e em outras populações ocupacionalmente expostas (SAHABANA, 2004).

Em 2002, uma publicação na Associação Médica Americana demonstrou que a exposição crônica aos poluentes do ar reduz significativamente a expectativa de vida, devido ao número excessivo de casos de câncer de pulmão, doença pulmonar obstrutiva crônica e doenças cardiovasculares (CANÇADO *et al.*, 2012).

Dentre os poluentes ambientais atmosféricos destacam-se também o material particulado (MP), que consiste em uma mistura de partículas sólidas ou líquidas suspensas no ar, que variam em forma, composição e origem. De

modo geral, pode-se definir a distribuição do MP como trimodal, com frações grossa, fina e ultrafina (POPE *et al.*, 2002).

A fração grossa do material particulado é composta por partículas com diâmetro aerodinâmico superior a 2,5 μm , que são geradas naturalmente a partir do solo ou outros materiais da crosta. Nas cidades com alta densidade de tráfego, uma fração significativa da fração grossa é produzida pela fricção dos pneus dos veículos com o asfalto das ruas, contendo elementos do pavimento e da borracha pneumática. As partículas finas (MP 2,5 μm) são derivadas, de maneira geral, de processos de combustão de motores, indústrias ou usinas termelétricas. O MP 2,5 contém partículas primárias, produzidas diretamente pelas fontes emissoras, bem como partículas secundárias (principalmente sulfatos e nitratos), geradas pelo processo de conversão de gás a partículas, a partir de óxidos de enxofre e óxidos de nitrogênio. Fazem parte do MP 2,5 partículas de carvão produzidas pela combustão dos combustíveis fósseis, que possuem adsorvidos à sua superfície diferentes elementos e compostos, tais como metais pesados e hidrocarbonetos. As partículas ultrafinas, definidas como aquelas com diâmetro aerodinâmico inferior a 0,1 μm , têm um tempo de residência na atmosfera relativamente curto, pois se agregam progressivamente para formar partículas finas (CANÇADO *et al.*, 2012).

Além do MP, CO, O₃, NO_x, SO₂ os HPAs também representam importantes poluentes ambientais (POPE *et al.*, 2002). Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, especialmente, o BaP, têm sido demonstrado como importante poluente no desenvolvimento da carcinogênese, desempenhando papel embriotóxico e teratogênico (TAKAISHI *et al.*, 2009). O BaP é um produto proveniente da combustão incompleta e pode estar presente na fumaça do cigarro e da madeira, como produto de emissão de motores a diesel e da gasolina, sendo um dos componentes da poluição urbana (TAKAISHI *et al.*, 2009). A potente ação carcinogênica do BaP é decorrente da ação de alguns dos seus metabólitos intermediários que são intercalantes de DNA e, portanto, agentes mutagênicos/oncogênicos (WHO, 2008; BOFFETTA *et al.*, 1997; PEREIRA *et al.*, 2000).

Quanto aos biomarcadores de exposição aos poluentes atmosféricos, sabe-se que o MP possui diversas substâncias em sua composição química,

dentre elas os HPAs. O BaP é um dos HPAs mais importantes, sendo que seu metabólito mais utilizado é o 1-hidroxipireno (1-OH pireno) urinário. Vários estudos têm sugerido este metabólito como um representativo biomarcador de exposição aos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HARTMANN *et al.*, 2001).

Muitas das substâncias às quais o ser humano se expõe, como o BaP, geram intracelularmente ERO_s, favorecendo a ocorrência de lesões em biomoléculas, como os lipídios, as proteínas e o DNA (KAZANTSEV, 2007).

O ensaio cometa é uma técnica bioquímica, simples que detecta quebras no DNA e corresponde a um ensaio citogenético. Este ensaio é aplicável em qualquer suspensão de células eucarióticas, independentemente de estarem em proliferação ou não (COLLINS *et al.*, 1997; COLLINS, 2004; HARTMANN *et al.*, 2001).

Este teste detecta danos primários no DNA, induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes (LEE e STEINERT, 2003; VILLELA *et al.*, 2007). Logo, detecta em células individuais, quebras simples e duplas de fita de DNA, eventos de reparo por excisão incompleta, lesões alcalilábeis, danos oxidativos em bases do DNA e crosslinks entre DNA-DNA, DNA-proteína e DNA-droga, possibilitando quantificar o dano, mas não identificar com clareza qual desses eventos foi responsável pela indução deste (SINGH, 2000).

Para execução deste teste pode ser utilizada a versão alcalina (Ph>13), desenvolvida por Singh *et al.*, (2000), esta é a versão mais utilizada, pelo fato de detectar danos diretos e indiretos como lesões por metilação e adutos, os quais, sendo alcalilábeis, se expressam como quebras simples frente ao tratamento alcalino usado no ensaio (LEE e STEINERT, 2003; VILLELA *et al.*, 2006; VILLELA *et al.*, 2007; TICE *et al.*, 2000). O ensaio não é usado para detectar mutações, apenas lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas por este teste podem ser reparadas (LEE e STEINERT, 2003; COLLINS *et al.*, 1997).

Os resultados podem ser analisados em microscópio óptico normal, quando as células são coradas com nitrato de prata ou em microscópio de fluorescência quando coradas com brometo de etídio. A classificação das células é de acordo com o tamanho da cauda em relação à cabeça em quatro

classes de dano. Classe 0, sem cauda, sem dano; classe 1, uma pequena cauda menor que o diâmetro da cabeça; classe 2, comprimento da cauda entre uma e duas vezes o diâmetro da cabeça; classe 3, uma cauda longa superior a duas vezes o diâmetro da cabeça e classe 4, cauda longa e mais espalhada do que a classe 3 (COLLINS *et al.*, 1997; VILLELA *et al.*, 2007).

Os micronúcleos são estruturalmente pequenos núcleos representando o material genético que foi perdido pelo núcleo principal, como consequência de um dano genético que pode ser causado por agentes físicos, químicos ou biológicos, capazes de interferir no processo de ligação do cromossomo às fibras do fuso, ou que possam induzir a perda do material genético (cromossomos inteiros ou fragmentados). O teste de micronúcleos, portanto, detecta mutagênese cromossômica em eucariotos do tipo clastogênese, aneugênese e danos no fuso mitótico (VILLELA *et al.*, 2006). A presença de micronúcleo pode ser tomada como indicação da existência prévia de aberração cromossômica. O micronúcleo aparece pela primeira vez no final da primeira divisão mitótica, após clastogênese ou aneugênese, porém micronúcleos adicionais podem se formar nas divisões seguintes (MALUF e ERDTMAN, 2003).

O DNA é uma complexa molécula orgânica responsável pelas informações genéticas das células dos organismos. Para que estas informações sejam transmitidas com sucesso geração para geração, a manutenção da integridade do material genético deve ser mantida, sendo esta essencial para a sobrevivência dos organismos vivos. Apesar da sua considerável estabilidade química, uma exposição constante a vários agentes podem gerar uma variedade de lesões bastante grande na estrutura (FRIEDBERG, 2003). Estas lesões podem atingir mecanismos como replicação do DNA e transcrição em RNA. Como consequência, danos no DNA podem produzir na célula efeitos genotóxicos (mutagênese) ou citotóxicos (morte celular) (BERRA, 2008).

Uma das maiores ameaças à integridade do genoma é a oxidação de bases nitrogenadas, gerada principalmente por EROs. Um dos produtos mais frequentes e comuns resultantes da oxidação do DNA é a 8-OHdG. Essa lesão é particularmente deletéria por fazer com que a guanina oxidada possa parear erroneamente com uma adenina, levando a uma mutação por transversão do

par de bases. O reparo por excisão de base é o processo celular mais importante na remoção da 8-OHdG. Este reparo cliva apenas a base, deixando no DNA o esqueleto de açúcar-fosfato e gerando um sítio abásico (KUNRATH *et al.*, 2008). Conforme a Figura 1, a lesão é removida da molécula de DNA pela ação da enzima de reparo 8-oxoGua DNA glicosilase (OGG1) tanto na mitocôndria quanto no núcleo das células (COOKE e EVANS, 2007). A eliminação urinária desta base oxidada também pode estar relacionada à ação de enzimas do tipo Nudix hidrolases sobre o pool de dNTPs, entretanto, isto não representa muito no total de bases de guanina oxidadas (COOKE e EVANS, 2007). A 8-OHdG é utilizada como um biomarcador de estresse oxidativo e avalia os danos oxidativos do DNA em indivíduos expostos (MANINI *et al.*, 2010). Métodos bem definidos estão disponíveis para a determinação deste biomarcador de stress oxidativo no DNA mitocondrial e nuclear, bem como em matrizes extracelulares tais como a urina (COOKE e EVANS, 2007).

Nos últimos anos, as lesões pela 8-OHdG vêm sendo detectadas e analisadas com elevada sensibilidade por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massa (GC-MS), espectrometria de massa acoplada à cromatografia líquida (LC-MS), métodos imuno-espectrofotométricos, por métodos imuno-histoquímicos e eletroforese em gel de célula única. A determinação e análise da 8-OHdG pode ser realizada em órgãos de animais e em amostras humanas (urina, órgãos, DNA de leucócitos) como um biomarcador de estresse oxidativo, de envelhecimento, e também de carcinogênese (VALAVANIDIS *et al.*, 2009).

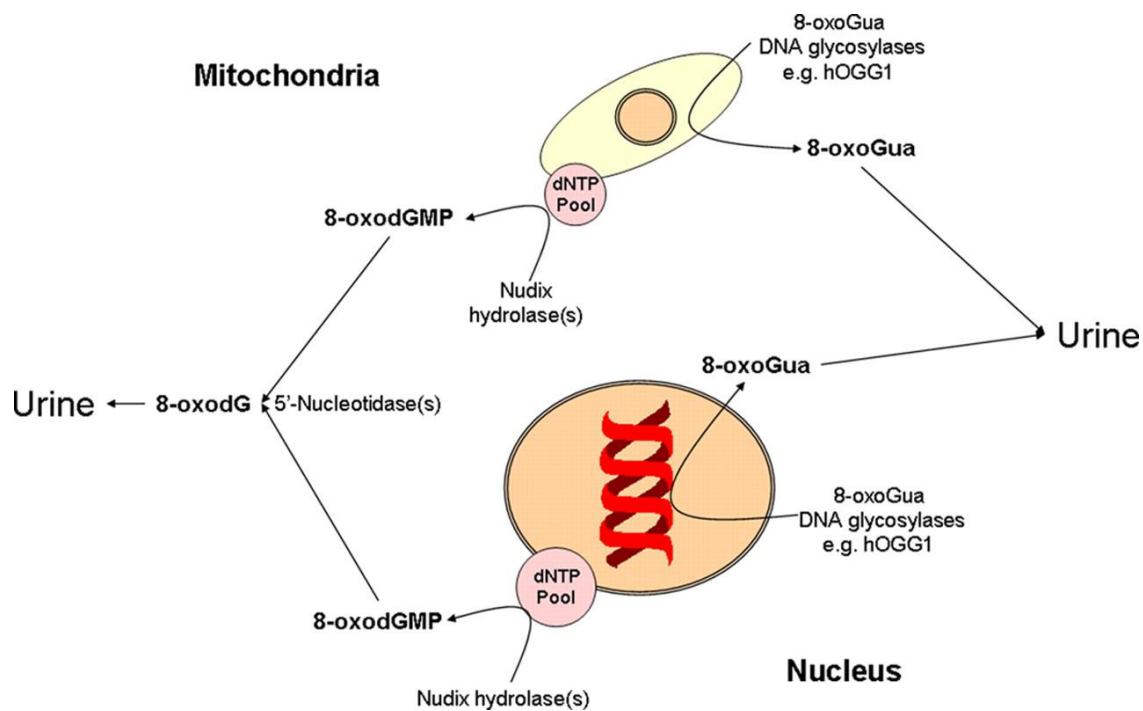


FIGURA 1. Origem extracelular da 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG) através da ação direta da enzima 8-oxoGua DNA glicosilase (OGG1), que tem atuação nuclear e mitocondrial, sobre as bases de guanina do DNA oxidadas. Também é demonstrada uma segunda forma de eliminação de guaninas oxidadas pela ação de enzimas do tipo Nudix hidrolase(s) que atuam sobre desoxiribonucleotídeos trifosfatados (dNTPs) (Fonte: COOKE e EVANS, 2007).

ARTIGO:

Evaluation of genotoxicity in workers exposed to benzene and atmospheric pollutants

Submetido para publicação na revista *Mutation Research Genetic Toxicology*

and Environmental Mutagenesis

DOI: 10.1016/j.mrgentox.2014.05.008

Alguns trabalhadores, como atendentes de postos de gasolina e taxistas estão ocupacionalmente expostos a diversos xenobióticos, que podem ser prejudiciais à sua saúde. Entre estes xenobióticos, destacam-se os poluentes ambientais e o benzeno, que podem levar a vários tipos de danos no DNA. Ensaio de genotoxicidade e mutagenicidade são importantes para detectar e avaliar os efeitos causados por esses poluentes. Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar a genotoxicidade e mutagenicidade em trabalhadores ocupacionalmente expostos a diferentes xenobióticos. Para isso, foram determinados biomarcadores de exposição, tais como o ácido t,t-mucônico (t,t-MA) e a carboxihemoglobina (COHb). Além disso, também foram analisados os biomarcadores de efeito, 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG), ensaio cometa e micronúcleos (MN).

DISCUSSÃO

A exposição ocupacional crônica a médio e longo prazo contribui para o desenvolvimento de inúmeras doenças frequentemente diagnosticadas por sinais e sintomas que diminuem a qualidade de vida dos trabalhadores expostos (FRITSCHI *et al.*, 2009) Considerando-se que as pessoas gastam mais do que um quarto de suas vidas no ambiente de trabalho, a exposição ocupacional a xenobióticos tem se tornado cada vez mais um importante problema de saúde pública (FAISANDIERL *et al.*, 2011).

O monitoramento biológico ao benzeno e aos poluentes ambientais é uma forma atraente de avaliar a exposição nos locais de trabalho, estudos demonstram que isso se aplica até mesmo para níveis modestos de exposição (MANNO *et al.*, 2010). O monitoramento biológico, utilizando diferentes biomarcadores, como de exposição, de efeito ou de suscetibilidade, tem um papel fundamental no trabalho de avaliação de risco (MANNO *et al.*, 2010).

Os resultados encontrados para o biomarcador de exposição ao benzeno o *t,t*-MA urinário, confirmam que os frentistas, indivíduos não fumantes foram expostos a baixos níveis de benzeno. Os níveis de *t,t*-MA urinário encontrados foram maiores nos frentistas em comparação com o grupo não exposto, no entanto todos os valores estavam abaixo do índice de exposição biológica permitido pela American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH), (BEI: 500 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ creatinina), (ACGIH, 2011).

Fracasso *et al.*, (2010) em suas pesquisas, constatou que a exposição pessoal ao benzeno é influenciada pelo tabagismo, sendo significativamente maior em fumantes do que em não-fumantes. Paula *et al.* (2003) nos seus resultados encontrou uma correlação positiva com o hábito de fumar e uma diferença significativa entre o *t,t*-MA urinário nos indivíduos fumantes e não fumantes.

Em um estudo conduzido em 2005, Wiwanitkit, Suwansaksri e Soogarun determinaram níveis nove vezes maiores de *t,t*-MA em indivíduos fumantes, em relação aos não fumantes. Semelhantemente, Martins e Siqueira (2004), obtiveram em seus resultados uma maior excreção de *t,t*-MA na urina dos fumantes expostos ao benzeno do que os não fumantes.

Os níveis de carboxihemoglobina não se mostraram alterados nos taxistas quando comparados ao grupo não exposto em nosso estudo. Isso pode ter ocorrido devido ao tamanho reduzido da amostra, ou pode indicar

também uma baixa especificidade da COHb no sangue como um biomarcador para avaliar a exposição ocupacional ao CO na poluição do ar (BONO *et al.*, 2007). A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda níveis de COHb entre 2,5-3% para populações não-fumantes (WHO, 1992). Todos os valores observados nos grupos de estudo estavam abaixo do índice de exposição biológica estabelecido pela OMS.

Avaliação de genotoxicidade foi avaliada pelo ensaio cometa e pelo ensaio de micronúcleos. O ensaio cometa, na sua versão alcalina tem sido usado como um biomarcador sensível que revela o dano ao DNA causado tanto diretamente por agentes oxidantes reativos, ou indiretamente por meio de substâncias que podem gerar espécies reativas (FAIRBAIRN *et al.*, 1995; VILLANI *et al.*, 2000; FRACASSO *et al.*, 2002).

Os resultados mostraram que tanto os frentistas como os taxistas tiveram um aumento significativo em relação às taxas de danos no DNA. Com base nesses resultados, sugerimos que a exposição ocupacional ao benzeno e aos poluentes ambientais induz danos ao DNA, uma vez que houve um aumento da genotoxicidade evidenciado no ensaio cometa. Além disso, o aumento do índice de danos do DNA foi acompanhado por um aumento da frequência de micronúcleos no grupo dos frentistas, confirmando que a exposição ocupacional a benzeno induz a danos no DNA. Se estes danos não forem reparados, podem levar a mutações e ao desenvolvimento da carcinogênese (VALAVANIDIS *et al.*, 2009). O ensaio cometa mostrou um grau significativo de danos no DNA em indivíduos expostos ao benzeno e aos poluentes, quando comparado com indivíduos não expostos.

Por outro lado, a frequência de células anormais nos taxistas, evidenciada pelo ensaio de micronúcleos, não apresentou diferença significativa quando comparada ao grupo não exposto. Estas diferenças entre os resultados de ambos os ensaios, cometa e MN poderia ser atribuída aos tipos de exposição e / ou aos danos causados. O ensaio de micronúcleos tem sido utilizado para avaliar os danos do DNA a nível cromossômico, diferindo, assim, do ensaio cometa, que pode detectar danos reparáveis (FAIRBAIRN *et al.*, 1995). Os nossos resultados mostraram que os efeitos genotóxicos de exposição ao benzeno podem ser detectados pelo ensaio cometa e MN

(HEUSER *et al.*, 2007), enquanto que o teste de micronúcleos não se alterou em indivíduos expostos aos poluentes ambientais.

De acordo com Angelini *et al.*, (2011) a genotoxicidade do benzeno e dos poluentes ambientais pode estar associada com o excesso de produção de espécies reativas de oxigênio (ERO_s), uma vez que um desequilíbrio nestas espécies contribui para a instabilidade genômica.

As EROs, assim como as quinonas decorrentes do processo de metabolização do benzeno podem ligar-se covalentemente a macromoléculas, como o DNA e proteínas. Este ataque direto sobre o DNA pode dar origem a um dano oxidativo ou a quebras das fitas duplas. Vários estudos já destacaram que a exposição ocupacional ao benzeno induz danos genéticos, incluindo as aberrações cromossômicas, formação de micronúcleos (MN), danos no DNA com formação de 8-OHdG (ANGELINI *et al.*, 2012).

O mecanismo responsável pela remoção dos danos no DNA induzido pelo benzeno é desconhecido. No entanto, a via de reparação de DNA por excisão de bases é considerada altamente importante para a remoção de lesões de DNA produzidas por metabólitos de benzeno, fenóis e quinonas, (ANGELINI *et al.*, 2012).

O benzeno pelo fato de induzir quebras nas fitas que formam a dupla hélice do DNA acaba levando as células do organismo a mutações e a tumores. Vários tipos de câncer têm relação com o benzeno, como o câncer de pâncreas, de boca, de mama, de próstata, de fígado, de intestino, colorretal, leucemias, linfomas, entre outros (SALGADO E PEZZAGNO, 1991).

Foi observada uma correlação positiva entre *t,t*-MA e 8-OHdG urinários. Manini *et al.*, (2010) também relatou uma correlação positiva entre a excreção de 8-OHdG e metabólitos do benzeno em seus estudos realizados com grupos expostos, onde faziam parte, policiais que trabalham no trânsito, atendentes de postos de gasolina e taxistas, todos não fumantes. O benzeno é conhecido por gerar metabólitos capazes de induzir o estresse oxidativo e a danos ao DNA. No entanto, também é possível que a exposição concomitante ao material particulado no ar, seja o principal fator responsável por danos ao DNA. Tem sido demonstrado em seres humanos que a inalação do ar com vários tipos de poluentes tem contribuído para um aumento da excreção de 8-OHdG, (MANINI

et al., 2010; SUZUKI *et al.*, 1995; MANINI *et al.*, 2009; DANIELSEN *et al.*, 2008; YOSHIOKA *et al.*, 2008).

Além disso, encontramos uma correlação positiva entre a frequência de MN/1000 células e índice de dano ao DNA com o biomarcador de dano oxidativo (8-OHdG). A excreção urinária de 8-OHdG reflete tanto a oxidação do DNA quanto o seu reparo por excisão. Fatores fisiológicos como idade, as taxas metabólicas e doenças, estilo de vida, tabagismo, exercício, dieta e exposições ambientais também podem alterar o nível urinário de 8-OHdG (CHUANG *et al.*, 2003).

Em relação ao tempo de exposição ao benzeno e aos poluentes ambientais, foram observadas relações com diferentes biomarcadores de genotoxicidade. Estes resultados indicam a possibilidade de que estes biomarcadores podem ser adotados no monitoramento contínuo das atividades de vigilância de risco ocupacional. O uso de biomarcadores de exposição e efeito fornece informações adicionais para estimar a exposição e para calcular o risco dos trabalhadores que passam longas horas no trânsito e também expostos sem equipamento de proteção individual adequado em postos de gasolina (ANWAR, 1994).

CONCLUSÃO

- ✓ Este estudo indica que a exposição ao benzeno e aos poluentes ambientais está intimamente ligada à genotoxicidade e aos danos oxidativos.
- ✓ Através deste estudo pode-se concluir que o *t,t*-MA mostrou ser um indicador apropriado para a avaliação dos frentistas expostos ao benzeno em baixas concentrações.
- ✓ Verificou-se que a excreção urinária da (8-OHdG) pode ser utilizada para avaliar o dano oxidativo a exposição ocupacional e ambiental através da comparação de dados entre um grupo não exposto e um grupo exposto em outros estudos.
- ✓ A redução da carga de trabalho é necessária para diminuir a exposição ocupacional e os riscos para a saúde de taxistas e frentistas.
- ✓ A análise dos resultados reafirma a importância da realização de novos estudos com frentistas e taxistas, a fim de confirmar os resultados encontrados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, L. C. A. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. **Rev Bras Epidemiol**, v. 6, p. 158-170, 2003.

ANGELINI, S.; KUMAR, R.; BERMEJO, J.L.; MAFFEI, F.; BARBIERI, A.; GRAZIOSI, F.; CARBONE, F.; CANTELLI-FORTI, G.; VIOLANTE, F.S.; HEMMINKI, K.; HRELIA, P. Exposure to low environmental levels of benzene: evaluation of micronucleus frequencies and S-phenylmercapturic acid excretion in relation to polymorphisms in genes encoding metabolic enzymes. **Mutat Res**, v. 719, p. 7–13, 2011.

ANGELINI, S.; MAFFEI, F.; BERMEJO, J. L.; RAVEGNINI, G.; L'INSALATA, D.; CANTELLI-FORTI, G.; VIOLANTE, F. S.; HRELIA, P. Environmental exposure to benzene, micronucleus formation and polymorphisms in DNA-repair genes: a pilot study. **Mutat Res**, v. 743, p. 99–104, 2012.

ANWAR, W.A. Monitoring of human populations at risk by different cytogenetic end points. **Environ Health Perspect**, v.102, p. 131–134, 1994.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological profile for benzene. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, **Public Health Service**, 2007.

BADHAM, H. J.; WINN, L. M. In utero and in vitro effects of benzene and its metabolites on erythroid differentiation and the role of reactive oxygen species. **Toxicol Appl Pharm**, v. 244, p. 273-279, 2010.

BARALE, R. Genotossità del benzene. In: Il benzene: tossicologia, ambienti di vita e di lavoro. **Morgan Ed**, p. 41-50, 1995.

BARBOSA, E. M. Exposição ocupacional ao benzeno: o ácido trans, trans-mucônico como indicador biológico de exposição na indústria de refino de petróleo. **Petrobrás/Serviços de Recursos Humanos**, p. 1-48, 1999.

BATALHA, J.R.F.; GUIMARÃES, E.T.; LOBO, D.J.A.; LICHTENFELS, A.J.F.C.; DEUR, T.; CARVALHO, H.A.; ALVES, E.S.; DOMINGOS, M.; RODRIGUES, G.S. SALDIVA, P.H.N. Exploring the clastogenic effects of air pollutants in São Paulo (Brazil) using the *Tradescantia micronuclei* assay. **Mutat Res**, v. 426, p. 229–232, 1999.

BEIs based on the Documentation of the Threshold Limit Values for Chemical Substances and Physical Agents and Biological Indices, in: American Conference of Governmental Industrial Hygienists (ACGIH), Cincinnati, 2011.

BERRA M.C. Estudos de reparo de DNA por excisão de nucleotídeos em lesões oxidativas em células de mamíferos. **Instituto de Ciências Biomédicas**, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008.

BOFFETTA, P.; JOURENKOVA, N.; GUSTAVSSON, P. Cancer risk from occupational and environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. **Cancer Causes & Control**, v. 8, p. 444-472, 1997.

BOLUFER, P.; BARRAGAN, E.; COLLADO, M.; CERVERA, J.; LÓPEZ, J.A.; SANZ, M.A. Influence of genetic polymorphisms on the risk of developing leukemia and on disease progression. **Leuk Res**, v. 30, p. 1471-1491, 2006.

BOND, A. E. Self-service station vehicle refueling exposure study. In: Proceedings of the 1986 EPA/APCA Symposium on Measurement of Toxic Air Pollutants, **Air Pollution Control Association**. Pittsburgh, PA, p. 458–466, 1986.

BONO, R.; PICCIONI, P.; TRAVERSI, D.; DEGAN, R.; GROSA, M.; BOSELLO, G. Urban air quality and carboxyhemoglobin levels in a group of traffic policemen, **Sci Total Environ**, v.376, p.109–15, 2007.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. NR-15. In: **Segurança e Medicina do Trabalho**. 50 ed. 1995.

BRASIL. Ministério do Trabalho e Emprego. Portaria-34. In: **Segurança e Medicina do Trabalho**. 50 ed. 2001.

BRAUER, M.; HOEK, G.; VAN VLIET, P.; MELIEFSTE, K.; FISCHER, P.H.; WIJGA, A.; KOOPMAN, L.P.; NEIJENS, H.J.; GERRITSEN, J.; KERKHOF, M.; HEINRICH, J.; BELLANDER, T.; BRUNEKEEF, B. Air pollution from traffic and the development of respiratory infections and asthmatic and allergic symptoms in children. **Am J Respr Crit Care Med**, v.166, p.1092-8, 2002.

BRUNEKREEF, B.; HOLGATE, S. T. Air pollution and health. **Lancet**, v. 360, p. 1233-1242, 2002.

CANÇADO J. E. D.; BRAGA, A.; PEREIRA, L. A. A.; ARBEX, M.A.; SALDIVA P.H.N, SANTOS U.P. Repercussões clínicas da exposição à poluição atmosférica. **J Bras Pneumol**, v.32, p.5-11, 2006.

CHANVAIVIT, S.; NAVASUMRIT, P.; HUNSONTI, P.; ATRUP H.; RUCHIRAWAT. M. Exposure assessment of benzene in Thai workers, DNA-repair capacity and influence of genetic polymorphisms. **Mutat Res**, p. 79-78, 2007.

CHEN, C. S.; HSEU, Y.C.; LIANG, S.H.; KUO, J.Y.; CHEN, S.C. Assessment of genotoxicity of methyl-tert-butyl ether, benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene to human lymphocytes using comet assay. **J Hazard Mater**, v. 153 p. 351-356, 2008.

CHUANG, C.Y.; LEE, C.C.; CHANG, Y.K.; SUNG, F.C. Oxidative DNA damage estimated by urinary 8-hydroxydeoxyguanosine: influence of taxi driving, smoking and areca chewing. **Chemosphere**, v. 52, p.1163–1171, 2003.

COOKE, M.S.; EVANS, M. D. 8-Oxo-deoxyguanosine: Reduce, reuse, recycle? **Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)**, v.104, p. 13535–13536, 2007.

COLLINS, A .; DUSINSKÁ, M.; FRANKLIN ,M.; SOMOROSVSKÁ, H.; DUTHIE, S.; FILLION, L.; PANAYIOTIDIS, M.; RASLOVÁ, K.; E VAUGHAN, N. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation and applications. **Environ Mol Mutagen**, v.30, p.139-146, 1997.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. **Mol Biotechnol**, v. 26, p. 249-61, 2004.

COSTA, C.; DE PASQUALE, R.; SILVARI, V.; BARBARO, M.; CATANIA, S. In vitro evaluation of oxidative damage from organic solvent vapours on human skin. **Toxicol In Vitro**, v. 20, p. 324-331, 2005.

COSTA, FERREIRA M. A.; COSTA BARROZO M. F. Benzeno: uma questão de saúde pública, v.27, p. 201-204, 2002.

COSTA, R.M.A.; MENK C.F.M. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. **Biociência: ciência e desenvolvimento**, v.3, p. 24-26, 2000.

COUtrim, M.X.; CARVALHO, L. R. F.; ARCURI, A.S.A. Avaliação dos métodos analíticos para a determinação de metabólitos do benzeno como potenciais biomarcadores de exposição humana ao benzeno no ar. **Quim Nova**, v. 23, 2000.

DANIELSEN, P.H.; BRÄUNER, E.V.; BARREGARD, L.; SALLSTEN, G.; WALLIN, M.; OLINSKI, R.; ROZALSKI, R.; MOLLER, P.; LOFT, S. Oxidatively damaged DNA and its repair after experimental exposure to wood smoke in healthy humans. **Mutat Res**, v. 64, p.237–42, 2008.

DELORE, P.; BORGOMANO, C. Leucemie aigue au cours de l'intoxication benzenique: sur l'origine toxique de certaines leucemies aigues et leur relations avec les anemies graves. **J Med Lyon**, v. 9, p. 227-233, 1928.

DOUGHERTY, D.; GARTE, S.; BARCHOWSKI, A.; ZMUDA J.; TAIOLI E. NQO1, MPO, CYP2E1, GSTT1 and GSTM1 polymorphisms and biological effects of benzene exposure - a literature review. **Toxicol Lett**, v. 182, p. 7-17, 2008.

FAIRBAIRN, D.W.; OLIVE, P.L.; O'NEILL, K.L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutat Res**, v. 464, p. 229–237, 1995.

FAISANDIERL, L.; BONNETERRE, V.; DE GAUDEMARIS, R.; BICOUT, D.J. Occupational exposure: A network-based approach for characterizing Occupational Health Problems. **J Biomed Inform**, v. 44, p. 545–552, 2011.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat Res**, v.455. p.81-95, 2000.

FISHBEIN, L. Benzene: uses, occurrence, and exposure. In: Fishbein, L., O'Neill, O.K. (Eds.), Environmental Carcinogens: Methods of Analysis and Exposure Measurement. **Benzene and Alkylated Benzenes**, p. 67–108, 1998.

FRACASSO, M. E.; DORIA, D.; BARTOLUCCI, G. B.; CARRIERI, M.; LOVREGGIO, P.; BALLINI, A.; SOLEOC, L.; TRANFOD, G.; MANNOE, M. Low air levels of benzene: Correlation between biomarkers of exposure and genotoxic effects. **Toxicol Lett**, v. 192. p. 22–28, 2010.

FRACASSO, M.E.; PERBELLINI, L.; SOLDA, S.; TALAMINI, G.; FRANCESCHETTI, P. Lead induced DNA strand breaks in lymphocytes of exposed workers: role of reactive oxygen species and protein kinase C. **Mutat Res**, v. 515 p. 159–169, 2002.

FREITAS N.; ARCURI A. Valor de referência tecnológico (VRT) - a nova abordagem do controle da concentração de benzeno nos ambientes de trabalho. **Rev Bras Saude Ocup**, v. 24, p 71-85, 1998.

FRIEDBERG, E.C. DNA damage and repair. **Nature**, v. 421, p.436-40, 2003.

FRITSCHI, L.; FRIESEN, C.M.; GLASS, D.; BENKE, G.; GIRSCHIK, J.; SADKOWSKY, T. OccIDEAS: retrospective occupational exposure assessment in community-based studies made easier. **J Environ Public Health**, 2009.

Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho. FUNDACENTRO. **Benzeno: subsídios técnicos à Secretaria de Segurança e Saúde do Trabalho**. São Paulo (SP): 2ª ed, 1995.

GERIN, M.; SIEMIATYCKI, J.; DESY, M.; KREWSKI, D. Associations between several sites of cancer and occupational exposure to benzene, toluene, xylene, and styrene: results of a case-control study in Montreal. **Am J of Ind Med**, v. 34, p. 144-156, 1998.

GLASS, D. C. et al. Benzene exposure and leukemia. **Epidemiology**, v. 15, p. 510-511, 2004.

GOLDSMITH J.R.; LANDAW S.A. Carbon monoxide and human health. **Science**, v.162, 1968.

HARTMANN, A.; KISKINIS E.; FJÄLLMAN, A E SUSTER, W. Influence of cytotoxicity and compound precipitation on test results in the alkaline comet assay. **Mutat Res**, v.497, p.199-212, 2001.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCWABB, S.; BURURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R.R. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. **Mutagen**, v.18, p. 45-51, 2003.

HEUSER, V.D.; ERDTMANN, B.; KVITKO, K.; ROHR, P.; SILVA, J. Evaluation of genetic damage in Brazilian footwear-workers: biomarkers of exposure, effect, and susceptibility. **Toxicol**, v. 232, p. 235–247, 2007.

IARC, International Agency for Research on Cancer. Complete List of Agents, Mixtures and Exposures Evaluated and Their Classification, 2002.

IARC, International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. Re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide, p. 71:319, 1999.

INCA, Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Vigilância do câncer relacionado ao trabalho e ao ambiente/ Instituto Nacional de Câncer. **Coordenação de Prevenção e Vigilância**. Rio de Janeiro, RJ, 2 ed., 2010.

IUPAC, International Union of Pure and Applied Chemistry. Glossary of Terms used in Toxicology, 2nd edition, v. 79, n. 7, p. 1153-1341, 2007.

KEENAN, J. J., et al. Gasoline: A complex chemical mixture, or a dangerous vehicle for benzene exposure? **Chem Biol Interact**, v. 184, p. 293-295, 2010.

KERETETSE, G. S.; LAUBSCHER, P. J.; DU PRESSIS, J. L.; PRETORIUS, P. J.; WESTHUIZEN, F. H. VAN DER.; DEVENTER, E. VAN.; DYK, E.; VAN ELOFF, F. C.; AARDEL, M. N.; VAN PLESSIS, H. D.U. DNA Damage and Repair Detected by The Comet Assay in Lymphocytes of African Petrol Attendants: A Pilot Stud. **Ann Occup Hyg**, p. 653-62, 2008.

KIRKELEIT, J. et al. Effects of benzene on human hematopoiesis. **Open J Hematol**, v. 2, p. 87-102, 2008.

KUNRATH, L.M.; FURTADO, C.; MACEDO, A. M.; FRANCO, G.R.; PENA, S.D. J.; TEIXEIRA, S.M.R.; MACHADO, C.R. Caracterização funcional de 8-Oxoguanina DNA glicosilase de *Trypanosoma cruzi*, 2008.

LEE, R.F.; STEINERT, S. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. **Mutat Res**, v. 544, p. 43-64, 2003.

NISHIKAWA,T.; IZUMO,K.; MIYAHARA,E.; HORIUCHI,M., OKAMOTO,Y.; KAWANO, Y.; TAKEUCH, I.T. Benzene induces Cytotoxicity without Metabolic Ativation. **J Occup Health**, p. 84- 92, 2011.

PAULA, F. C. S.; SILVEIRA. J. N.; JUNQUEIRA, R. G.; LEITE, E. M. A. Avaliação do ácido trans, trans - mucônico urinário como biomarcador de exposição ao benzeno. **Rev Saude Pub**, 2003.

PEREIRA, A. D.; MOREIRA, J. C.; DIAS, A. E. et al. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitratos (NHPAs): Uma revisão metodológica. **Química Nova**, v. 23, p. 765-773, 2000.

PEREIRA, F.H.K.; JEDRYCHOWSKY, W.; WHYATT, R.; CAMPBELL, U.; HSU, Y; SANTELLA, R.; ALBERTINI, R.; O`NEIL, J.P. In uterus damage from environmental pollution is associated with somatic gene mutation in newborns. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.11, p. 1134-7, 2002.

POPE, C. A.; BURNETT, R.T.; THUN, M.J.; CALLE, E.E.; KREWSKI, D.; ITO, K.; THURSTON, G. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long term exposure to fine particulate air pollution. **J Ame Med Ass**, v. 287, p. 1132-1141, 2002.

MACDONALD, J. A. Evaluating natural attenuation for groundwater cleanup. *Environ.* **Science of Technology**, v. 34, p. 346A–353A, 2000.

MACHADO, J. M. H. et al. Alternativas e processos de vigilância em saúde do trabalhador relacionados à exposição ao benzeno no Brasil. **Ciências & Saúde Coletiva**, v. 8, p. 913-921, 2003.

MAFFEI, F. et al. Effects of environmental benzene: Micronucleus frequencies and haematological values in traffic police working in an urban area. **Mutat Res**, v. 583, p. 1-11, 2005.

MAJDANIK S.; OROWICZ W.; BOROWIAK K.; POTOCKA-BANAŚ B. Carbon monoxide as an external cause of fatality. **Ann Acad Med Stetin**, v. 53, 2007.

MALUF, S.W.; ERDTMANN B. Biomonitorização do dano genético em humanos. **Genética Toxicológica**, p. 183-205, 2003.

MANINI, P.; DE PALMA, G.; ANDREOLI, R.; MOZZONI, P.; POLI, D.; GOLDINI, M.; PETYX, M.; APOSTOLIC, P.; MUTTI, A. Occupational exposure to low levels of benzene: Biomarkers of exposure and nucleic acid oxidation and their modulation by polymorphic xenobiotic metabolizing enzymes. **Toxicol Lett**, p. 229–235, 2010.

MANINI, P.; ANDREOLI, P.G.; MARCZYNSKI, B.; HANOVA, M.; MOZZONI, A.; NACCARATI, L.; VODICKOVA, P.; HLAVAC, A.; MUTTI, P.; VODICKA, A. Influence of the OGG1 Ser326Cys polymorphism on oxidatively damaged DNA and repair activity. **Toxicol Lett**, v. 190, p. 41–47, 2009.

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. **Braz J Pharm Sci**, v. 40, 2004.

MENDES P.C.; FERREIRA D.A.; ROLDÃO A.F.; SILVA N.R. Poluição atmosférica e saúde humana na cidade de Uberlândia - MG. In: **1º Simpósio Internacional Saúde Ambiental e a Construção de Cidades Sustentáveis**, 2010.

MANNO, M.; VIAU, C.; COCKER, J. et al. Biomonitoring for occupational health risk assessment (BOHRA). **Toxicol Lett**, v. 192, p. 3-16, 2010.

MORENA, M.; CRISTOL, J.P.; BOSCH, J.Y.; TETTA, C.; FORRET, G.; LEGGER, C.L.; DELCOURT, C.; PAPOZ, L.; DESCOMPS, B.; CANAUD, B. Convective and diffusive losses of vitamin C during haemodiafiltration session: a contributive factor to oxidative stress in haemodialysis patients. **Nephrol Dial Transplant**, v. 17, p. 422-427, 2002.

NAVASUMRIT, P.; ARAYASIRI, O.M.T.; HIANG, M.; LEECHAWENGWONGS, J.; PROMVIJIT, S.; CHOONVISASE, S.; CHANTCHAEMSAI, N.; NAKNGAM, C.; MAHIDOL, M.; RUCHIRAWA, T. Potential health effects of exposure to carcinogenic compounds in incense smoke in temple workers. **Chem Biol Interact**, v. 3, p. 19-31, 2008.

NRC, NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Biological markers in environmental health research. **Environ Health Persp**, v. 74, p. 3-9, 1987.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**, Segunda edição, Editora Atheneu. São Paulo, 2008.

PERES F.F. Meio Ambiente e Saúde: os efeitos fisiológicos da poluição do ar no desempenho físico - o caso do monóxido de carbono (CO). **Arqu Movimento**, v.1, p.55-63, 2005

PEZZAGNO, G.; MAESTRI, L.; FIORENTINO, M. L. Trans, transmuconic 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.

POPE, C. A III.; BURNETT, R.T.; THUN, M.J.; CALLE, E.E.; KREWSKI, D.; ITO K.; THURSTON, G. Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long term exposure to fine particulate air pollution. **J Am Med Ass**, v. 287, p. 1132-1141, 2002.

QU, Q. et al. Validation of biomarkers in humans exposed to benzene: Urine metabolites. **Am J Ind Med**, v. 37, p. 522-531, 2000.

RUCHIRAWAT, M.; SETTACHAN, D.; NAVASUMRIT, P.; TUNTAWIROON, J.; & ATRUP, H. Assessment of potential cancer risk in children exposed to urban air pollution in Bangkok, Thailand. **Toxicol Lett**, v. 168, p. 200-209, 2007.

SAHABANA M. Les motos-taxis à Douala et leur perception par les pouvoirs publics: entre tolérance d'un secteur pourvoyeur d'emplois et de transport et volonté d'éradiquer une activité incontrôlable, 2004.

SALGADO, P. E. T., PEZZAGNO, G. Indicadores Biológicos de Exposição ao Benzeno. **Rev Bras Saúde Ocup**, 1991.

SINGH, N.P. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis. **Mutat Res**, v. 455, p. 111-127, 2000.

SCHERER, G.; RENNER, T.; MEGER, M. Analysis and evaluation of trans, trans-muconic acid as a biomarker for benzene exposure. **J Chromat**, v. 717, p. 179-199, 1998.

SCHIMID, W. The micronucleus test for cytogenetics analysis. *In: Principles and Methods for Their Detection* (ed. Hollaender, A.). **Plenum Press**, New York, v. 4, p.31-53, 1976.

SHEN, M. Association between mitochondrial DNA copy number, blood cell counts, and occupational benzene exposure. **Environ Mol Mutagen**, v. 49, p. 453-457, 2008.

SMITH, M. T. Advances in Understanding Benzene Health Effects and Susceptibility. **Annual Review of Public Health**, v. 31, p. 133-148, 2010.

SMITH, M. T. The mechanism of benzene-induced leukemia: a hypothesis and speculations on the causes of leukemia. **Environ Health Persp**, v. 104 p. 1219-1225, 1996.

SNYDER, R.; HEDLI, C. An overview of benzene metabolism. **Environ Health Persp**, v. 104, p. 1165-1171, 1996.

SNYDER, R.; WITZ, G.; GOLDSTEIN, B.D. The toxicology of benzene. **Environmental Health Perspectives**, v. 100, p. 293-306, 1993.

SUZUKI, J.; INOUE, Y.; SUZUKI, S. Changes in the urinary excretion level of 8-hydroxyguanine by exposure to reactive oxygen-generating substances. **Free Radic Biol Med**, v.18, p. 431–436, 1995.

TAKAISHI, M.; SAWADA, M.; SHIMADA, A.; SUZUKI, J.S.; SATOH, M.; NAGASE, H. Protective role of methallothionein in benzo[a]pyrene-induced DNA damage. **J Toxicol Sci**, v.34, p. 449-458, 2009.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTAMNN, A.; KOBAYASHI, H.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen**, v.35, p. 206-21, 2000.

VALAVANIDIS, A.; VLACHOGIANNI, T.; FIOTAKIS, C. 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. **J Environ Science Health**, p. 120-139, 2009.

VILLANI, P.; ALTAVISTA, P. L.; CASTALDI, L.; LETER, G.; CORDELLI, E. Analysis of DNA oxidative damage related to cell proliferation. **Mutat Res**, v.464, p. 229–237, 2000.

VILLELA, I.V.; OLIVEIRA, I.M; SILVA, J E HENRIQUES, J.A.P. DNA damage and repair in Haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) Exposed to Environmental contaminants. **Mutat Res**, v. 697, p.78-86, 2006.

VILLELA, I.V.; OLIVEIRA, I.; SILVEIRA, J.C.; DIAS, J.; HENRIQUES, J.A.P.; E SILVA, J. Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaíba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. **Mutat Res**, v. 628, p.76-86, 2007.

YOSHIOKA, N.; NAKASHIMA, H.; HOSODA, K.; EITAKI, Y.; SHIMADA, N.; OMAE, K. Combined toxic exposures and human health: biomarkers of exposure and effect. **J Occup Health**, v. 50, p.229–235, 2008.

WEISEL, C. P. Benzene exposure: An overview of monitoring methods and their findings. **Chem Biol Interact**, v. 184, p. 58-66, 2010.

WHITE, P.A.; RASMUSSEN, J.B. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface waters. **Mutat Res**, v.410, p. 223-236, 1998.

WHYSNER, J. Genotoxicity of benzene and its metabolites. **Mutat Res**, v. 566, p. 99-130, 2004.

WILBUR, S.; WOHLERS, D.; PAIKOFF, S.; KEITH, L.S.; FAROON, O. ATSDR evaluation of health effects of benzene and relevance to public health. **Toxicol Ind Health**, v. 24, p. 263-398, 2008.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Environmental Health Criteria 222. Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. World Health Organization, Geneva: WHO, 2001.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Health Organization – Biological Monitoring of Chemical Exposure in the Workplace. Volumes 1 e 2. Geneva: WHO, 1996.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Primary health care, now more than ever. World Health Organization, Geneva: WHO, 2008.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. United Nations Environment Programme, Urban air pollution in megacities of the world, Oxford, Blackwell, 1992.

WITZ, G.; ZHANG, Z.; GOLDSTEIN, B. D. Reactive ring-opened aldehyde metabolites in benzene hematotoxicity. **Environ Health Persp**, v. 104, p. 1195-1199, 1996.

WIWANITKIT, V. Classification of Risk Occupation for Benzene Exposure by Urine Trans, Trans - muconic Acid Level. **Asia Pac J Cancer Prev**, v. 6, p. 149-150, 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.

ANEXO I

Carta de aceite do artigo

Date: May 26, 2014
To: "Solange Cristina Garcia" solange.garcia@ufrgs.br
From: David Josephy djosephy@uoguelph.ca
Subject: Your Submission
Ms. Ref. No.: MUTGEN-D-14-00038R1
Title: Evaluation of genotoxicity in workers exposed to benzene and atmospheric pollutants
Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

Dear Prof. Garcia,

I am pleased to confirm that your revised paper "Evaluation of genotoxicity in workers exposed to benzene and atmospheric pollutants" has been accepted for publication in Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.

When your paper is published on ScienceDirect, you want to make sure it gets the attention it deserves. To help you get your message across, Elsevier has developed a new, free service called AudioSlides: brief, webcast-style presentations that are shown (publicly available) next to your published article. This format gives you the opportunity to explain your research in your own words and attract interest. You will receive an invitation email to create an AudioSlides presentation shortly. For more information and examples, please visit <http://www.elsevier.com/audioslides>.

Thank you for submitting your work to this journal.

With kind regards,

David Josephy, Ph.D.
Editor
Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis

ANEXO II A

Documento de aprovação no comitê de ética em pesquisa

Projetos <https://www1.ufrgs.br/PortalServidor/Pesquisa/ComissaoUnidade/form...>

Projeto Nº: 21728

Título: AVALIACAO DOS DANOS CAUSADOS PELO BENZENO NO AMBIENTE OCUPACIONAL E SUA INTER-RELACAO COM DIFERENTES BIOMARCADORES

COMITE DE ETICA EM PESQUISA DA UFRGS: Parecer

Os pesquisadores atenderam às solicitações do Comitê de Ética em Pesquisa. E o projeto está aprovado.

CEP/UFRGS

1 de 1 30/1/2012 12:11

ANEXO II B

Documento de aprovação no comitê de ética em pesquisa

<https://www1.ufrgs.br/PortalServidor/Pesquisa/>

Sistema Pesquisa - Pesquisador: Solange Cristina Garcia

Projeto Nº: 20322

Título: EXPOSICAO HUMANA A XENOBIOTICOS AMBIENTAIS E SUA INTER-RELACAO COM DANOS OXIDATIVOS E A FUNCAO CARDIOVASCULAR.

COMITE DE ETICA EM PESQUISA DA UFRGS: Parecer

Projeto aprovado, a maioria das diligências foram atendidas.

ANEXO III A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar de um estudo intitulado **“AVALIAÇÃO DOS DANOS CAUSADOS PELO BENZENO NO AMBIENTE OCUPACIONAL E SUA INTER-RELAÇÃO COM DIFERENTES BIOMARCADORES”**, que tem como objetivo avaliar os possíveis problemas causados à saúde do trabalhador através da exposição ao benzeno no posto de gasolina. Este estudo é importante para prevenção das possíveis alterações em exames de sangue, urina e material bucal coletado com escova dental.

O estudo será desenvolvido no Laboratório de Toxicologia (LATOX) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul em parceria com o Centro de Vigilância em Saúde e Centros de Referência em Saúde do Trabalhador (CERESTs).

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo são a Profa. Dra. Solange Cristina Garcia e a doutoranda Ângela Maria Moro da UFRGS. Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos pesquisadores responsáveis para esclarecimento de eventuais dúvidas, fone (51) 33085297. Além disso, a secretaria do Comitê de Ética em pesquisa da UFRGS, fone (51) 33083629, também poderá ser contatada para apresentar recursos ou reclamações em relação ao estudo.

Procedimentos a serem realizados.

Você deverá realizar coleta de sangue (cerca de 10 ml), urina (cerca de 50 ml) e material bucal coletado com escova. A presença de benzeno no ambiente de trabalho também será avaliada através de um prendedor com filtros que será colocado na gola da camisa. Além disso, você deverá responder a um questionário sobre hábitos de vida e uso de medicamentos. As amostras coletadas serão armazenadas no Laboratório de Toxicologia (LATOX), da Faculdade de Farmácia da UFRGS, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Solange Cristina Garcia. Você receberá os resultados de todos os exames laboratoriais realizados no sangue, urina e amostra bucal. A equipe médica dos CERESTs realizarão encaminhamentos, caso seja encontrada qualquer alteração.

Riscos individuais, possibilidade de exclusão e benefícios.

A coleta de sangue é um procedimento de baixo risco e desconforto, que será realizada sem nenhum custo ao voluntário. Fica claro que sua participação na pesquisa é voluntária, sendo que você poderá desistir de fazer parte do trabalho a qualquer momento, sem qualquer tipo de constrangimento, restrições ou consequências por parte dos pesquisadores. No caso de aceite, fica claro que não haverá benefício financeiro pela sua participação, nem riscos ou prejuízos à saúde.

Confidencialidade.

Os dados desta pesquisa serão disponibilizados aos Centros de Referência em Saúde do Trabalhador (CERESTs) para encaminhamento aos trabalhadores expostos ao benzeno. Além disso, os dados serão utilizados em

publicações em revistas médicas-científicas, sendo mantida em sigilo a identificação dos participantes.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas por mim, descrevendo o estudo “**AVALIAÇÃO DOS DANOS CAUSADOS PELO BENZENO NO AMBIENTE OCUPACIONAL E SUA INTER-RELAÇÃO COM DIFERENTES BIOMARCADORES**”. Concordo, voluntariamente, em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer hora, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Identificação do voluntário

Nome: _____

RG (número de identidade): _____

Assinatura do voluntário: _____

Assinatura do Responsável pelo estudo: _____

Data: _____, ____ / ____ / ____.

ANEXO III B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu,.....
fui convidado(a) pelos professores Dr. Iran Castro (FUC) e Prof.^a. Dr^a. Solange Cristina Garcia (UFRGS) a fazer parte de um trabalho científico com o título **“EXPOSIÇÃO HUMANA À XENOBIÓTICOS AMBIENTAIS E SUA INTER-RELAÇÃO COM DANOS OXIDATIVOS E A FUNÇÃO CARDIOVASCULAR”**. Neste trabalho serão realizados exames clínico-laboratoriais com o objetivo de avaliar possíveis alterações cardiovasculares através de exames laboratoriais, toxicológicos e por imagem. Além de analisar outros parâmetros que possam ser relacionados a exposição ambiental. Além destes exames serão realizadas entrevistas com questionário sobre o uso de medicamentos e o estado de saúde. Fui esclarecido que minha participação é de livre e espontânea vontade e que caso aceite, será realizada uma coleta de sangue venoso (10 mL) com o mínimo de risco já conhecido para esta técnica, sem custo para o voluntário, além de uma amostra de urina (50mL) e material bucal coletado com escova.

Estou ciente de que receberei os resultados dos exames sem custo, mas não receberei nenhuma outra forma de pagamento e que poderei desistir de fazer parte do trabalho a qualquer momento, sem qualquer tipo de constrangimento, restrições ou consequências.

Eu terei garantia da não identificação e do caráter confidencial dos resultados. Terei garantia de acesso, em qualquer etapa da pesquisa, aos profissionais responsáveis pela mesma, para esclarecimento de eventuais dúvidas sobre os procedimentos, riscos e benefícios, contatando a Prof^a. Dr^a. Solange Cristina Garcia (51) 33085297, responsável pelo projeto. Também pode contatar a secretaria do Comitê de Ética em pesquisa da UFRGS (51) 33083629 para apresentar recursos ou reclamações em relação ao estudo.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas por mim, descrevendo o estudo.

Concordo, voluntariamente, em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer hora, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

Porto Alegre, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do paciente ou responsável

Data:

Assinatura do responsável pela pesquisa

Data:

ANEXO IV A
QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO - FRENTISTAS

Data: ___/___/___

IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____
Telefone: _____
Idade: _____ Data de nascimento: ____/____/____
Etnia: _____
Entrevistador: _____

DADOS GERAIS

Função: _____

Tempo que exerce a função: _____

Número de horas diárias de permanência no trabalho? _____

Turno: (1) Manhã (2) Tarde (3) Noite

Jornada de Trabalho Semanal: _____

Função anterior: _____

Tempo que exerceu a função: _____

EQUIPAMENTOS DE PROTEÇÃO INDIVIDUAL (EPIs)

Uso de EPIs: (1) SIM (2) NÃO

Quais?

Máscaras Respiradoras ()

Óculos de Segurança: ()

Calçados de Segurança: ()

Luvas: ()

Aventais Impermeáveis: ()

DADOS DE DIAGNÓSTICO

Faz uso de medicamentos? Quais? Por quanto tempo? _____

Faz uso de Polivitamínicos? _____

Apresenta alguns destes sintomas ?

- () dor de cabeça
- () tontura
- () dor de estômago
- () dor pernas
- () irritação olhos
- () irritação nariz
- () irritação pele
- () palpitações
- () bronquite
- () falta de ar
- () rinite alérgica
- () dor coluna
- () cansaço
- () problemas auditivos
- () dor muscular
- () sonolência
- () alteração salivação
- () tremores
- () insônia
- () alteração humor
- () outros sintomas :

HÁBITOS DE VIDA

FUMO: () Nunca fumou () Fumante () Ex-fumante

Se sim, quantos cigarros por dia? ____

Com que idade começou a fumar? _____ anos

Ex-fumante

Se sim, quantos cigarros por dia? ____

Há quanto tempo parou de fumar? _____ anos ____ meses

ETILISMO

Faz uso de bebidas alcoólicas? () SIM () NÃO

Qual a freqüência, a quantidade e o tipo de bebida (por semana)? _____

Fez uso de bebidas alcoólicas nos últimos 2 dias? Qual? _____

ANEXO IV B

QUESTIONÁRIO DE AVALIAÇÃO – TAXISTAS

Nome: _____

Telefone: _____

Idade: _____ Data de nascimento: ___/___/___ Estado civil:

Endereço: _____ Bairro:

Entrevistador: _____

DADOS GERAIS

Profissão: _____

Local de Trabalho (Bairro/Ponto): _____

Tempo que exerce a função: _____

Número de horas diárias de permanência no trabalho? _____

Turno: (1) Manhã (2) Tarde (3) Noite

AVALIAÇÃO DO AMBIENTE DE TRABALHO

1. Estação do ano

() Inverno () Verão () Primavera () Outono

2. Temperatura

() Confortável () Desconfortável () Estável

3. Movimento do ar

() Muito parado () Médio () Bastante movimento

ALTERAÇÕES RESPIRATÓRIAS

Você apresenta algum sintoma crônico ou recorrente listado abaixo?

Rinites: (1) Sim (2) Não

Realiza tratamento?

Sinusites: (1) Sim (2) Não

Realiza tratamento?

Gripes, resfriados e “dores de garganta” frequentes: (1) Sim (2) Não

Tosse crônica (seca), alérgica: (1) Sim (2) Não

Pigarro pela manhã: (1) Sim (2) Não

Espirros frequentes: (1) Sim (2) Não

Coceira (nariz ou garganta): (1) Sim (2) Não

Bronquite asmática: (1) Sim (2) Não Uso de bombinhas? (1) Sim (2) Não

Pneumonias progressivas: (1) Sim (2) Não

Falta de ar aos esforços: (1) Sim (2) Não

Informações adicionais: _____

OUTRAS ALTERAÇÕES:

Apresenta algum sintoma crônico ou recorrente?

Palpitação: (1) Sim (2) Não

Dor no peito: (1) Sim (2) Não

Arritmias: (1) Sim (2) Não

diagnosticadas (episódio:.....)

Infarto: (1) Sim (2) Não

(episódio:.....)

Tonturas, escurecimento da visão: (1)Sim (2)Não
Pressão arterial alterada: (1)Sim (2)Não
Dores de cabeça: (1) Sim (2) Não
Convulsões: (1) Sim (2) Não
Perda de sensibilidade em alguma parte do corpo: (1) Sim (2) Não
Sensação de formigamento nos braços/pernas: (1) Sim (2) Não
Câimbras: (1) Sim (2) Não
Dores ou paralisias relacionadas a nervos (facial, ciático...): (1) Sim (2) Não
Diabetes Mellitus: (1) Sim (2) Não Realiza tratamento? (1) Sim (2) Não
Uso de Medicamentos (Quais e tempo de uso)? _____
Polivitamínicos? _____
Algum sintoma frequente?
Outros: _____

HISTÓRICO FAMILIAR

Hipertensão arterial: (1) Sim (2) Não
Infarto do miocárdio: (1) Sim (2) Não
Doenças do coração: (1) Sim (2) Não
Derrame cerebral: (1) Sim (2) Não
Diabetes mellitus: (1) Sim (2) Não

HÁBITOS DE VIDA

FUMO: () Nunca fumou () Fumante () Ex-fumante
Se sim, quantos cigarros por dia? ____
Com que idade começou a fumar? _____ anos
Ex-fumante
Se sim, quantos cigarros por dia? ____
Há quanto tempo parou de fumar? _____ anos ____ meses
Você mora com pessoas fumantes?(fuma dentro de casa)? (1) Sim (2) Não

ETILISMO:

Hábitos Alimentares

Alimentação Vezes/semana
Churrasco Assador: Sim () Não ()
Chimarrão
Frutas e vegetais

ATIVIDADES FÍSICAS

Pratica regularmente atividades físicas (1) Sim (2) Não
Qual atividade e com que frequência?

EXAME FÍSICO

Pressão arterial na jornada de trabalho:
Saturação de O₂: