

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz



ESCOLA NACIONAL DE SAÚDE PÚBLICA

SERGIO AROUCA

ENSP

Angélica Cardoso Pereira

Avaliação dos danos ao DNA em trabalhadores expostos cronicamente ao benzeno na cidade do Rio de Janeiro por meio do ensaio de micronúcleo

Rio de Janeiro

2019

Angélica Cardoso Pereira

Avaliação dos danos ao DNA em trabalhadores expostos cronicamente ao benzeno na cidade do Rio de Janeiro por meio do ensaio de micronúcleo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Toxicologia Ambiental.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Ariane Leites Larentis.

Coorientadores: Prof^ª. Dra. Isabele Costa Campos Amaral e Prof. Dr. Herbert Ary Sisenando.

Rio de Janeiro

2019

Título do trabalho em inglês: Evaluation of DNA damage in workers chronically exposed to benzene in the city of Rio de Janeiro using the micronucleus assay.

O presente trabalho com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Catálogo na fonte
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto de Comunicação e Informação Científica e Tecnológica em Saúde
Biblioteca de Saúde Pública

P436a Pereira, Angélica Cardoso.
Avaliação dos danos ao DNA em trabalhadores expostos cronicamente ao benzeno na cidade do Rio de Janeiro por meio do ensaio de micronúcleo / Angélica Cardoso Pereira. -- 2019.
95 f. : il. color. ; graf. ; tab.

Orientadora: Ariane Leites Larentis.
Coorientadores: Isabele Costa Campos Amaral e Herbert Ary Sisenando.

Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2019.

1. Benzeno. 2. Exposição Ambiental. 3. Testes para Micronúcleos. 4. Genotoxicidade. 5. Saúde do Trabalhador. 6. Exposição Crônica.
I. Título.

CDD – 23.ed. – 615.9511

Angélica Cardoso Pereira

Avaliação dos danos ao DNA em trabalhadores expostos cronicamente ao benzeno na cidade do Rio de Janeiro por meio do ensaio de micronúcleo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Meio Ambiente, da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca, na Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Toxicologia Ambiental.

Aprovada em 27 de Maio de 2019.

Banca Examinadora

Prof.^a Dra., Barbara Rodrigues Geraldino
Instituto Nacional do Câncer - Coordenação de Prevenção e Vigilância

Prof.^a Dra. Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos
Fundação Oswaldo Cruz – Coordenação de Comunicação Institucional

Prof.^a Dra Ariane Leites Larentis (Orientadora)
Fundação Oswaldo Cruz- Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca

Prof.^a Dra. Isabele Campos Costa-Amaral
Fundação Oswaldo Cruz – Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca

Prof. Dr. Herbert Ary Sisenando
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas

Rio de Janeiro

2019

A minha amada e querida Mãe Sonia Maria Cardoso Pereira por todo carinho, paciência, companheirismo, apoio, incentivo, cuidado e contribuição durante todos os momentos e na realização deste trabalho e pelo amor incondicional e dedicação em toda minha vida.

A minha avó Jocinéa (*in memoriam*) por todo amor incondicional e dedicação.

A minha Tia Célia por todo apoio e pelos momentos de alegria e descontração.

A grande amiga Cristiane, por sua amizade e incentivo na minha busca por conhecimento.

Aos meus estimados professores que foram essenciais em toda a minha trajetória.

Aos meus amigos pelo apoio e incentivo em todos os momentos deste estudo.

Vocês sempre estarão em meu coração!

AGRADECIMENTOS

A Deus por minha vida, meus familiares e meus amigos e pela oportunidade de concretizar este trabalho, que foi realizado com muita luta, muito amor e dedicação.

Às minhas queridas orientadoras Dra. Ariane Leites Larentis, Dra. Isabele Campos Costa-Amaral e ao meu querido orientador Dr. Herbert Ary Arzabe Antezama Costa Nóbrega Sisenando, pela dedicação e ensinamentos durante minha formação acadêmica.

Às Doutoradas Paula de Novaes Sarcinelli e Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos que foram responsáveis pelo projeto Inova.

Aos trabalhadores que participaram deste estudo, pois sem a participação deles esta dissertação não teria se concretizado e ao SINPOSPETRO-RJ pela parceria e contribuição na seleção dos postos de combustíveis e no fornecimento das informações necessárias.

À Doutora Fátima Trancoso, pela disponibilidade e contribuição no atendimento aos trabalhadores, além da sua adorável companhia nos dias de trabalho de campo.

Aos amigos de longa jornada, Marcus Vinicius, Victor Oliva, Rafaela, Karina, Danielle, Natan, Felipe, Nuria, Larissa, e Juliana Amazonas, que estiveram sempre ao meu lado acompanhando meu crescimento profissional e tornaram esta longa e difícil caminhada, divertida, amena e prazerosa.

Aos amigos do IFRJ Realengo que eu trouxe para a vida, Aline, Breno, Carol, Cristiane, Tatiana, Thamires, Nathalia e Maria Olívia.

Aos amigos do Laboratório de Toxicologia do CESTEJ, em especial aos do Setor de Indicadores de Efeito e Solventes, Leandro, Vinício, Daniel, Victor, Marcus Vinicius, Mariana Senna, Daniel (PROVOC), Juliana Mendonça, Sandra, Eline e Renato, por toda ajuda e apoio na realização do nosso projeto de pesquisa. Aos funcionários do Ambulatório que proporcionaram o acolhimento dos trabalhadores e possibilitaram a realização da avaliação clínica e ao amigo Mário, por todo trabalho e cuidado com nossas vidrarias.

Não te deixes destruir...
Ajuntando novas pedras
e construindo novos poemas.
Recria tua vida, sempre, sempre.
Remove pedras e planta roseiras e faz doces. Recomeça.
Faz de tua vida mesquinha
um poema.
E viverás no coração dos jovens
e na memória das gerações que hão de vir.
Esta fonte é para uso de todos os sedentos.
Toma a tua parte.
Vem a estas páginas
e não entres seu uso
aos que têm sede.
(Cora Coralina)

RESUMO

No contexto da saúde ocupacional e da vulnerabilidade ambiental, as exposições a compostos químicos ganham cada vez mais destaque e constituem grande preocupação no âmbito nacional e internacional. Através de biomarcadores, é possível identificar e quantificar substâncias danosas à saúde e seus efeitos deletérios. Dentre as substâncias sabidamente nocivas à saúde é possível destacar o benzeno, um composto hematotóxico e comprovadamente carcinogênico a seres humanos e que não apresenta níveis seguros de exposição no ambiente. O presente estudo avaliou os danos ao DNA, em dois grupos de trabalhadores expostos a baixas concentrações de benzeno, através do uso da técnica de micronúcleo (MN) em células epiteliais da mucosa bucal. O projeto integrador foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da ENSP/FIOCRUZ parecer 434418 (de 25/10/2013) e CAEE 17438013.5.000.5240. A população deste estudo foi 86 trabalhadores sendo, 51 trabalhadores de postos de distribuição de combustíveis (grupo I) e 35 trabalhadores de vigilância patrimonial da DIRAC/FIOCRUZ (grupo II). Foram aplicados dois questionários para avaliar os dados sociodemográficos e histórico ocupacional; coleta de amostras de ar para determinar a concentração de benzeno no ar atmosférico ambiental; coleta de amostras de sangue para realizar hemograma e avaliação clínica; coleta de amostra de urina para avaliar os biomarcadores de exposição ácido *trans,trans*-mucônico (ATTM) e ácido *S*-fenilmercaptúrico (S-FMA) e coleta de células da mucosa bucal para avaliar o biomarcador de efeito genotóxico ensaio de MN. As avaliações ambientais identificaram concentrações de benzeno no ar atmosférico (<1ppm) e caracterizaram uma maior oscilação de concentrações de benzeno nos locais de trabalho no grupo I. O ATTM e o S-FMA apresentaram valores semelhantes nos dois grupos. Nenhuma diferença clínica foi encontrada entre os grupos avaliados. Entretanto, 15% (n = 13) dos trabalhadores apresentaram resultados de leucócitos menores que 4.500 células/mm³. A análise do MN não apresentou diferença significativa entre as populações (p>0,05), entretanto, outras anomalias nucleares, como a presença de células com broto nuclear (BEC) e células binucleadas (BN) apresentaram uma frequência aumentada nas duas populações estudadas. Demonstrando os possíveis efeitos no DNA causado pela exposição a baixas concentrações de benzeno. Ambas as populações se apresentaram expostas cronicamente. O grupo I foi submetido a momentos de alta exposição durante suas atividades laborais, o que caracteriza um maior risco de alterações nucleares e, probabilidade, de adoecimento devido à exposição ao benzeno.

Palavras-chave: Benzeno; Exposição crônica; Micronúcleo; Genotoxicidade; Saúde Ocupacional.

ABSTRACT

In the context of occupational health and environmental vulnerability, exposures to chemical compounds are gaining more and more prominence and constitute a major concern at the national and international levels. Substances known to be dangerous to health as benzene, a hematotoxic compound that is proven to be carcinogenic to humans and which does not present safe levels of exposure in the environment. The present study evaluated DNA damage in two groups of workers exposed to low concentrations of benzene, using the micronucleus (MN) technique in epithelial cells of the oral mucosa. The integrative project was approved by the research ethics committee of ENSP/ FIOCRUZ opinion 434418 (of 25/ 10/ 2013) and CAEE 17438013.5.000.5240. The population of this study was 86 workers, 51 were gas station workers (group I) and 35 were DIRAC/ FIOCRUZ property surveillance workers (group II). Two questionnaires were applied to evaluate sociodemographic data and occupational history; collection of air samples to determine the concentration of benzene in ambient atmospheric air; collection of blood samples for clinical evaluation; Urine sample collection for biomarkers of exposure trans, trans-muonic acid (ATTM) and S-phenylmercapturic acid (S-FMA) and collection of oral mucosal cells to evaluate the biomarker of genotoxic effect MN assay. Environmental assessments identified benzene concentrations in atmospheric air <1ppm and characterized a greater oscillation of benzene concentrations in workplaces in group I. ATTM and S-FMA showed similar values in the two groups. No clinical difference was found between the evaluated groups. However, 15% (n = 13) of the workers had leukocyte results below 4,500 cells/mm³. The MN analysis showed no significant difference between populations (p>0.05), but other nuclear anomalies, such as the presence of cells with nuclear bud (BEC) and binucleated cells (BN) showed an increased frequency in both populations. studied. Demonstrating the possible effects on genetic material caused by exposure to low concentrations of benzene. Both populations were chronically exposed to benzene, with group I subjected to moments of high exposure during the exercise of their work activities, characterizing a greater risk of nuclear alterations and, possibly, illness.

Keywords: Benzene; Chronic exposure; Micronucleus; Genotoxicity; Occupational Health.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema representativo do metabolismo hepático do Benzeno.....	21
Figura 2 - Esquema representativo da formação de mn na anáfase.....	27
Figura 3 - Diagramas das seleções dos grupos de trabalhadores I e II expostos ao Benzeno.....	34
Quadro 1- Tipos de células bucais observáveis ao microscópio óptico.....	40
Quadro 2- Artigos sobre avaliação da exposição ao benzeno em trabalhadores de postos de combustíveis.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização dos grupos de trabalhadores I e II expostos a baixas concentrações de benzeno de acordo com as variáveis sociodemográficas e de fatores de risco.	42
Tabela 2 - Resultados da avaliação ambiental e biológica da exposição dos grupos de trabalhadores I e II.	44
Tabela 3 - Resultados hematológicos da avaliação clínica dos grupos de trabalhadores I e II expostos ao benzeno.	45
Tabela 4 - Resultados do biomarcador de efeito genotóxico MN dos grupos de trabalhadores I e II expostos ao benzeno.....	46
Tabela 5 - Resultados da associação entre o biomarcador de efeito genotóxico MN por idade, sexo, tempo de trabalho na atual ocupação, tabagismo e grupo de trabalhadores.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Aberrações Cromossômicas
ACGIH	Association Advancing Occupational and Environmental Health
ANP	Agência Nacional do Petróleo
AP	Área Programática
ATTM	Ácido <i>Trans,Trans</i> Mucônico
ATTM-U	Ácido <i>Trans,Trans</i> Mucônico Urinário
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BEC	Broto Nuclear ou Broken egg
BN	Binucleadas
BTEX	Benzeno, Xileno, Etilbenzeno e Xileno
CEREST	Centro de Referência em Saúde do Trabalhador
CESTEH	Centro de Estudos de Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CNPBz	Comissão Nacional Permanente do Benzeno
CYP	Citocromo 450
CYP2E1	Citocromo 2E1
DIRAC	Diretoria de Administração do Campus
DNA	Deoxyribonucleic Acid (ácido desoxirribonucleico)
EC	Ensaio Cometa
ENSP	Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca
ERRO	Espécie Reativa de Oxigênio
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GST	Glutathione S-Transferase
HPLC	High Performance liquid chromatography
IARC	International Agency for Research on Cancer
INEA	Instituto Estadual do Ambiente
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
MN	Micronúcleo
NIOSH	National Institute for Occupational Safety and Health
OMS	Organização Mundial de Saúde

PCR	Posto de Revenda de Combustível
RJ	Rio de Janeiro
SINPROSPETRO-RJ	Sindicato dos Empregados de Postos de Combustíveis e Derivados de Petróleo do Estado do Rio de Janeiro
SF	Solução Fisiológica
S-FMA	S-fenilmercaptúrico, Ácido.
SNC	Sistema Nervoso Central
SMD	Síndromes Mielodisplásias
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UV-VIS	Ultravioleta Visível
WHO	World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{g}/\text{m}^3$	Micrograma por metro cúbico
mg/l	Miligrama por litro
<	Menor
>	Maior
ppb	Parte por bilhão
ppm	Parte por milhão
rpm	Rotações por minuto
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	BENZENO.....	18
2.1.1	Toxicocinética	19
2.1.2	Toxicodinâmica	24
2.1.3	Aspectos clínicos da toxicidade por benzeno e efeitos à saúde	25
2.2	ENSAIO DE MICRONÚCLEO EM CÉLULAS DA MUCOSA ORAL.....	25
3	JUSTIFICATIVA	30
4	OBJETIVOS	32
4.1	OBJETIVO GERAL.....	32
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
5	MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1	POPULAÇÃO.....	33
5.1.1	Avaliação sócio demográfica e clínica	35
5.2	AVALIAÇÃO AMBIENTAL.....	35
5.2.1	Quantificação do Benzeno no ar atmosférico	35
5.3	AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO E DE EFEITO.....	36
5.3.1	Determinação de ácido trans-trans mucônico urinário (ATTM)	36
5.3.2	Determinação do ácido S-fenilmercaptúrico urinário (S-FMA)	37
5.3.3	Ensaio do Micronúcleo (MN)	37
5.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
5.5	ASPECTOS ÉTICOS.....	39
6	RESULTADOS	40
6.1	IMPLEMENTAÇÃO DA TÉCNICA DE MN EM CÉLULAS DA MUCOSA ORAL.....	40
6.2	AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE MN.....	42
7	DISCUSSÃO	52
8	CONCLUSÃO	59
	REFERÊNCIAS	60
	ANEXO A –TERMO DE CONCENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	70
	ANEXO B –QUESTIONÁRIO INDIVIDUAL	74
	ANEXO C –ARTIGO	82

1. INTRODUÇÃO

De acordo com o Ministério de Minas e Energia, de todos os produtos derivados da destilação do petróleo, o óleo diesel e a gasolina são os mais solicitados em termos de consumo de meio de transporte no Brasil. A gasolina está associada à presença de hidrocarbonetos aromáticos mais leves, como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX). Esses hidrocarbonetos aromáticos se destacam dentre os principais componentes dos combustíveis fósseis, pois apresentam grande estabilidade em suas ligações químicas. (MME, 2014)

Os BTEX são mais solúveis e mais tóxicos dentre os demais compostos aromáticos presentes, agindo como poderosos depressores do sistema nervoso central e apresentando toxicidade crônica, mesmo em pequenas concentrações, da ordem de partes por bilhão (ppb), sendo o benzeno, um composto de grande relevância, devido às suas propriedades carcinogênicas (TSITOU *et al.*, 2015).

Dentre os efeitos, à saúde humana, causados pela exposição ao benzeno destacam-se as displasias, Síndromes Mielodisplásticas (SMD) e Leucemia Mielóide Aguda (LMA). Evidências indicam que os metabólitos do benzeno podem interferir no ciclo celular, bem como, induzir a apoptose de células precursoras do sistema hematopoiético, além de gerar importantes alterações nas vias de sinalização celular do mesmo, culminando em citotoxicidade (WHO, 2000; YOON *et al.*, 2001; ACGIH, 2003; HAYS *et al.*, 2012; TUNSARINGKARN *et al.*, 2012; TSITOU *et al.*, 2015, LOOMIS *et al.*, 2017; IARC, 2018).

Apesar dos esforços de regulação das emissões do benzeno, um elevado número de trabalhadores continua sendo exposto a diversas situações precárias, especialmente nos ambientes de postos revendedores de combustíveis (PRC) (MOURA-CORREA, 2014; COSTA-AMARAL, 2017). A população em geral também sofre exposição ambiental devido à volatilização dos solventes na gasolina, advinda tanto dos postos de combustíveis, durante o abastecimento de tanques e veículos, quanto das emissões veiculares o que, por conseguinte, gera uma difusão universal. Essas emissões são fontes representativas, principalmente, se for considerada a população residente no entorno de determinadas indústrias e postos de combustíveis (MOURA-CORREA, LARENTIS, 2017; COSTA-AMARAL, 2017).

Mesmo o benzeno presente em concentrações menores que 1% e em outros produtos acabados, o estímulo ao consumo de combustíveis fósseis provenientes da cadeia produtiva do petróleo, como política de desenvolvimento econômico, faz com que a

exposição ao benzeno, a partir da gasolina, tome grandes proporções no âmbito da saúde ambiental e ocupacional (ANP, 2001; COSTA-AMARAL *et al.*, 2017).

De acordo com o anexo 13-A da NR-15, referente às atividades e operações insalubres, regulamenta ações, atribuições e procedimentos de prevenção à exposição ocupacional ao benzeno, o Valor de Referência Tecnológico estabelecido é de 1 ppm ($3,19 \text{ mg.m}^{-3}$). A introdução dos PRCs ao marco legal normativo relativo à exposição ao benzeno é uma discussão recente, que envolve posições diversas sobre a necessidade de aplicação dessas leis nesse ramo produtivo, além das especificidades do processo de trabalho, assim como a adequação dos processos de monitoramento ambiental e biológico (MENDES *et al.*, 2017). Com isso, a Norma Regulamentadora 9 (NR 9) de 2016 estabelece os requisitos mínimos de segurança e saúde no trabalho para as atividades com exposição ocupacional ao benzeno em PRC (BRASIL, 2016 ; MENDES *et al.*, 2017).

No Brasil, de acordo com Moura-Correa e colaboradores (2014), a exposição ocupacional ao benzeno vinculada a PRC, atingiu 184.733 frentistas distribuídos em 39.450 PRC em todo o país, tais dados foram registrados pelo Censo realizado em 2010. Dados da ANP, referentes ao ano de 2017, refletem que o número de PRC em atividade em todo o país aumentou para 42.039 PRC, sendo 16.278 PRC somente na região sudeste.

É importante ressaltar que, além das emissões relacionadas à queima dos combustíveis fósseis estarem historicamente associadas à poluição atmosférica, as instalações dos sistemas de armazenagem subterrâneos de combustíveis, da mesma forma configuram situações capazes de gerar contaminações ambientais, urbanas e ocupacionais, em função de possíveis vazamentos nos tanques de armazenamento ou tubulações, bem como derramamentos produzidos por acidentes no transporte e manuseio destes produtos, gerando assim, uma grande preocupação das autoridades responsáveis (OSTERREICHER-CUNHA *et al.*, 2004; OKUMURA & STRADIOTTO, 2007; TUNSARINGKARN *et al.*, 2012). Os registros de áreas ambientais contaminadas apontam os PRC como um dos principais causadores de contaminação no país, o que legitima a preocupação das autoridades nacionais e da sociedade em geral (INEA, 2013).

Dados divulgados pelo Instituto Estadual do Ambiente (INEA) do Estado do Rio de Janeiro, no ano de 2013, trazem informações do monitoramento de 160 áreas contaminadas por indústrias e PRC. De acordo com Gouveia e colaboradores (2007), esse problema ainda não é tratado, pelas autoridades, de maneira organizada e a situação fica ainda mais preocupante quando essa contaminação está relacionada aos efeitos à saúde humana, decorrentes da exposição crônica aos solventes constituintes da gasolina. É importante

destacar que o Decreto nº 6.514 do ano de 2008, que regulamentou a Lei Federal 9.605/1998, referencia a contaminação ambiental como sendo crime ambiental federal, responsável pela definição das infrações. Muitas dessas legislações relacionam-se às medidas preventivas de acidente e/ou ao impacto do processo produtivo sobre o meio ambiente, com base no cumprimento de dispositivos legais. (MENDES *et al.*, 2017)

As atividades laborais desenvolvidas nos PRC englobam processos de trabalho diversos, como por exemplo, recebimento de caminhão-tanque, abastecimento, troca de óleo, lavagem de veículo, análise de amostras-controle da gasolina, revenda de mercadorias diversas, entre outras, o que evidencia a necessidade de medidas de gestão ambiental e ocupacional, com o objetivo de evitar que ocorram impactos ao meio ambiente, à saúde do trabalhador e da população do entorno (MENDES *et al.*, 2017)

A vigilância da saúde de trabalhadores expostos aos compostos químicos, enquanto determinante das preocupações preventivas, preconiza o planejamento e a realização do monitoramento ambiental e biológico, por meio da utilização e aplicação dos biomarcadores (CARVALHO *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2017). Dentre os biomarcadores encontram-se os de genotoxicidade que analisam o dano no material genético está submetido quando em contato com xenobióticos ou com seus metabólicos tóxicos, através da avaliação de mutação gênica, dano cromossômico ou lesão no DNA. Dentre os ensaios genotóxicos utilizados estão: aberrações cromossômicas (AC), troca de cromátides irmãs, mutações pontuais e oncogênicas, ensaio cometa (EC) e micronúcleos (MN), sendo este último utilizado para avaliar lesões no DNA e o perfil de morte celular devido à exposição a agentes genotóxicos. Nesse contexto, a utilização de biomarcadores de genotoxicidade associados aos biomarcadores de exposição, constituiu uma estratégia utilizada em estudos científicos que avalia diversos tipos de exposição (MORO *et al.*, 2013; COLLINS & AZQUETA, 2012b; HAYS *et al.*, 2012; RIBEIRO, 2003; COSTA-AMARAL *et al.*, 2017; VALENTE *et al.*, 2017).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

No panorama da globalização, é possível observar um incremento na produção industrial provocando um aumento de novas tecnologias e processos produtivos, que gera um grande impacto nas formas de trabalho, saúde e ambiente. Para a grande maioria dos trabalhadores de países emergentes, o livre comércio acompanhou a transferência de processos de trabalho e produtos, muitas vezes já abolidos nos países centrais, que oferecem potenciais riscos de desenvolvimento de várias doenças difíceis de serem reconhecidas e correlacionadas com a atividade ocupacional (COSTA, 2009).

O mundo moderno encontra-se cada vez mais refém do petróleo e de seus derivados para a manutenção de suas atividades industriais. Durante a exploração, o refino, o transporte e o armazenamento do petróleo e/ou de seus derivados, há o risco de derramamentos acidentais que podem ocasionar a contaminação de solos, rios, e vêm despertando o interesse de pesquisadores. O petróleo é uma mistura complexa que contém vários compostos, sendo que os hidrocarbonetos representam a fração majoritária. Os hidrocarbonetos monoaromáticos, cujas estruturas moleculares possuem como característica principal a presença do anel benzênico, são utilizados, principalmente, em solventes e em combustíveis sendo os constituintes mais solúveis na fração da gasolina. Esses compostos aromáticos são tóxicos ao meio ambiente e aos seres humanos, pois atuam como depressores do sistema nervoso central e geram toxicidade crônica. Sendo assim, os hidrocarbonetos aromáticos constituem um grande problema, não somente no Brasil, mas em todo o mundo (ANDRADE *et al.*, 2010).

A gasolina é uma mistura complexa contendo cerca de 150 a 200 hidrocarbonetos, entre C5 a C12, e dentre os hidrocarbonetos aromáticos está presente o benzeno, um composto que apresenta grande relevância toxicológica e carcinogenicidade (COSTA-AMARAL *et al.*, 2017). O benzeno é um composto reconhecidamente tóxico e, por isso, pode ser considerado como o agente mais preocupante no que se refere à saúde pública, além de ser um contaminante ambiental importante (ANDRADE *et al.*, 2010). Segundo a Agência Internacional de Pesquisa de Câncer (International Agency for Research on Cancer – IARC), órgão pertencente à Organização Mundial da Saúde (OMS), o benzeno é classificado como sendo do Grupo IA, ou seja, substância comprovadamente carcinogênica para seres humanos (IARC, 1982, 2018; ANDRADE *et al.*, 2010; LOOMIS *et al.*, 2017).

Desta forma, fica evidente o papel de destaque do benzeno como um dos principais compostos de relevância toxicológica, tendo em vista seus efeitos à saúde humana, como SMD que pode progredir para uma LMA, principalmente, ao seu efeito carcinogênico.

(WHO, 2000; ANP, 2001; ACGIH, 2003; TUNSARINGKARN *et al.*, 2012; TSITOU *et al.*, 2015; LOOMIS *et al.*, 2017). Assim sendo, mesmo que o benzeno esteja em concentrações menores que 1% na gasolina, como o estabelecido pela Resolução nº 40, de 25 de outubro de 2013 da Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), o estímulo ao consumo de combustíveis fósseis oriundos da cadeia produtiva do petróleo, como política de desenvolvimento econômico, faz com que a exposição ao benzeno, a partir da gasolina, ganhe grandes proporções no âmbito da saúde ambiental e ocupacional (ANP, 2000; ANP, 2013; COSTA-AMARAL, 2017; MENDES *et al.*, 2017).

2.1. BENZENO

O benzeno foi descoberto e isolado a partir de alcatrão de carvão em torno dos anos de 1800. Hoje, a principal fonte produtora de benzeno é o petróleo. Desde então, diversas indústrias utilizam o benzeno nos processos produtivos de outros produtos químicos, como estireno, cumeno (para várias resinas) e ciclo-hexano (para fibras de nylon e sintéticas), sendo também utilizado na fabricação de borrachas, lubrificantes, corantes, detergentes, drogas e pesticidas e considerado a sexta substância mais tóxica (ATSDR, 2007, 2015).

Por meio de fontes antropogênicas, os níveis de benzeno no ar podem ser elevados por emissões de queima de carvão, de óleo diesel, da exaustão de veículos automotores e da evaporação advinda dos PRC. Os PRC se destacam nos contextos político e econômico e a poluição causada pelo petróleo e seus derivados tem sido um dos principais problemas ao meio ambiente, o que torna evidente a necessidade de haver mudanças na sociedade, por busca de padrões ambientais adequados (ATSDR, 2007; ANDRADE *et al.*, 2010).

Vapores de benzeno são normalmente gerados na cadeia produtiva da gasolina, desde o refino do petróleo ao seu uso, bem como em outros processos químicos industriais, estando presente no ar com uma média global de $6\mu\text{g}/\text{m}^3$. Na maioria dos casos, esse nível é superior em ambientes fechados, especialmente em casas com garagens acopladas e habitadas por fumantes, tornando este compartimento ambiental o de maior interesse nos estudos toxicológicos (ATSDR, 2001). Fumantes ativos ou passivos apresentam grande exposição ao benzeno, chegando a apresentar 10-20 vezes mais benzeno no ar exalado quando comparado aos não fumantes, o que representa até 90% da exposição de tal grupo a esse agente tóxico (GORDON *et al.*, 2002).

Tendo em vista as características físico-químicas do benzeno no ambiente (volatilidade, lipofilicidade, apolaridade, solubilidade moderada em água, elevada mobilidade no solo), o mesmo encontra-se presente, em maior parte, no ar atmosférico. A

parte majoritária do benzeno liberada no solo volatiliza-se ou infiltra-se nos corpos aquáticos, de superfície ou subterrâneos, de onde também pode migrar para o ar, havendo retenção de apenas uma pequena fração. Ademais, os corpos aquáticos e o solo recebem o benzeno, em grande parte de efluentes industriais tratados e não tratados e de vazamentos de combustíveis fósseis. Sendo assim o benzeno pode ser encontrado nos lençóis freáticos e em sedimentos de rios em áreas de influência de atividades que abranjam este contaminante (ATSDR, 2007; MARCHETTI, 2009).

2.1.1. Toxicocinética

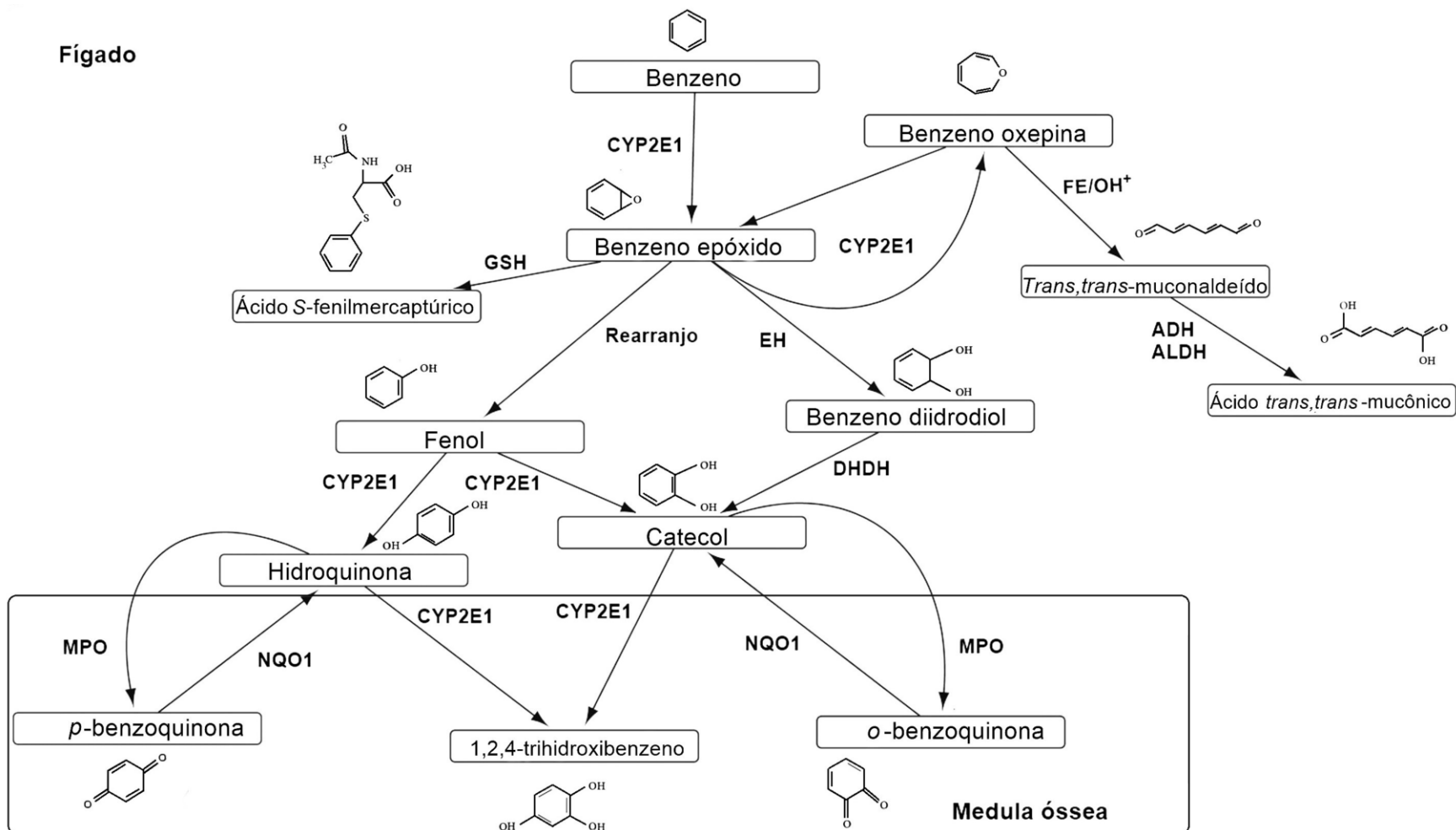
As principais vias de absorção do benzeno são inalatória e oral, sendo que a maior parte do solvente, quando inalado, eliminada pela expiração. Entretanto, também pode haver absorção por via cutânea, especialmente, na forma líquida. O benzeno inalado chega rapidamente aos pulmões e cerca de 50% dessa quantidade é absorvida. Já o contato da pele com o benzeno promove a absorção de pequenas quantidades dessa substância, enquanto quase a totalidade do benzeno ingerido é absorvida pelo trato gastrointestinal. Após absorção nas diferentes vias, o benzeno chega à corrente sanguínea, de onde é distribuído para todo o organismo. Uma parte do benzeno absorvido acumula-se, preferencialmente, em tecidos com alto teor de lipídios, devido à sua lipofilicidade, sendo armazenado, principalmente, nos tecidos gordurosos como fígado, baço e medula óssea (WHO, 1993; BARATA-SILVA *et al.*, 2014; CORREIA, 2018).

A figura 1 ilustra o metabolismo do benzeno conhecido até então. A metabolização primária do benzeno ocorre, principalmente, por via hepática e a excreção de seus metabólitos ocorre por via urinária (WHO, 1993). A primeira etapa do metabolismo do benzeno é a sua oxidação a óxido de benzeno intermediário, catalizada pelo citocromo P450 (CYP) 2E1 e pelo o CYP2B4 (que possui atividade e eficiência menores que o CYP2E1). O óxido de benzeno entra em equilíbrio com o benzeno oxepino intermediário (ou a oxepina), que pode sofrer rearranjo não enzimático gerando fenol; hidrólise formando o dihidrodio; abertura de anel aromático produzindo *ácido trans, trans-mucônico* (ATTM-U) (possivelmente através do intermediário *trans,trans-muconaldeído*); ou reagir com a glutathione S-transferase (GST) gerando um conjugado do ácido pré-mercaptúrico que posteriormente é biotransformado em ácido S-fenil mercaptúrio (S-FMA) (ARNOLD *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2017).

O principal órgão envolvido no metabolismo do benzeno é o fígado, entretanto, em caso de exposição por inalação, o metabolismo também ocorre nos pulmões, porém a

concentração pulmonar de CYP2E1 é menor que a concentração hepática. A medula é o órgão alvo da toxicidade específica do benzeno (FONSECA *et al.*, 2017). Assim sendo, os metabólitos expressam sua toxicidade característica na medula óssea, ocorrendo a biotransformação do benzeno em metabólitos tóxicos como, por exemplo, catecóis e benzoquinonas, aos quais são atribuídos os efeitos deletérios do benzeno à saúde.

Figura 1 - Esquema representativo do metabolismo hepático do benzeno.

Fonte: SANTOS *et al.* (2017).

Estima-se que a maior parte desses metabólitos do benzeno seja excretada pela urina em até 48h após a exposição (BRASIL, 2006; ATSDR, 2007). A exposição ao benzeno ocorre, sobretudo, pela via inalatória, entretanto pode ser monitorada pelos níveis do metabólito citotóxico *ácido trans, trans-mucônico* (ATTM-U), em urina, para níveis de exposição abaixo de 1 ppm. No entanto, o principal mecanismo de ação responsável pelo efeito carcinogênico do benzeno ainda é desconhecido, apesar de ser esperado que ligações covalentes às proteínas sanguíneas aconteçam (WEISEL, 2010).

Assim sendo, tendo em vista que os valores de referência para exposição ocupacional ao benzeno são de até 1 ppm, os biomarcadores de exposição *ácido trans,trans-mucônico* e *ácido S-fenilmercaptúrico* (S-FMA) urinários são mais indicados, pois apresentam tempos de meia-vida de aproximadamente 5 e 9 horas, respectivamente. Entretanto, uma das maiores limitações da utilização do *ácido trans,trans-mucônico* como biomarcador de exposição do benzeno é sua especificidade, já que o consumo de ácido sórbico por meio da ingestão de alimentos processados (como enlatados, iogurte, queijos e vinhos), após metabolização, também produz o *ácido trans,trans-mucônico*. Assim sendo, mesmo que apenas 0,12 a 0,18% do ácido sórbico oriundo da dieta seja absorvido pelo organismo humano, e excretado por via urinária como *ácido trans,trans-mucônico*. Isso pode gerar um fator de confundimento na avaliação do *ácido trans,trans-mucônico* em não fumantes expostos a baixas concentrações de benzeno e com uma dieta de aproximadamente 500 mg ao dia (SANTOS *et al.*, 2017).

2.1.2. Toxicodinâmica

O benzeno é um irritante de mucosas, como olhos, nariz, pele e garganta. Dependendo da quantidade absorvida, ele pode provocar diversos sinais e sintomas. Além disso, em longo prazo o benzeno pode provocar alterações na medula óssea e no sangue, levando à anemia, hemorragias, leucopenia e outros danos no sistema imunológico (BRASIL, 2006).

A toxicidade crônica manifestada na exposição ao benzeno se caracteriza por um impacto orgânico múltiplo, cujo comprometimento da medula óssea é o achado mais frequente e significativo, tornando-se a causa básica de diversas alterações hematológicas. A dimensão dos danos causados por contaminação pelo benzeno vem sendo reiteradamente legitimada, do mesmo modo que as formas graves de adoecimento e suas evidências relacionadas às exposições a concentrações muito baixas de benzeno (ARCURI *et al.*, 2012; FONSECA *et al.*, 2017).

O mecanismo de ação de toxicidade hematopoiética do benzeno é em grande parte desconhecido, tanto no que se refere ao desenvolvimento de citopenias periféricas, quanto no processo leucogênico da LMA (MEEK & KLAUNIG, 2010; HAYS *et al.*, 2012). Entretanto, Meek & Klaunig (2010) descreveram uma etapa crítica que incluiu um necessário dano oxidativo adicional ao DNA e às macromoléculas celulares importantes, relacionado à exposição ao benzeno, dano este que induz a mutações e a proliferação clonal das células mutadas. Evidências indicam que os metabólitos do benzeno podem interferir no ciclo celular, bem como, induzir a apoptose de células precursoras do sistema hematopoiético, além de gerar importantes alterações nas vias de sinalização celular do mesmo, culminando em citotoxicidade. Com isso, espécies reativas de oxigênio (ERO), por intermédio de danos oxidativos no DNA (quebras, adutos), parecem estar associadas à exposição ao benzeno e ao aparecimento de seus efeitos, tornando-se necessária a utilização de indicadores sensíveis e precoces, para o monitoramento biológico de populações expostas. (YOON *et al.*, 2001; HAYS *et al.*, 2012; COSTA-AMARAL *et al.*, 2017).

A mecanística pela qual o benzeno provoca sua toxicidade ainda não é completamente compreendida. Entretanto, o que se sabe é que o benzeno precisa ser metabolizado para gerar toxicidade, pois uma vez metabolizado são geradas uma série de espécies reativas (óxido de benzeno, benzoquinonas, muconaldeídos e benzol diolépoído) e moléculas mais estáveis que são excretadas na urina (RAPAPPORT *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2017).

2.1.3. Aspectos clínicos da toxicidade por benzeno e efeitos à saúde

O termo benzenismo corresponde ao conjunto de sinais e sintomas, decorrentes da exposição ao benzeno e seu diagnóstico de natureza ocupacional, é eminentemente clínico e epidemiológico, fundamentado na história de exposição ocupacional e na observação de sinais e sintomas clínicos e laboratoriais (BRASIL, 2006).

Os principais efeitos tóxicos do benzeno sobre a saúde humana são decorrentes de sua ação mutagênica e carcinogênica. Os sinais e sintomas manifestados na intoxicação aguda são em decorrência da ação do benzeno sobre o sistema nervoso central (SNC) causando, de acordo com a quantidade absorvida, narcose e excitação seguida de outros diversos sintomas. Além disso, o benzeno é um irritante moderado de mucosas respiratórias e oculares, e quando aspirado em altas concentrações, pode ocasionar edema pulmonar. Estudos em modelo animal sugerem que há uma redução da atividade elétrica

do cérebro, o que gera a perda de reflexos, tremores, narcose e morte (ARCURI *et al.*, 2011; MENDES *et al.*, 2017).

A exposição crônica pode ser observada através de estudos de toxicidade crônica que visam determinar o efeito tóxico da substância em teste após a exposição por tempo prolongado a doses cumulativas. Tais estudos também possibilitam a observação da carcinogenicidade causada pela substância (OGA; CAMARGO; BATISTUZZO, 2008).

A carcinogenicidade do benzeno está bem documentada em trabalhadores expostos, onde estudos epidemiológicos e relatos de casos fornecem evidências claras da existência de uma relação causal entre exposição ocupacional ao benzeno e aos solventes contendo benzeno com a ocorrência de LMA. O benzeno, por ser facilmente absorvido, distribuído e metabolizado, produz uma série de metabólitos eletrofílicos de caráter hematotóxico, tendo como uma das consequências o seu efeito carcinogênico, como discutido na Monografia do Benzeno, volume 120 *IARC Monographs*. (MOURRA-CORREA; LARENTIS, 2017; LOOMIS *et al.*, 2017).

Os estudos epidemiológicos populacionais, geralmente, são limitados pela existência de fatores de confundimento nas exposições químicas e / ou problemas metodológicos, que incluem falta de monitoramento adequado da exposição e baixo poder estatístico, entretanto em diversos estudos há um risco excessivo e consistente de leucemia o que indica o benzeno como o fator causal. Dados de humanos e animais, *in vivo e in vitro*, indicam que o benzeno e/ou seus metabólitos são genotóxicos, e aberrações cromossômicas (hipo e hiperdiploidia, deleções, quebras e lacunas) em linfócitos periféricos e células da medula óssea são os efeitos predominantemente observados em humanos. Além disso, sabe-se que danos aos componentes humoral e celular do sistema imune ocorrem em humanos após exposição por inalação. Isto ocorre devido à diminuição dos níveis de anticorpos e dos níveis de leucócitos em trabalhadores expostos. Dados de animais corroboram com tais achados (ATSDR, 2015).

O efeito sistêmico mais característico da exposição crônica, ao benzeno é a interrupção do desenvolvimento das células sanguíneas. Os biomarcadores precoces da exposição a níveis relativamente baixos de benzeno incluem diminuição de um ou mais tipos de células sanguíneas circulantes. A toxicidade da exposição ao benzeno apresenta um quadro clínico que se caracteriza por uma repercussão orgânica múltipla, onde a causa básica de diversas alterações hematológicas é o comprometimento da medula óssea. Um achado clínico, recorrente e significativo, na hematotoxicidade causada pelo benzeno é a citopenia, que consiste na diminuição de vários elementos celulares circulantes no sangue

que se manifesta como anemia, leucopenia ou trombocitopenia em humanos e também pode ser observada em animais. As citopenias associadas ao benzeno variam de citopenias unicelulares (um tipo celular) a pancitopenia (os três tipos celulares do sangue). A magnitude dos danos provocados pela exposição ao benzeno vem sendo comprovada reiteradamente, o que também acontece com as evidências de formas graves de adoecimento com exposições a concentrações muito baixas de benzeno (ARCURI *et al.*, 2012; ATSDR, 2015; FONSECA *et al.*, 2017).

Fonseca e colaboradores (2017) destacaram que estudos realizados no Brasil com trabalhadores expostos ao benzeno já destacavam a ocorrência de sinais e sintomas como astenia, tontura, sonolência, dores musculares, além de infecções de repetição, frequentemente, relacionados à exposição ao benzeno. Entre as informações laboratoriais de origem hematológica mais importantes, destacam-se leucopenia e demais citopenias, macrocitose, pontilhado basófilo, pseudo Pelger e plaquetopenia, leucopenia com neutropenia e, aparecendo com menor frequência, a plaquetopenia isolada ou associada à neutropenia, que refere-se à principal consequência hematológica da hipoplasia secundária ao benzeno. Assim sendo, o hemograma, de preferência em série histórica, é o instrumento determinante para uma avaliação e classificação de cunho clínico-laboratorial.

A prevenção de riscos ocupacionais envolve uma abordagem concomitante da exposição ambiental e dos efeitos e/ou respostas individuais gerados pela exposição. Essa estratégia, para ser integral e fidedigna às relações que existem entre saúde/trabalho/ambiente e doença, deve conceber o trabalho de forma holística, ou seja, respeitar as relações humanas do ambiente de trabalho e observar a influência da exposição nas condições socioeconômicas do trabalhador (CARVALHO *et al.*, 2017).

Embora exposições ocupacionais a altas doses de benzeno causem doença mielóide aguda e leucemia não-linfocítica aguda, evidências de efeitos hematotóxicos e cânceres linfo-hematopoiéticos em trabalhadores expostos a benzeno em concentrações menores que 1 ppm. , despertam preocupação sobre exposições a baixas concentrações de benzeno também, visto que, as populações urbanas e os fumantes estão constantemente expostos a concentrações de benzeno no ar na faixa de 1-20 ppb (RAPAPPORT *et al.*, 2012).

2.2. ENSAIO DE MICRONÚCLEO EM CÉLULAS DA MUCOSA ORAL (MN)

O micronúcleo (MN) é um tipo de dano cromossômico ou anomalia mitótica que tem sua origem a partir de fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros e uma vez formado o MN, tal dano é irreversível (Figura 2). Durante a fase da anáfase da mitose

os cromossomos não são capazes de interagir com o eixo formado na citocinese e, portanto, não são incorporados aos núcleos filhos (FENECH *et al.*, 2011; KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2011).

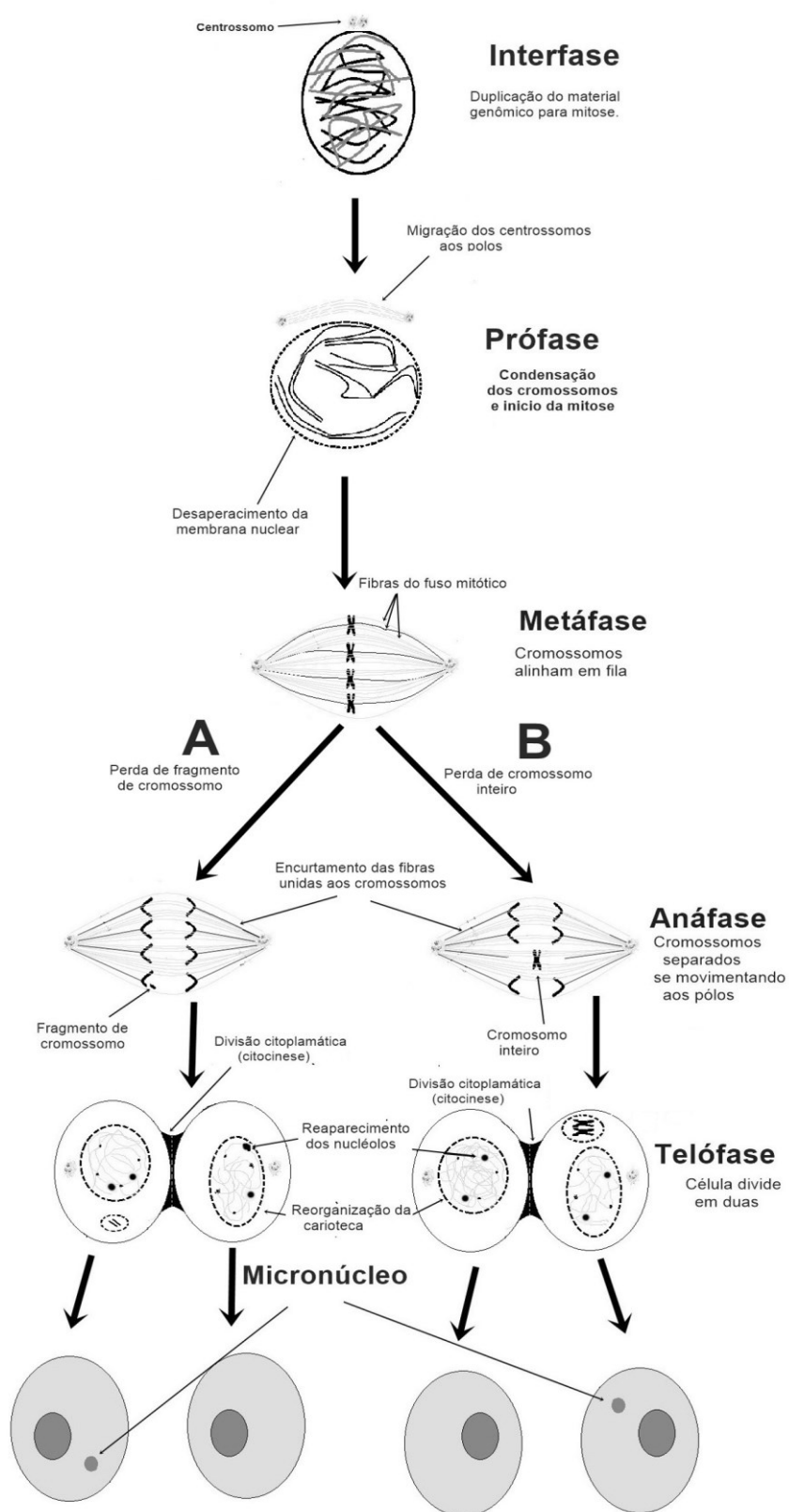
Em 1990 foi criado o ensaio CBMN (cytokinesis-block micronucleus – micronúcleo com bloqueio da citocinese) utilizando FISH e sondas pan-centroméricas para visualizar os centrômeros. Tal método possibilitou a definição exata entre micronúcleos de fragmentos acêntricos e aqueles de cromossomo. Esse método expandiu de forma considerável a sensibilidade do ensaio CBMN para faixas de menores concentrações dos agentes genotóxicos. Posteriormente foi desenvolvida e validada uma nova versão do ensaio CBMN que recebeu o nome de CBMN-Cit (ensaio citômico de micronúcleos com bloqueio de citocinese). Essa nova versão do ensaio permitiu contar brotos nucleares em células binucleadas que são, respectivamente, biomarcadores de cromossomas dicêntricos e de amplificação gênica (FENECH, 2007; VALENTE *et al.*, 2017).

Em casos raros, algumas células podem ser bloqueadas no estágio de binucleada ou pode exibir brotos ou pontes nucleares (também conhecido como “ovos quebrados” ou “*broken egg*” (BEC) em células bucais), que são de biomarcadores amplificação gênica. Esses biomarcadores de danos genômicos (por exemplo, MN, botões nucleares) e morte celular (por exemplo, apoptose, cariólise) (FENECH, 2007).

Outras anormalidades nucleares também podem ser observadas, como por exemplo, células com a cromatina condensada (Cc), cariorréxis (CR), cariólise (CL), picnose (Pi), células binucleadas (BN) e com pontes nucleares (BEC) que são biomarcadores amplificação gênica e podem ser observados em as células linfocitárias e em células da mucosa oral e assim fornecer uma avaliação mais abrangente de danos genoma. (THOMAS *et al.*, 2009; KASHYAP e REDDY, 2012).

Os MN podem ser analisados em células tratadas ou não com bloqueio do processo de citocinese, incluindo células primárias. A análise da frequência de MN em linfócitos humanos, também pode auxiliar em exames preditivos para problemas na gravidez, risco de câncer e mortalidade por doença cardiovascular. Trata-se de um biomarcador de efeito com relevância na avaliação de risco. (BONASSI *et al.*, 2007; FURNESS *et al.*, 2010).

Figura 2 - Esquema representativo da formação de MN na anáfase



Fonte: VALENTE *et al.*, 2017.

Os MN são normalmente observados em células imediatamente após a divisão nuclear, em telófase, sob a forma de células binucleadas que podem ser acumuladas através do bloqueio de citocinese (FENECH, 2007). No caso de pesquisas que utilizam células primárias, os MN formados *in vivo* podem também ser avaliados. É o que ocorre no caso de linfócitos primários não cultivados e de células epiteliais recolhidas das regiões bucal, nasal ou mucosa urotelial (MOORE et al., 1993; SURRALLÉS; NATARAJAN, 1997; ALBERTINI *et al.*, 2000; KIRSCH-VOLDERS *et al.*, 2011).

Alguns tecidos apresentam uma alta capacidade de regeneração e, portanto, possuem células com alto índice mitótico, nesse caso, a identificação dos MN e o cálculo de sua frequência podem ser feitos a partir das células primárias coletadas sem necessidade de induzi-las a se dividir. Além disso, as células da mucosa oral é um tecido acessível para amostragem, de uma forma minimamente invasiva. Este método de amostragem é cada vez mais utilizado em estudos epidemiológicos moleculares para investigar o impacto da nutrição, estilo de vida e exposição a agentes causadores de estresse (FENECH *et al.*, 2011).

O teste para avaliação da ocorrência de MN vem sendo utilizado em estudos de exposição a vapores de gasolina. Em 1998, Bukvic e colaboradores avaliaram sua frequência num grupo de frentistas e seus resultados demonstraram uma relação direta do tempo de exposição (avaliado pelos anos na função) com a frequência de MN. Estudos recentes realizados por outros grupos reforçam tais resultados, validando o emprego deste indicador devido a sua sensibilidade à exposição aos vapores de gasolina (MORO *et al.*, 2013; LOVREGLIO *et al.*, 2014; VALENTE *et al.*, 2017).

Kim e colaboradores (2010) avaliaram a frequência de MN em linfócitos de sangue periférico em trabalhadores expostos ao benzeno no processo de refino de petróleo e em trabalhadores de escritório não associados ao petróleo processo de refinaria e comparou. As frequências médias de MN e MN negativos para centrômero foram significativamente maiores no grupo de trabalhadores expostos ao benzeno quando comparado com as frequências no grupo de trabalhadores de escritório (KIM, 2010).

Zhang e colaboradores (2014) avaliaram a frequência de MN em linfócitos do sangue periférico de operários da indústria de calçados expostos ao benzeno e grupo de comparação (chamado pelos autores de “controles” não expostos). Os trabalhadores expostos ao benzeno foram avaliados como um grupo total e também agrupados de acordo com a duração e o nível da exposição. E concluíram que houve um acréscimo significativo nos trabalhadores expostos ao benzeno tanto à concentração quanto à duração guardaram

relação com a frequência de MN quando comparados ao grupo de comparação (chamado no estudo de controle). Stich, Curtis e Parida, no ano de 1982, propuseram pela primeira vez o uso do teste de MN em células esfoliativas, inclusive da mucosa oral, para o biomonitoramento de populações humanas expostas a agentes mutagênicos. Desde então, vários estudos foram realizados com o objetivo de avaliar a frequência de MN em outros epitélios.

3. JUSTIFICATIVA

Mundialmente, contaminações ambientais e ocupacionais relacionadas aos PRC constituem-se como uma grande preocupação das autoridades internacionais e nacionais, devido ao seu alto risco de incêndios, explosões, contaminações de solo e águas subterrâneas, assim como, devido aos riscos relacionados à saúde humana decorrentes da exposição aos solventes presentes nos combustíveis, em especial o benzeno. Embora a concentração de benzeno presente na gasolina seja controlada, não é possível ignorar que se trata de uma substância comprovadamente carcinogênica para seres humanos e, logo, não existe limite seguro de exposição. Dessa forma, trabalhadores de indústrias químicas, postos de gasolinas, oficinas mecânicas, intensas emissões de fumaça de veículos automotivos e de locais onde há a exploração de petróleo, encontram-se expostos ocupacionalmente ao benzeno. Além disso, a população em geral, especialmente as residentes nas adjacências de fontes de exposição, também se encontram expostas ambientalmente, devido à volatilização dos solventes presentes na gasolina oriunda tanto dos PRC ou de outras fontes de emissão, como, por exemplo, emissões industriais e veiculares (CARRIERI *et al.*, 2006).

Nesse sentido, a realização de avaliação da exposição seguida de monitoramento biológico constituem ferramentas valiosas para a avaliação de populações expostas às substâncias químicas. Biomarcadores são utilizados na avaliação da exposição e de seus efeitos associados, visto que por meio deles é possível caracterizar e mensurar a exposição e as diversas alterações causadas à saúde humana. Um bom biomarcador de efeito é aquele que mede uma alteração biológica em um estágio ainda precoce, onde a natureza do dano ainda não representa agravo à saúde, como os biomarcadores de genotoxicidade (CARVALHO *et al.*, 2017). O uso do ensaio de MN como estratégia se baseia na identificação das alterações cromossômicas precoces e irreversíveis advindas da resposta do organismo à exposição (VALENTE *et al.*, 2017).

Devido a condições econômicas, sabe-se que o banimento de determinados compostos dos ambientes de trabalho apresenta várias limitações e nem sempre se faz possível. Assim sendo, as ações de monitoramento e vigilância em saúde de populações expostas a tais substâncias podem gerar informações relevantes para que sejam adotadas medidas preventivas a fim de reduzir os efeitos da exposição.

Estudos que contemplem a exposição de populações brasileiras ao benzeno, tanto ambientalmente quanto ocupacionalmente, ainda são, lamentavelmente, escassos frente a real situação do risco. O presente estudo poderá, nesse contexto, contribuir na investigação

de um biomarcador precoce de efeito manifestado através do dano ao DNA relacionado à exposição crônica ao benzeno. Assim sendo, a introdução do MN, em conjunto a outros indicadores, tornará a avaliação da exposição no presente estudo mais robusta, e poderá contribuir com estratégias que visem minimizar os impactos da exposição sobre a saúde.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o dano ao DNA e frequência de MN em dois grupos de trabalhadores expostos a baixas concentrações de benzeno, por meio do teste de MN em células epiteliais da mucosa bucal.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar a técnica de MN em células de mucosa bucal, no laboratório de Toxicologia do Centro de Estudos de Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH- FIOCRUZ- RJ) no setor de Indicadores de efeito;
- Comparar a frequência de MN entre os dois grupos de trabalhadores expostos a baixas concentrações de benzeno;
- Correlacionar e discutir os resultados obtidos da frequência de MN com os dados clínicos (hemograma completo), os biomarcadores de exposição ATTM, S-FMA e concentração de benzeno no ar da avaliação ambiental.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

A presente dissertação fez parte do projeto mais amplo "Avaliação da exposição ocupacional ao benzeno em postos de combustíveis no Município do Rio de Janeiro: uma abordagem integrada para as ações de vigilância em saúde", cujo objetivo foi avaliar a exposição ocupacional ao benzeno em postos revendedores de combustíveis no Município do Rio de Janeiro, por meio de uma abordagem multidisciplinar integrada para ações de vigilância em saúde do trabalhador e ambiental, como ferramenta estratégica para atuação do SUS no território.

Esse projeto mais amplo correspondeu a um estudo do tipo transversal, realizado entre os anos de 2014 e 2015, no qual a avaliação da exposição e os parâmetros toxicológicos de estresse oxidativo e de genotoxicidade foram comparados entre duas populações expostas a baixas concentrações de benzeno. A primeira população foi composta por trabalhadores de PRC localizados na Área de Planejamento 5.3 do município do Rio de Janeiro e a segunda por trabalhadores das Portarias do *campus* - Castelo Mourisco da Fiocruz - RJ terceirizados da DIRAC/ Fiocruz, localizado na Área de Planejamento 3.1 do mesmo município. Todos os trabalhadores foram selecionados por locais fixos de trabalho, ou seja, por PRC ou Portarias para as respectivas populações ocupacionalmente e ambientalmente expostas ao benzeno. Todos os trabalhadores foram selecionados por locais fixos de trabalho (PRC ou portarias) para os respectivos grupos populacionais.

5.1 POPULAÇÃO

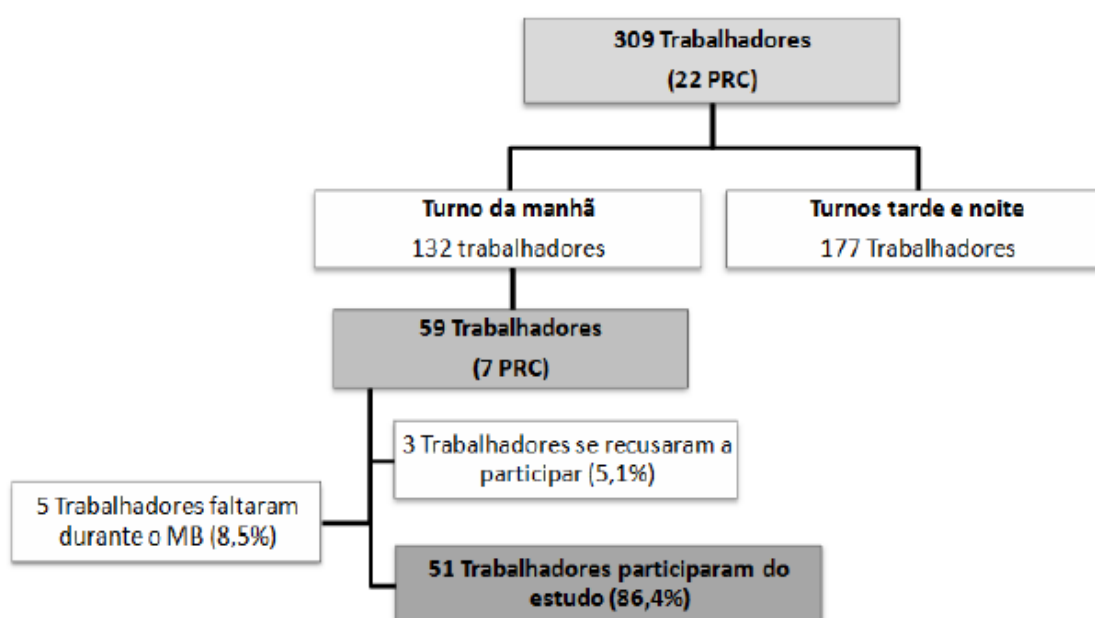
A população do estudo foi composta por 86 trabalhadores expostos ambiental e ocupacionalmente a baixas concentrações de benzeno, a qual foi dividida em dois grupos. O primeiro grupo (I) foi composto por 51 trabalhadores de PRC localizados na AP 5.3 do município do Rio de Janeiro; e o segundo grupo (II) por 35 trabalhadores da segurança alocados nas portarias do *campus* Castelo Mourisco da Fiocruz, localizadas na AP 3.1 do município do Rio de Janeiro também do município do Rio de Janeiro. Os locais de trabalho de ambos os grupos avaliados estavam localizados em uma avenida de grande fluxo de carros e caminhões, sendo uma importante via de entrada e saída da cidade do Rio de Janeiro. Por isso, os dois grupos de trabalhadores possuem exposição ambiental "background" ao benzeno em seus locais de trabalho, devido a emissões veiculares de benzeno oriundo dos combustíveis. Além disso, nesta mesma avenida existe uma refinaria de petróleo, que também contribui para a exposição ambiental ao benzeno. A diferença da exposição ao benzeno entre as duas populações se dá devido às suas atividades laborais,

em que o grupo de trabalhadores de PRC realiza a manipulação da bomba de gasolina, ou seja, uma atividade que inclui uma fonte direta de benzeno no processo de trabalho (exposição ocupacional). A manipulação de uma fonte direta de exposição ao benzeno no trabalho não ocorre para o grupo de trabalhadores das portarias (II). A seleção dos locais de trabalho do grupo de trabalhadores I, ou seja, PRC foi realizada em parceria com o Sindicato dos Empregados em Postos de Serviços de Combustíveis e Derivados de Petróleo do Estado do Rio de Janeiro (SINPOSPETRO-RJ). A Figura 3 representa os diagramas das seleções dos grupos de trabalhadores I e II expostos ao benzeno.

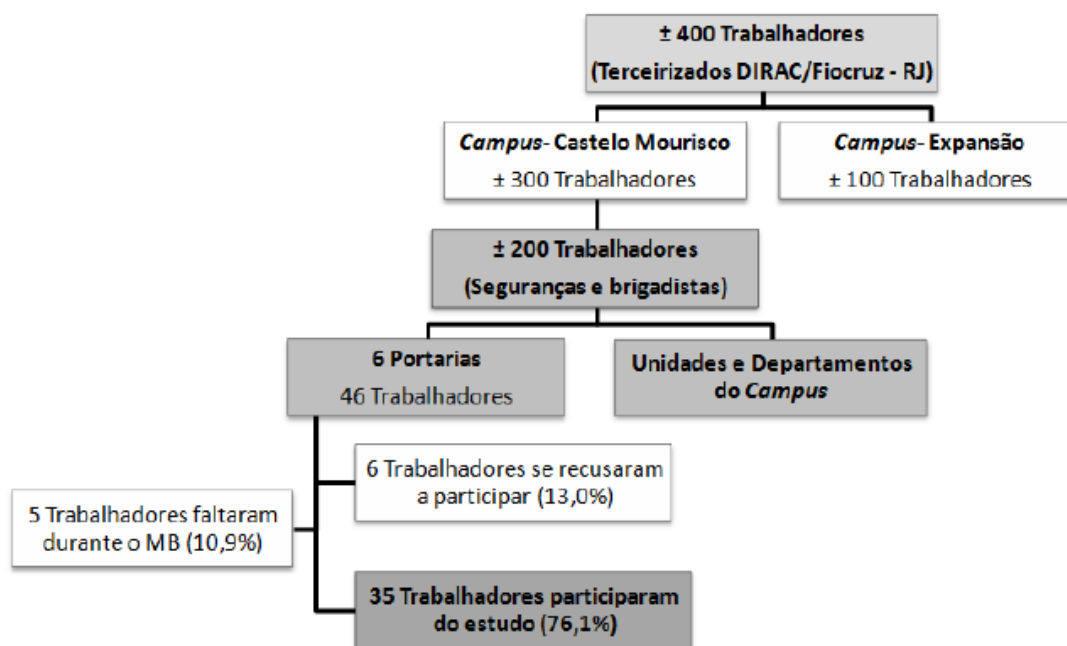
Os critérios de inclusão adotados para ambos os grupos I e II foram: idade superior a dezoito anos, do sexo masculino e aceitação em participar do estudo, através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). O critério de exclusão utilizado na seleção do grupo II de trabalhadores foi ter trabalhado em processos de trabalho com exposição ao benzeno.

Figura 3 – Diagramas das seleções dos grupos de trabalhadores I e II expostos ao benzeno.

I



II



5.1.1. Avaliação sócio-demográfica e clínica

Um questionário, com questões abertas e fechadas, que contemplou questões relativas às características sociodemográficas assim como o histórico ocupacional dos trabalhadores, foi aplicado, conjuntamente com o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexos I e II). Seguindo a classificação clínico-laboratorial para manejo clínico de trabalhadores expostos ao benzeno de Fonseca e colaboradores (2017), foi realizada avaliação clínica por profissional médico habilitado nos próprios locais de trabalho das duas populações estudadas. Informações complementarmente à avaliação clínica, como exames hematológicos (hemograma completo) foram extraídas do projeto integrador já mencionado.

5.2. AVALIAÇÃO AMBIENTAL

5.2.1 Quantificação do Benzeno no ar atmosférico

A avaliação ambiental dos locais de trabalho, incluída no projeto integrador, foi realizada mediante a quantificação do benzeno no ar atmosférico por cromatografia gasosa com detector por ionização em chama (GC-FID, marca Thermo-Finnigan, modelo Focus GC FID), de acordo com o método 1501 do Manual de Métodos Analíticos do *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH) (NIOSH, 2003). A coluna capilar

utilizada foi Carbowax 20M (Agilent) de 60 m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura de fase. O limite de quantificação encontrado para o benzeno foi de 5,60 µg m⁻³.

Essa avaliação foi realizada mediante a utilização de amostradores ativos nos locais de trabalho (PRC e Portarias) de ambos os grupos estudados. As amostras de ar foram coletadas em cartuchos de carvão ativo da marca SKC (Anasorb CSC SKC – 226-01 com leitos de 100 e 50 mg) com auxílio de bombas coletoras de ar SKC (PCXR4) calibradas para vazão de 0,2 L min⁻¹. Os pontos de amostragem foram posicionados próximos à área de circulação dos trabalhadores envolvidos no estudo e o ar foi coletado durante um período de 150 minutos. Nos PRC, os pontos de amostragem foram posicionados a 1,5 m de altura do solo na área de circulação dos trabalhadores, próximos às bombas de combustíveis.

5.3. AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES DE EXPOSIÇÃO E DE EFEITO

A avaliação foi realizada por meio das análises dos biomarcadores de exposição ATTM e S-FMA urinários e do biomarcador de efeito genotóxico MN. As amostras de urina e de mucosa bucal dos trabalhadores foram coletadas no próprio local de trabalho, acondicionadas em caixas térmicas com gelo artificial e transportadas até o laboratório.

As amostras de urina foram utilizadas para a avaliação dos biomarcadores de exposição ATTM e S-FMA urinários foram coletadas no final da jornada de trabalho em frascos de polietileno, fracionadas e armazenadas em ultrafreezer (-80 °C) até o momento da análise.

As amostras celulares de mucosa bucal utilizadas para a avaliação do biomarcador de efeito genotóxico MN foram coletadas utilizando “*cytobrush*” e transferidas para tubos tipo "Falcon" contendo 5 mL de solução fisiológica de cloreto de sódio, sendo em seguida acondicionadas e transportadas em caixas térmicas até o local de análise para seu processamento. Esse processamento foi realizado no dia seguinte a data de coleta das amostras.

5.3.1 Determinação do ácido *trans,trans*-mucônico urinário (ATTM)

A análise de ATTM foi contemplada no projeto integrador, sendo descrito a seguir o procedimento realizado. A determinação do biomarcador de dose interna ATTM foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC UV-Vis) com coluna C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 µm) e detecção no UV em 264 nm, de acordo com a metodologia

de Ducos *et al.* modificado por Paula *et al.*. Previamente a análise cromatográfica, as amostras de urina passaram por etapa de extração em fase sólida (SPE) com resina de amina quaternária (tipo SAX – stronganionexchange). Em seguida, essas amostras foram submetidas a análise cromatográfica, utilizando as seguintes condições: fase móvel metanol / ácido acético 1% (10:90); fluxo de 1 mL min⁻¹; volume de amostra de 20 µL; temperatura do forno = 40 °C. A concentração das amostras foi calculada em mg L⁻¹ por regressão linear e os resultados foram corrigidos pela concentração de creatinina. O limite de detecção do método foi de 0.11 mg L⁻¹.

5.3.2 Determinação do ácido S-fenilmercaptúrico urinário (S-FMA)

O método consiste em extrair o S-FMA de 3 mL de urina (cujo pH foi corrigido para 1 com HCL 25%), utilizando a técnica SPE com colunas C18 chromabond® com 500 mg de adsorvente. Para extração, as colunas são condicionadas com 3 mL de metanol, 6 mL de ácido acético 1%, depois 3 mL de urina (pH=1) são adicionados à coluna extratora; 2 mL de ácido acético 1% são empregados na etapa de lavagem. Para coleta do eluato, 2 mL de solução de metanol e acetato de amônio a 0,5% (80:20 v/v) são utilizados. O eluato foi colocado em banho-maria a 80 °C para concentração sob fluxo de nitrogênio; a concentração é feita até resíduo. A última etapa do método consiste na derivatização, feita através da ressuspensão do resíduo com 50 µL de N,O-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA), o qual é transferido para vial de 2 mL e levado ao microondas por 1 minuto na potência de 20%. Para análise, injeta-se 1 µL do derivatizado no cromatógrafo gasoso acoplada à espectrômetro de massas triplo quadrupolo Agilent Technologies®. O limite de detecção do método foi de 0.95 µg/L.

5.3.3 Ensaio de Micronúcleo (MN)

Para avaliação do efeito genotóxico induzido pelo benzeno foi proposto a análise de MN segundo o protocolo sistematizado por Thomas e colaboradores no ano de 2009.

As células coletadas da mucosa bucal e armazenadas em tubo contendo 5 mL de solução de NaCl 0,9% até o momento da análise foram lavadas e centrifugadas (5 minutos por 3000 rpm) três vezes com a mesma solução salina e alíquotas de 100 µL de suspensão celular foram usadas na montagem das lâminas, sendo preparadas quatro lâminas para cada indivíduo. Após a última centrifugação, um volume de aproximadamente 400 microlitros foi deixado no tubo. Lâminas limpas foram colocadas em estufa, numa temperatura de 37° C durante 30 minutos antes do procedimento. Com auxílio de uma pipeta, foi adicionado

sobre cada lâmina o volume de 100 μ L da suspensão de células obtidas na última centrifugação, espalhando-a bem sobre a lâmina. As lâminas preparadas foram secas por 12 horas ou *overnight* em temperatura ambiente e, em seguida, imersas em coplin horizontal contendo em etanol absoluto por um período de tempo de 30 minutos. Após esta etapa de fixação das células, as lâminas foram deixadas a temperatura ambiente até sua completa secagem, sendo posteriormente coradas.

A coloração foi realizada imergindo as lâminas em recipiente *coplin* vertical contendo 97 mL de tampão de fosfato de sódio e 3mL de solução corante azur-eosina-azul de metileno (Giemsa®) por 4 minutos. Depois de coradas, as lâminas foram lavadas em água corrente sob fluxo suave e deixadas para secar em temperatura ambiente. Por fim, as lâminas foram acondicionadas em caixas de lâminas sob-refrigeração de 2-8°C até o momento das etapas de leitura no microscópio. Para cada indivíduo, foram selecionadas 02 lâminas e um total de 2000 células esfoliadas (1000 células por lâmina) foram observadas, em teste cego, utilizando-se microscópio óptico binocular, com objetiva de 40x e 100x, no período de leitura ocorreu de Outubro de 2017 a Outubro de 2108.

As anormalidades nucleares observadas e classificadas pelo teste foram micronúcleo (MN), células binucleadas (BN) e células com broto nuclear ou "*Broken egg*" (BEC). MN foi caracterizado como sendo um núcleo pequeno contido em células nucleadas, com formato redondo ou oval, diâmetro variando de 1/16 a 1/3 do tamanho do núcleo principal e intensidade de coloração semelhante a do núcleo original; BN foram caracterizadas como sendo células que continham dois núcleos principais de mesmo tamanho e de coloração semelhante; e BEC foram caracterizados como sendo uma constrição do núcleo principal formando um broto ligado ao núcleo principal, com diâmetro de 1/4 a 1/2 do núcleo principal e intensidade de coloração semelhante (THOMAS *et al*, 2009). Os resultados foram expressos pela frequência de MN, BN e BEC em 1000 células contadas.

5.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise descritiva foi realizada utilizando médias, desvios padrão, frequência e percentual de distribuição. A normalidade da distribuição das variáveis contínuas foi testada por meio do teste Kolmogorov-Smirnov, adotando nível de significância de 5%. Para comparação de variáveis com distribuição normal foram utilizados os testes *t* de Student ou ANOVA e para variáveis com distribuição não normal os testes Mann-Whitney (*U*) ou Kruskal-Wallis (*H*). Testes de correlação de Person (*r*) e de Spearman (ρ) foram utilizados para as variáveis contínuas com distribuição normal e não normal,

respectivamente. As variáveis sexo, idade, tabagismo e etilismo foram utilizadas como variáveis controle. Todos os dados foram analisados com por meio do programa SPSS para Windows versão 20.0.

5.5. ASPECTOS ÉTICOS

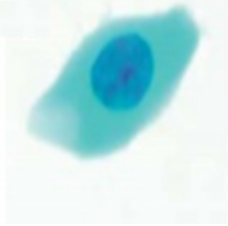

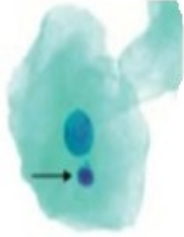
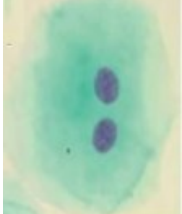
Este projeto seguiu todos os preceitos da ética em pesquisa com seres humanos (Conselho Nacional de Saúde – CONEP 466/2012). Os indivíduos que participaram do estudo e doaram amostras biológicas leram, concordaram e assinaram o Termo de Consentimento Esclarecido (TCLE). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Nacional em Saúde Pública Sergio Arouca (Parecer CEP/ENSP 434.418 de 25/10/2013 e CAAE 17438013.5.0000.5240).

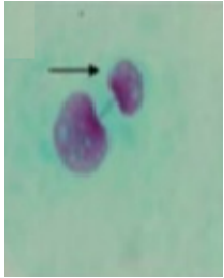


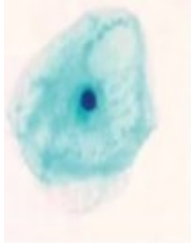

6. RESULTADOS

6.1. IMPLEMENTAÇÃO DA TÉCNICA DE MN EM CÉLULAS DE MUCOSA BUCAL

Para a execução do ensaio de MN nas amostras dos trabalhadores voluntários deste estudo, fez-se necessário a implementação da técnica de MN em mucosa bucal no setor de Indicadores de Efeito (INE) do Laboratório de Toxicologia do CESTEH-FIOCRUZ. Para tanto, a elaboração do Procedimento Operacional Padrão (POP) da técnica de MN em mucosa bucal foi realizada, seguida de seu treinamento. Por meio da observação das células, as alterações nucleares puderam ser classificadas em MN, BN e BEC. Os tipos de células bucais observáveis ao microscópio e suas anomalias nucleares estão sistematicamente descritos no Quadro 1 a seguir.

Quadro 1 - Tipos de células bucais observáveis ao microscópio óptico.

Tipo de célula bucal	Características Morfológicas	Figura
Basal (BA)	Apresenta o núcleo grande em relação citoplasmática relativa à célula diferenciada, é menor e mais oval que células diferenciadas. O núcleo fica uniformemente corado, já o citoplasma fica mais escuro em relação à célula diferenciada quando é visto sob a luz transmitida.	
Diferenciada (DI)	Apresenta núcleo é redondo uniformemente corado e menor em relação ao citoplasma (quando comparado à célula basal), sendo ainda mais angular e mais plana que as células basais.	
Micronucleada (MN)	Contém o núcleo principal e um ou mais micronúcleos ; os MNs são redondos ou ovais com intensidade de coloração semelhante ao núcleo principal; MNs possuem, geralmente, um tamanho de 1/3 a 1/16 do diâmetro do núcleo principal; MNs devem estar localizados no citoplasma celular.	
Binucleada(BN)	As células possuem dois núcleos principais e tais núcleos apresentam tamanho e intensidade de coloração semelhantes entre si.	

<p>Broken egg ou Broto nuclear (BEC)</p>	<p>O núcleo principal tem uma constrição acentuada, formando um broto está ligado ao núcleo principal;</p> <p>O broto tem intensidade de coloração semelhante ao núcleo principal e o diâmetro pode ter de um quarto até metade do diâmetro nuclear.</p> <p>Quando os núcleos apresentam o mesmo tamanho e encontram-se ligados por uma ponte nucleoplasmática tal anomalia recebe o nome de “<i>broken egg</i>”.</p>	
<p>Cromatina condensada (Cc)</p>	<p>Os núcleos são de tamanho e intensidade de coloração semelhantes às células micronucleadas;</p> <p>O núcleo mostra áreas de cromatina agregada</p> <p>As áreas distintas do núcleo são mais intensamente coradas;</p> <p>O núcleo exibe padrão estriado e a cromatina possui pouca ou nenhuma atividade sendo associada ao processo apoptótico.</p>	
<p>Cariorrética (CR)</p>	<p>O núcleo tem extensa cromatina agregada em grande extensão e evidente fragmentação nuclear.</p> <p>Indica apoptose em estágio avançado.</p>	
<p>Picnótica (Pi)</p>	<p>A célula possui um núcleo pequeno e encolhido, uniformemente e intensamente corado.</p>	
<p>Cariolítica (CL)</p>	<p>Diâmetro do núcleo é 1 / 3-2 / 3 de diâmetro do núcleo normal</p> <p>O núcleo não apresenta DNA, apresenta apenas proteínas nucleares e por esse motivo não é corado por Feulgen nem por Giemsa®. Está associado aos últimos estágios da apoptose ou necrose.</p>	

6.2. AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE MN

As características sociodemográficas e os fatores de risco (tabagismo e etilismo) de ambos os grupos estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Caracterização dos grupos de trabalhadores I e II expostos a baixas concentrações de benzeno de acordo com as variáveis sociodemográficas e de fatores de risco.

Variáveis	Grupo de trabalhadores expostos ao benzeno				Total n (n = 86)*
	PRC (I)		Portarias (II)		
	n (n = 51)*	%	n(n = 35)*	%	
Faixa etária					
≥ 18 a < 25	11	21,6	2	5,7	13
≥ 25 a ≤ 39	26	51,0	8	22,9	34
> 40	14	27,5	25	71,4	39
Media (DP) 38,5 ± 10,8					
Sexo					
Masculino	43	84,3	29	82,9	72
Feminino	8	15,7	6	17,1	14
Raça/etnia					
Branco	14	29,2	4	12,5	18
Negro/pardo	33	68,7	28	87,5	61
Indígena	1	2,1	-	-	1
Estado civil					
Casado/separado	33	64,7	25	86,2	58
Solteiro	18	33,3	4	13,8	22
Escolaridade					
Fundamental	15	29,4	6	20,7	21
Médio	33	64,7	22	75,9	55
Superior Incompleto	3	5,9	1	3,5	4
Tabagismo					
Tabagista	10	20,00	6	21,4	16
Ex-tabagista	9	18,0	6	21,4	15
Nunca fumou	31	62,0	16	57,1	47
Etilismo					
Bebe	36	70,6	14	50,0	50
Parou de beber	3	5,9	3	10,7	6
Nunca bebeu	12	23,5	11	39,3	23

*n = número de indivíduos; DP = Desvio Padrão.

O grupo I foi composto por 84 % de homens e 16 % de mulheres com idade média total de 35 ± 11 anos, sendo 37 ± 11 e 29 ± 7 anos, respectivamente, para homens e

mulheres. A maior parte dos entrevistados reportou fazer uso de bebida alcoólica (70,6%; $n = 36$) e não ter o hábito fumar (62,0%, $n = 31$). Conforme os relatos sobre as funções ocupacionais exercidas, 72,5% ($n = 37$) dos trabalhadores ocupavam o cargo de frentistas, seguidos de 13,7% ($n = 7$) de gerência, 5,9% ($n = 3$) de auxiliar de serviços gerais, 5,9% ($n = 3$) de técnico de lubrificação e 2,0% ($n = 1$) de balconista de loja de conveniência. A média apurada do tempo de trabalho na atual ocupação foi de 7 ± 9 anos. Não foi relatada a utilização de nenhum equipamento de proteção individual ou coletiva durante a jornada de trabalho, inclusive durante o recebimento de combustíveis e de seus testes de qualidade, que caracterizam as atividades de maior exposição.

O grupo II foi formado por 83% de homens e 17% de mulheres com idade média total de 43 ± 9 anos, correspondentes a 44 ± 9 anos para os homens e 39 ± 9 anos para as mulheres. A maioria da população declarou não fumar (57,1%, $n = 20$) em contrapartida, metade reportou fazer uso de bebida alcoólica (50,0%, $n = 18$). Com relação às funções ocupacionais, 96,6% ($n = 34$) dos trabalhadores exerciam a função de vigilantes e 3,4% ($n = 1$) de porteiros. A média do tempo de trabalho na atual ocupação foi de 15 ± 3 anos, não apresentando diferença estatística com relação ao grupo I.

Os resultados das concentrações atmosféricas de benzeno, nos locais de trabalho dos grupos I e II, estão na Tabela 2. A média e a mediana das concentrações de benzeno apresentaram diferenças por Mann-Whitney entre os locais de trabalho dos grupos estudados. A avaliação da exposição por meio dos biomarcadores ATTM e S-FMA (Tabela 2) não apresentaram diferença estatística entre os grupos de trabalhadores I e II. Os resultados de ATTM e S-FMA não apresentaram distribuição normal e o ATTM pôde ser logaritimizado ($\ln t t M A$) para as análises. Além disso, ATTM e S-FMA não apresentaram correlação estatisticamente significativa.

Os resultados de ATTM foram comparados entre as categorias da variável tabagismo do questionário individual, sendo observada diferença estatística ($p = 0,034$) das concentrações de ATTM entre as categorias nunca fumou ($0,21 \pm 0,19$) e tabagista ($0,35 \pm 0,21$) somente para o grupo I. Com relação ao S-PMA, nenhuma diferença foi observada. Essa mesma comparação foi realizada entre as categorias da variável etilismo não sendo encontrada nenhuma diferença.

Tabela 2 – Resultados da avaliação ambiental e biológica da exposição dos grupos de trabalhadores I e II.

Variáveis	Grupo de trabalhadores expostos ao benzeno										p-value
	PRC (I)					Portarias (II)					
	n	Média (DP)	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	n	Média (DP)	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	
Benzeno ($\mu\text{g m}^{-3}$)	30	•14.85 (9.85)	*12.96	\leq LQ	21.46	18	• \leq LQ (-)	* \leq LQ	\leq LQ	\leq LQ	0.0001•*
ATTM (mg/g Cr)	51	0.24 (0.19)	0.18	0.13	0.30	35	0.26 (0.17)	0.23	0.12	0.32	0.392
S-FMA ($\mu\text{g/g Cr}$)	36	3.54 (2.47)	\leq LQ	\leq LQ	4.45	32	3.38 (0.76)	\leq LQ	\leq LQ	3,34	0.301

Nota: DP = Desvio Padrão; n = número total de amostras coletadas; Cr = creatinina; LQ = Limite de Quantificação; $p = p$ -valor (p -valor), [$*p < 0.05$], sendo • referente à diferença estatística das médias entre os locais de trabalho dos grupos de trabalhadores I e II; e* referente à diferença estatística das medianas entre os locais de trabalho dos grupos de trabalhadores I e II.

Com relação à avaliação clínica, os exames hematológicos estão apresentados na Tabela 3, os quais não tiveram diferenças entre os grupos I e II. Ainda assim, do total de trabalhadores do estudo, 15% ($n = 13$) apresentaram resultados de leucócitos ligeiramente menores que 4.5×10^9 células/L, concentração proposta pelo nosso grupo de pesquisa como sendo de atenção ao trabalhador para que o mesmo seja acompanhado atentamente nas próximas avaliações clínicas (Fonseca, et al. 2017). Correlações positivas, por Pearson, foram observadas entre o LnATTM-U e os dados clínicos número de leucócitos totais ($R = + 0,275$, $p = 0,020$) e segmentados ($R = + 0,272$, $p = 0,022$). Entretanto, essas correlações não permaneceram quando controladas pelas variáveis: idade, sexo, tabagismo e etilismo. Nenhuma correlação foi observada entre o S-FMA e os dados clínicos.

Os resultados da análise do biomarcador de efeito genotóxico estão apresentados nas Tabelas 4 e diferenças entre as médias de MN, BN e BE foram encontradas entre os grupos de trabalhadores I e II. Nenhuma diferença foi encontrada quando comparados os resultados de alterações nucleares de MN, BN e BE entre as categorias da variável tabagismo e etilismo.

Tabela 3 - Resultados hematológicos da avaliação clínica dos grupos de trabalhadores I e II expostos ao benzeno.

Grupos de trabalhadores expostos ao benzeno	Avaliação Clínica				
	Exames hematológicos				
	N	Média	DP	Mínimo	Máximo
PRC (I)					
Hemácias (milhões/mm ³)	51	4,9	0,6	4,0	7,0
Hemoglobina (g/dL)	51	14,2	1,4	11,2	17,0
Hematócrito (%)	51	42,3	3,5	33,5	50,2
Volume Globular Médio (VGM) (fl)	51	86,6	6,6	62,5	98,9
Hemoglobina Globular Média (HGM) (pg)	38	29,7	3,2	19,2	35,2
CHGM (g/dL)	51	33,4	2,2	28,4	38,2
Índice de anisocitose (RWD) (%)	38	11,8	0,8	10,3	13,4
Leucócitos Totais (cel/mm ³)	51	6523,3	1852,5	3121	10690
Neutrófilos (cel/mm ³)	51	3689,1 (55,3%)	1389,2	1248	6772
Bastonetes (cel/mm ³)	51	35,5 (0,55%)	66,9	0	213
Segmentados (cel/mm ³)	51	3653,6 (54,8%)	1388,4	1248	6772
Eosinófilos (cel/mm ³)	51	201,3 (3,16%)	183,1	0	1079
Basófilos (cel/mm ³)	51	47,4 (0,76%)	58,9	0	207
Monócitos (cel/mm ³)	51	489,7 (7,7%)	151,7	267	902
Linfócitos (cel/mm ³)	51	2096,5 (33%)	628,4	767	3742
Plaquetas (cel/ μ L)	51	252617,7	59133,0	152300	467500
Portarias (II)					
Hemácias (milhões/mm ³)	35	4,7	0,5	3,6	5,7
Hemoglobina (g/dL)	35	14,0	1,1	11,5	16,4
Hematócrito (%)	35	40,6	3,2	33,6	46,3
Volume Globular Médio (VGM) (fl)	35	86,1	4,4	78,9	99,6
Hemoglobina Globular Média (HGM) (pg)	35	29,6	2,0	25,2	35,8
CHGM (g/dL)	35	34,4	1,0	31,9	36,5
Índice de anisocitose (RWD) (%)	35	12	1,9	1,8	13,1
Leucócitos Totais (cel/mm ³)	35	6356,9	1773,5	3620	10340
Neutrófilos (cel/mm ³)	35	3481,3 (53,9%)	1388,4	1382	5786
Bastonetes (cel/mm ³)	-	-	-	-	-
Segmentados (cel/mm ³)	35	3481,3 (53,9%)	1388,4	1382	5786
Eosinófilos (cel/mm ³)	35	249,7 (3,8%)	295,2	39	1293
Basófilos (cel/mm ³)	-	-	-	-	-
Monócitos (cel/mm ³)	35	418,8 (6,8%)	145,3	156	724
Linfócitos (cel/mm ³)	35	2178,4 (35,6%)	654,9	944	4033
Plaquetas (cel/ μ L)	35	238943	48668,1	117000	353000

Nota: DP = Desvio Padrão. Média e faixa de referência para os valores laboratoriais de hematologia: Basófilos ($\times 10^6/L$): mulheres 29.6 (0-99) e homens 41.7 (0-125); Eosinófilos ($\times 10^6/L$): mulheres 228.5 (56-682) e homens 284.6 (65-940); Eritrócitos ($\times 10^{12}/L$): mulheres 4.7 (4.0-5.4) e homens 5.2 (4.3-6.1); Hematócrito (L/L): mulheres 0.41 (0.35-0.46) e homens 0.45 (0.38-0.52); Hemoglobina (g/L): mulheres 136.2 (118-154) e homens 152.8 (127-177); Leucocitos ($\times 10^9/L$): mulheres 6.7 (3.84-10.4) e homens 6.7 (3.9-10.9); Linfócitos ($\times 10^6/L$): mulheres 2175.3 (1157-3500) e homens 2223.2 (1265-3648); Monócitos ($\times 10^6/L$): mulheres 455.1 (208-807) e homens 503.2 (192-968); Neutrófilos ($\times 10^6/L$): mulheres 3777.3 (1804-6460) e homens 3762.7 (1728-6820); Plaquetas ($\times 10^9/L$): mulheres 284.1 (175-421) e homens 258.6 (163-399).†(Valdati et al, 2011)

Tabela 4 – Resultados do biomarcador de efeito genotóxico MN dos grupos de trabalhadores I e II expostos ao benzeno.

Anomalias nucleares	Grupo de trabalhadores expostos ao benzeno								<i>p-value</i>
	PRC (I)				Portarias (II)				
	n	Média (DP)	Mínimo	Máximo	n	Média (DP)	Mínimo	Máximo	
MN (MN/1000 cells)	51	1.19 (1.28)	0	6.00	35	0.72 (0.51)	0	1.50	0.237
BE (BE/1000 cells)	51	0.39 (0.74)	0	2.50	35	2.14 (1.47)	0	5.50	0.0001*
BN (BN/1000 cells)	51	0.12 (0.28)	0	1.50	35	0.91 (0.90)	0	3.50	0.0001*

Nota: DP = Desvio Padrão; $p = p$ -valor (p -valor), [$*p < 0.05$], sendo * referente à diferença estatística dos biomarcadores entre os grupos de trabalhadores I e II expostos ao benzeno.

Correlações, por Spearman, também foram observadas entre o MN e bastonetes ($R = + 0.400$, $p = 0.0001$); BE e as variáveis hemácias ($R = - 0.246$, $p = 0.022$), hemoglobina ($R = - 0.243$, $p = 0.024$), hematócrito ($R = - 0.353$, $p = 0.001$) e basófilo ($R = - 0.434$, $p = 0.0001$); e BN e as variáveis hemácias ($R = - 0.312$, $p = 0.004$), hematócrito ($R = - 0.364$, $p = 0.0001$) e basófilos ($R = - 0.404$, $p = 0.0001$). Quando controladas por sexo, idade, tabagismo e etilismo, as correlações parciais observadas foram entre BE e as variáveis basófilo ($R = - 0.271$, $p = 0.034$) e monócito ($R = - 0.282$, $p = 0.028$); e entre BN e as variáveis hemácias ($R = - 0.281$, $p = 0.028$) e basófilos ($R = - 0.312$, $p = 0.014$).

Por fim, foi testadas análises de regressão linear múltipla considerando as variáveis de desfecho final o MN. Assim sendo, quando utilizado como variável dependente, não se obteve nenhum modelo estatisticamente significativo. As variáveis sexo, tabagismo e etilismo não influenciaram nos modelos das diferentes variáveis dependentes.

Os resultados das associações entre o biomarcador de efeito genotóxico e as variáveis faixa etária, sexo, tempo de trabalho na atual ocupação e grupo de trabalhadores expostos, estão apresentados na Tabela 5. É importante ressaltar, que o biomarcador de efeito genotóxico MN e a variável "tempo de trabalho na atual ocupação" não apresentaram correlações. Por fim, foram realizadas regressões lineares multivariadas considerando MN, BE e BN como variáveis dependentes e idade e tempo de exposição como variáveis independentes, não sendo obtido resultados significativos.

Tabela 5 - Resultados da associação entre o biomarcador de efeito genotóxico MN por idade, sexo, tempo de trabalho na atual ocupação, tabagismo e grupo de trabalhadores.

Variáveis	N	Anomalias nucleares					
		MN (MN/1000 céls.)		Brotos nucleares (BE/1000 céls.)		Binucleadas (BN/1000 céls.)	
		Média (DP)	IC (95%)	Média (DP)	IC (95%)	Média (DP)	IC (95%)
Faixa etária	(n=86)						
≥ 18 a ≤ 25 anos	13	1.13 (1.46)	0.20-2.05	0.96 (1.50)	0.01-1.91	0.33 (0.69)	-0.10-0.77
>25 a ≤ 39 anos	34	0.97 (1.16)	0.55-1.39	0.66 (1.06)	0.27-1.04	0.23 (0.52)	0.05-0.42
≥ 40anos	39	1.01 (0.84)	0.74-1.28	1.45 (1.50)	0.96-1.93	0.60 (0.81)	0.34-0.87
Sexo							
Homens	72	0.96 (1.00)	0.72-1.19	1.06 (1.41)	0.73-1.39	0.44 (0.72)	0.28-0.61
Mulheres	14	1.25 (1.33)	0.48-2.02	1.32 (1.32)	0.56-2.09	0.43 (0.76)	-0.01-0.87
Tabagismo							
Nunca fumou	45	1.18 (1.28)	0.79-1.56	0.84 (1.25)	0.50-1.22	0.28 (0.59)	0.10-0.45
Ex-fumante	35	0.86 (0.73)	0.61-1.12	1.27 (1.50)	0.76-1.79	0.57 (0.76)	0.31-0.83
Fumante							
Tempo de trabalho na atual ocupação	47	1.10 (1.16)	0.75-1.44	1.11 (1.43)	0.69-1.52	0.40 (0.64)	0.22-0.59
< 7 anos	15	0.97 (0.90)	0.47-1.46	0.90 (1.33)	0.17-1.63	0.40 (0.63)	0.05-0.75
7 a 34 anos	16	0.75 (0.86)	0.29-1.21	0.81 (0.96)	0.30-1.3	0.34 (0.68)	0.02-0.70
Grupo de trabalhadores							
PRC (I)	51	1.20 (1.28)	0.84-1.56)	0.39 (0.74)	0.18-0.60	0.12 (0.28)	0.04-0.20
Portarias (II)	35	0.73 (0.51)	0.56-0.90	2.14 (1.47)	1.64-2.65	0.91 (0.90)	0.61-1.22

Realizou-se um levantamento bibliográfico no qual foram encontrados poucos artigos relacionados a postos de combustíveis , os quais foram sistematizados no Quadro 2 a seguir.

Quadro 2 - Artigos sobre avaliação da exposição ao benzeno em trabalhadores de postos de combustíveis.

Artigo, Ano (Local)	Resumo	Metodologia	Resultados
Lacerda et al., 2015 (Piauí-Brasil)	Este artigo teve por objetivo investigar os efeitos citotóxicos e mutagênicos da gasolina em células esfoliadas da mucosa bucal de frentistas de postos de combustíveis. O estudo foi realizado por meio do levantamento de dados, aplicação de questionários de saúde e análise citogenética, com aplicação do teste de micronúcleo em células da mucosa oral. A população estudada foi composta do Grupo Teste, constituída de 20 frentistas, expostos à gasolina, na cidade de Picos (PI) e um Grupo Controle, composto por 20 indivíduos previamente selecionados.	Aplicação de questionário, MN de mucosa oral,.	Os resultados deste estudo mostraram que a frequência de micronúcleos e de morte celular dos indivíduos expostos à gasolina foi estatisticamente significativa ($p < 0,001$) em comparação ao grupo não exposto. Essa substância também induziu citotoxicidade em epitélio bucal de indivíduos expostos ($p < 0,001$) pelo aumento da frequência de células binucleadas. Resultados estes semelhantes aos relatados na literatura, com relação ao efeito mutagênico e citotóxico desse aditivo. Além disso, observou-se que nenhum dos indivíduos do Grupo Teste utiliza equipamentos de proteção individual (EPI) e nem conhecem a ação tóxica desses compostos.
Benites et al.,2006 (Pelotas-Brasil)	No presente estudo, o teste do micronúcleo foi aplicado em células esfoliadas da mucosa bucal para avaliar o risco de mutagenicidade associado à exposição ocupacional para frentistas. Uma diferença altamente significativa foi encontrada entre grupo exposto e grupo de controle. Da mesma forma, foi encontrada diferença significativa entre esses grupos em relação à frequência de binucleação e de “Broken eggs”.	MN mucosa oral, foram analisadas 2000 células bucais esfoliadas .	Para determinar se fumar, hábito de álcool, idade, sexo ou o tempo de trabalho pode exercer algum efeito adicional, determinamos a frequência de micronúcleos e células-tronco binucleadas e indivíduos expostos e controle. Os resultados permitiram concluir que os indivíduos estudados pertencem a um grupo de risco e devem periodicamente ser submetidos a monitoramento biológico e cuidados adequados.

<p>Sellappa et al.,2010 (Coimbatore - cidade do Sul da Índia)</p>	<p>Neste estudo, a frequência do micronúcleo (MN) foi avaliada como uma medida de genotoxicidade em células esfoliadas da mucosa bucal extraídas de 110 trabalhadores de bombas de gasolina e 100 controles. Para cada indivíduo, 3.000 células bucais esfoliadas foram analisadas. Os indivíduos utilizados no estudo foram agrupados com base no tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas e hábitos de mastigação do tabaco.</p>	<p>MN de mucosa oral, foram analisadas 3000 células.</p>	<p>Houve uma frequência significativamente maior de células micronucleadas os trabalhadores expostos à gasolina do que na população controle não exposta. Os hábitos de fumar e beber (álcool), idade e tempo de ocupação representam fatores significativos em termos de aumentando a frequência MN medida na população exposta. Este estudo demonstra que, usando o ensaio MN, é possível avaliar o dano citogenético em indivíduos expostos e que o aumento significativo na indução do MN na população exposta sugere que os indivíduos estudados podem estar em maior risco de desenvolver câncer e, portanto, monitorados por quaisquer efeitos adversos a longo prazo da exposição.</p>
<p>Hallare et al.,2009 (Cidade de Manila –Índia)</p>	<p>Determinar o efeito da exposição ocupacional no posto de gasolina atendentes e fiscais de trânsito, o micronúcleo teste foi usado. Células da mucosa bucal esfoliada de 18 atendentes de posto de gasolina, 18 operadores de tráfego e 18 sujeitos de controle na cidade de Manila foram examinados para frequência de células micronucleadas (MN).</p>	<p>MN de mucosa oral</p>	<p>A análise das células bucais mostrou que as MN as frequências nos indivíduos expostos foram significativamente maiores do que nos controles ($p \leq 0,05$). No entanto, entre os atendentes de postos de gasolina e agentes de trânsito, frequências MN dos dois grupos expostos não apresentaram diferença significativa. Também não foi encontrada relação entre a frequência de MN e qualquer um dos fatores como idade, hábitos de fumar, hábitos de álcool e período de trabalho. Isto foi ainda confirmado na análise de regressão múltipla que mostrou que apenas exposição ocupacional foi um bom preditor de Frequência MN. Os resultados deste estudo sugerem que atendentes de postos de gasolina e tráfego executores, em comparação com os indivíduos de controle, são com maior risco de dano cromossômico. Para o avaliação dos danos cromossômicos, o estudo, desenvolvimento e padronização de testes são</p>

			recomendados para instituições públicas questões relacionadas à qualidade ambiental e à saúde da comunidade.
Rosa et al., 2013 (Porto Alegre, Rio Grande do Sul-Brasil)	O objetivo deste estudo foi avaliar a citogenética danos induzidos pela exposição ao BTEX e associá-lo aos polimorfismos do CYP1A1 e genes NR1I3. Amostras de células esfoliadas do mucosa oral de 27 atendentes de posto de gasolina e de grupo controle foram coletados. Os resultados encontrados mostram que o grupo exposto ao BTEX apresenta alterações maiores que as do grupo controle para micronúcleos.	MN mucosa oral	(MN; $6,85 \pm 1,33$ vs. $2,96 \pm 1,91$, $P < 0,001$) e para o total de alterações nucleares observadas (MN + células binucleadas (BNC); $9,59 \pm 4,73$ vs. $5,07 \pm 2,21$, $P < 0,001$). Ao comparar o exame citológico alterações e os genótipos entre os indivíduos expostos para o polimorfismo 3798T> C do Gene CYP1A1, homozigotos TT presentes MN + BNC significativamente maior que portadores do alelo C ($10,88 \pm 5,36$ vs $5,33 \pm 2,52$, $P=0,028$). Nenhuma associação foi observada no grupo controle ou para o Gene NR1I3. Estes resultados mostram que dados citogenéticos podem ser usados no futuro ferramentas para monitorar indivíduos expostos a tais compostos.
Çelik et al., 2003 (Mersin-Turquia)	O estudo foi realizado com 50 atendentes de postos de gasolina (25 fumantes e 25 não-fumantes) trabalhando em 15 postos de gasolina localizados na área urbana da cidade de Mersin. O grupo de controle consistia de 50 homens saudáveis (25 fumantes e 25 não-fumantes) trabalhando no campus da Universidade de Mersin, sem indicação exposição a derivados de petróleo ou outras substâncias genotóxicas potenciais.	MN de células bucais esfoliadas de 50 atendentes de posto de gasolina e 50 sujeitos controle pareados por idade e sexo foram examinados para frequência de micronúcleo (MN). Frequências de anomalias nucleares (NA) outras de micronúcleos, como binucleadas, cariarrexis e cariólise, também foram avaliados.	A exposição ao benzeno foi verificada medindo os níveis de fenol na urina. O significativo nível de fenol urinário dos trabalhadores da estação foi encontrado para ser significativamente maior que a dos controles ($P < 0,05$). Análise de células bucais revelou que MN e Anomalias Nucleares (NA) Frequências em trabalhadores de postos de gasolina eram significativamente maior es que nos “controles” ($P < 0,01$) e também significativamente relacionado ao hábito de fumar ($P < 0,01$). Os trabalhadores dos postos de gasolina estão sob dano citogenético significativo.

<p>Göethel et al. (2014) Porto Alegre- Rio Grande do Sul.</p>	<p>O objetivo foi avaliar a genotoxicidade e mutagenicidade em trabalhadores ocupacionalmente expostos a xenobióticos, pela aplicação dos ensaios 8-hidroxi-2-deoxiguanosina (8-OHdG), cometa e micronúcleo (MN) , além de biomarcadores de benzeno e carbono.</p> <p>A exposição ao monóxido também foi mensurada através da avaliação do ácido t-t-mucônico (t, t-MA) urinário e carboxi-hemoglobina (COHb) em sangue total.</p>	<p>Ensaio de genotoxicidade e mutagenicidade . Ensaio de eletroforese em gel de célula única (SCGE) MN em mucosa oral, 8-Hidroxi-2-desoxiguanosina (8-OHdG) na urina. Os grupos de estudo foram compostos por 43 atendentes de postos de gasolina(GSA), 34 taxistas (TD) e 22 pessoas sem exposição ocupacional conhecida (NE) .</p>	<p>Níveis de t, t-MA no Grupo GSA foram significativamente elevados em comparação com o grupo NE (p <0,001), no entanto, estes níveis foram abaixo dos níveis estabelecidos pela ACGIH (Conferência Americana de Higienistas Industriais Governamentais). Os níveis de COHb não foram significativamente diferentes entre os grupos TD e NE (p > 0,05). Índice de danos no DNA (DI) e os níveis de 8-OHdG foram significativamente maiores para os grupos GSA e TD, em comparação com o NE grupo (p <0,001), mas as frequências de NM não foram elevadas. A análise de correlação de Spearman mostrou que a frequência de MN foi positivamente correlacionada com 8-OHdG. Uma correlação positiva entre os níveis de DI do DNA e 8-OHdG também foi observado. Em conclusão, os resultados indicaram que baixos níveis de exposição ocupacional a poluentes atmosféricos e benzeno podem estar ligados à genotoxicidade e danos oxidativos ao DNA.</p>
---	--	--	--

7. DISCUSSÃO

Os resultados da quantificação de benzeno no ar atmosférico, em todos os locais de trabalho avaliados (PRC e Portarias) apresentaram concentrações inferiores que 0.01ppm, confirmando uma exposição a baixas concentrações. Apesar da baixa concentração de benzeno no ar atmosférico, tal fato não exclui o risco de adoecimento desses trabalhadores causado pela exposição, pois não existe limite seguro para exposição a substâncias carcinogênicas, como no caso do benzeno (CORRÊA & LARENTIS, 2017). Por isso, apesar da exposição ao benzeno ser menor que 0.01 ppm, não se pode descartar a possibilidade de um risco de adoecimento para ambos os grupos de trabalhadores expostos.

É importante ressaltar, que a avaliação em ambientes externos pode subestimar os níveis aos quais os indivíduos se expõem em ambientes internos. No estudo realizado Bolden, Kwiatkowski & Colborn (2015), os níveis de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX) medidos em ambientes internos se mostraram até 16 vezes maiores que os medidos externamente. Com isso, a população em geral também se expõe ambientalmente a essas substâncias, principalmente quando residente nas adjacências de determinadas indústrias e/ou PRC. O risco da exposição se configura pelo espalhamento desses vapores no entorno do estabelecimento em várias direções e concentrações, que são definidos pela direção do vento e do local. Segundo Carrieri e colaboradores (2006) a população em geral se expõe ambientalmente devido à volatilização dos solventes presentes na gasolina oriunda tanto dos PRCs, durante o abastecimento de tanques e veículos, quanto das emissões veiculares, o que por sua vez, gera uma difusão universal.

No presente estudo, a concentração média de benzeno no ar atmosférico apresentou ser maior no grupo I de trabalhadores quando comparada ao grupo II. Quando observadas as concentrações de benzeno no ar atmosférico por percentil, também é possível notar um aumento nas concentrações de benzeno no percentil 75 (Tabela 2), sendo maior em PRC. Além disso, dentre os resultados de amostragem de um mesmo local de trabalho, algumas amostras, tanto para PRC quanto para Portarias, apresentaram valores abaixo do limite de quantificação, caracterizando uma variação das concentrações de benzeno na amostragem realizada. Essa variação se apresentou maior em PRC, ou seja, nos locais de trabalho do grupo I. Esses resultados caracterizam uma oscilação da exposição crônica durante a jornada de trabalho na qual os trabalhadores estão submetidos, sendo diferentes entre os dois grupos populacionais.

Devido a essa oscilação de concentração, uma limitação é evidenciada para a extrapolação dos resultados da avaliação ambiental a todos os trabalhadores de um mesmo

local de trabalho. Por isso, a avaliação da exposição individual desses trabalhadores, por meio da determinação do biomarcador de exposição ATTM e S-FMA devem ser considerados como sendo mais próximos a real exposição que esses trabalhadores estão submetidos. Os resultados de ATTM e do S-FMA demonstraram ser similares entre os grupos I e II de trabalhadores avaliados. Com isso, embora o grupo I esteja exposto a maiores oscilações das concentrações de benzeno no ar pelas atividades relacionadas ao seu processo de trabalho, essa sutil diferença não foi suficiente para ser detectada pelos biomarcadores de exposição ATTM e S-FMA.

Isso provavelmente ocorreu devido ao fato de exposições humanas a baixas concentrações de benzeno no ar atmosférico resultarem em perfis de metabólitos urinários com 70-85% de fenol, 5-10% de hidroquinona, 5-10% de ATTM e de catecol e menos de 1% de S-FMA (KIM et al, 2006; QU Q, et al., 2002). As baixas concentrações de ATTM e S-FMA excretadas na urina provavelmente contribuíram para a não diferenciação da exposição entre os dois grupos de trabalhadores expostos cronicamente ao benzeno e, possivelmente, dificultando também a não observação de uma correlação significativa entre os dois biomarcadores.

O estudo realizado por Carrieri e colaboradores (2018), em trabalhadores de uma refinaria de petróleo no sul da Itália, teve como objetivo investigar o efeito de vários fatores que modulam o metabolismo do benzeno, incluindo tabagismo, genótipo metabólico de GST e co-exposição ao tolueno, sobre os níveis de três biomarcadores, ou seja, benzeno urinário (UB), S-ácido fenilmercaptúrico (SPMA) e ácido *trans, trans*-mucônico (*t,t*-MA), em 146 trabalhadores de refinaria expostos a baixos níveis de benzeno no ar (AB) na faixa $<1,5-529,2 \mu\text{g}/\text{m}^3$ (valor médio $32,6 \mu\text{g}/\text{m}^3$). Esse mesmo estudo também avaliou um grupo de agricultores não ocupacionalmente expostos, residentes na mesma área de investigação dos resultados de ATTM e S-PMA, respectivamente. O estudo de Carrieri e colaboradores confirmou a validade do SPMA como um bom biomarcador de exposição ao benzeno, mesmo em baixos níveis de exposição. Os trabalhadores de ambos os grupos I e II do presente estudo apresentaram concentrações de ATTM menores que as encontradas nos grupos dos trabalhadores avaliados por Carrieri e colaboradores (2018), e concentrações de S-FMA intermediárias entre os grupos da refinaria de petróleo e o grupo de agricultores, caracterizando a exposição crônica ao benzeno a baixas concentrações dos trabalhadores avaliados na presente dissertação. É importante destacarmos, que o resultado de ATTM sofrer influência de hábitos alimentares.

Os valores de ATTM encontrados nas amostras de urina de ambos os grupos I e II

de trabalhadores ficaram dentro dos valores basais relatados na literatura, os quais variam entre $<0,01$ a $0,66$ mg/g de creatinina (GOBBA *et al.*, 1997; BOOGAARD, 2009). Estudos recentes têm investigado a associação entre concentrações urinárias de ATTM e a exposição ocupacional/ambiental ao benzeno, sugerindo que o ATTM não seja um biomarcador sensível para monitorar exposições a concentrações de benzeno menores que 0.1 ppm, como as populações do presente estudo (CARRIERI, 2018). Melikian e colaboradores (2002) realizaram um extenso estudo sobre a especificidade e sensibilidade dos biomarcadores do benzeno, ATTM e S-FMA, em baixas exposições, e observaram que a variação da porcentagem de benzeno biotransformado, em S-FMA e ATTM, diminuiu com o decréscimo da concentração de benzeno, especialmente a conversão de benzeno em ATTM. Por isso, Melikian e colaboradores (2002) sugerem uma maior sensibilidade do S-FMA para exposições ao benzeno a baixas concentrações, quando comparado ao ATTM.

Além disso, outra possível explicação é o fato do ATTM não ser específico apenas para a exposição ao benzeno, podendo sofrer influência da ingestão de sorbato, um aditivo alimentar presente em uma grande variedade de alimentos. O ATTM é indicado como referência para avaliação de exposição ocupacional ao benzeno de 1 ppm, porém em concentrações muito baixas o ATTM sofre interferência de outros fatores. Assim, mesmo que apenas $0,12$ a $0,18\%$ do ácido sórbico seja absorvido pelo organismo humano e excretado na urina como ATTM, isso produz um fator de confundimento na avaliação do ATTM em indivíduos não fumantes expostos a baixas concentrações de benzeno e com uma dieta de aproximadamente de 500 mg.dia⁻¹ de ácido sórbico. Uma alternativa para contornar essa limitação pode ser a avaliação desse biomarcador antes e no final da jornada de trabalho (SANTOS *et al.*, 2017; BARATA-SILVA *et al.*, 2014). O ATTM também pode sofrer interferência metabólica quando há exposição concomitante ao tolueno, ocorrendo uma diminuição da excreção de ATTM, como é o caso principalmente do grupo I de trabalhadores deste estudo (GONÇALVES, *et al.*, 2017; DE PAULA *et al.*, 2003).

Uma segunda possível fonte de exposição ao benzeno e um fator de confundimento é o consumo de cigarro, que também pode interferir na excreção de ATTM, fazendo com que fumantes tenham maiores teores de ATTM urinário quando comparados a não fumantes. Como em nosso estudo os grupos I e II possuíram 20% e 21% de tabagistas respectivamente, a interferência do hábito de fumar não foi significativa entre os dois grupos, corroborando para a afirmação de que as exposições ao benzeno dos grupos I e II de trabalhadores estão relacionadas às suas atividades laborais e ao ambiente de seus locais de trabalho.

O fato de ambos os grupos de trabalhadores terem exposição ao benzeno semelhantes, provavelmente, contribuiu para a não identificação de diferenças nos resultados da avaliação clínica. Mesmo não havendo alterações clínicas significativas, foi encontrada uma correlação positiva entre o número de leucócitos totais ($R = +0,275$, $p = 0,020$) e segmentados ($R = +0,272$, $p = 0,022$). Já é senso comum a associação da exposição crônica ao benzeno e alterações hematológicas, podendo ser alterações tanto de série vermelha quanto branca ou plaquetária (FONSECA *et al.*, 2017). Além disso, a literatura associa a exposição aos compostos de vapores de combustíveis, dentre eles o benzeno, a uma diminuição da contagem total de leucócitos, com possível desenvolvimento de um quadro de leucopenia (ATSDR, 2007). Nos resultados apresentados pelos trabalhadores do presente estudo, apesar da média da contagem de leucócitos se encontrar dentro da faixa da normalidade, treze trabalhadores (15%) apresentaram resultados de leucócitos ligeiramente menores que 4.500 células/mm³, concentração proposta pelo nosso grupo de pesquisa como sendo de atenção ao trabalhador, pois mesmo que esse quadro ainda não represente um desfecho nocivo, ele aponta para a importância do acompanhamento das condições de saúde desses trabalhadores (FONSECA *et al.*, 2017). É importante ressaltar, que o fato dos grupos I e II de trabalhadores não terem apresentado alteração da média da contagem de leucócitos, não se pode excluir a ausência do risco de adoecimento ou mesmo de efeitos sobre a saúde desses trabalhadores.

Além disso, apesar de ambas as populações serem expostas cronicamente a baixas concentrações de benzeno, deve-se levar em consideração a oscilação da exposição no grupo I de trabalhadores expostos oriundos de PRC, devido às atividades de maior exposição que esses trabalhadores exercem dentro do conjunto total atividades que compõe o seu processo de trabalho. Dentre essas atividades estão os abastecimentos de carros e tanques subterrâneos, a análise de combustível, a limpeza dos postos, entre outras. Isso caracteriza momentos de maior exposição ao benzeno desses trabalhadores e, provavelmente, um maior risco de efeitos à saúde e consequente de adoecimento.

Com relação aos efeitos genotóxicos do atual estudo, as anomalias nucleares BE e BN apresentaram diferenças entre os grupos I e II de trabalhadores expostos ao benzeno, não sendo encontrada diferença para MN. Uma possível explicação para isso é o fato de ambos os grupos de trabalhadores apresentarem similaridade na exposição ao benzeno, como demonstrado pela determinação de ATTM e do S-FMA.

O MN, mesmo não sendo estatisticamente significativo ($p > 0,05$), seus resultados

mostraram uma maior frequência de MN no grupo I de trabalhadores ($1,19 \pm 1,28$) quando comparado ao grupo II ($0,72 \pm 0,51$). Estudos têm utilizado a pesquisa das anormalidades nucleares em células de mucosa oral como ferramenta para estudar a genotoxicidade da exposição ocupacional e ambiental aos derivados de combustíveis fósseis (BENITES *et al.*, 2006; LACERDA *et al.*, 2015; GOETHEL *et al.*, 2014, SELLAPA *et al.*, 2010). Resultado similar foi observado por Göethel *et al* (2014) em estudo que avaliou a genotoxicidade da exposição ocupacional entre trabalhadores de postos de combustível e taxistas. Além disso, o estudo desenvolvido por Sellappa *et al* (2010), na Índia, mostrou uma forte relação entre a exposição aos vapores de combustível fóssil durante a jornada de trabalho e o desenvolvimento de anormalidades nucleares, especialmente BE, que corresponde a um tipo de anormalidade nuclear utilizado como marcador biológico de amplificação gênica em estudos de genotoxicidade. Sellappa e colaboradores (2010) compararam a frequência de MN em células de mucosa bucal entre o grupo de 110 trabalhadores de PRC e o grupo controle de 100 indivíduos. Os resultados deste estudo demonstraram que ocorreu uma elevação na frequência de MN com significância estatística no grupo de trabalhadores expostos à gasolina em relação ao grupo de comparação. Este estudo também constatou que os hábitos de fumar e consumir bebida alcoólica, idade e tempo de trabalho na ocupação são fatores de relevância na elevação da frequência de MN na população exposta. Esse aumento significativo na indução da ocorrência de MN na população exposta sugeriu que os indivíduos estudados podem estar sujeitos a um maior risco do desenvolvimento de câncer.

Benites e colaboradores (2006) avaliaram o risco de mutagenicidade associada à exposição ocupacional ao benzeno em frentistas da cidade de Pelotas-RS (Brasil), através da aplicação da técnica de MN de células da mucosa oral. Os resultados encontrados apresentaram uma frequência estatisticamente maior de MN, BN e BE no grupo de frentistas com relação ao grupo de comparação sugerindo um maior risco de adoecimento no grupo de frentistas.

A pesquisa realizada por Hallare e seus colaboradores (2009) analisou o efeito da exposição ocupacional ao benzeno por MN de mucosa bucal em 54 trabalhadores da cidade de Manila, na Índia, divididos em 18 atendentes de PRC, 18 operadores de tráfego e 18 indivíduos do grupo controle. Os resultados apontaram que os trabalhadores atendentes de PRC e operadores de tráfego apresentaram frequência de MN estatisticamente maior ($p \leq 0,05$) quando comparados ao grupo de comparação, (chamado de grupo controle pelos autores). É importante pontuar que não houve diferença significativa entre as frequências de

MN dos atendentes de PRC e operadores de tráfego.

Em outro estudo, Lacerda e colaboradores (2015) investigaram os efeitos genotóxicos e mutagênicos da gasolina em 40 trabalhadores, sendo 20 frentistas e 20 indivíduos do grupo controle, no estado do Piauí- Brasil, também por meio de MN em mucosa bucal. Os resultados apontaram diferença estatisticamente significativa no aumento da frequência de MN e morte celular no grupo de frentistas (grupo exposto). Segundo Lacerda e colaboradores (2015) os resultados se assemelham aos encontrados na literatura, principalmente, no que tange ao efeito mutagênico e citotóxico induzido nas células epiteliais da mucosa bucal dos indivíduos expostos.

Holland e colaboradores (2008) destacaram a necessidade de investigar os fatores de confundimento capazes de interferir na frequência de MN de células da mucosa oral, pontuaram a necessidade de se estudar de forma mais abrangente o valor preditivo da frequência de MN para o risco de câncer e ressaltaram a carência de um protocolo padronizado, de tal modo, que os resultados de diversos laboratórios pudessem ser combinados e comparados facilmente, e citaram o projeto “*The human micronucleus*” (HUMN) como um veículo eficaz para o desenvolvimento e implementação de um esforço internacional de uma validação colaborativa com capacidade de reunir as várias bases de dados bucais MN para identificar e quantificar as principais variáveis que afetam este biomarcador genotóxico. Além de ressaltarem a possibilidade de avaliar a variedade de frequências de MN intra e interlaboratorial assemelhando-se com a bem sucedida abordagem utilizada pelo projeto HUMN para o ensaio de MN de linfócitos periféricos iniciado em 1997 (HOLLAND *et al.*,2008).

De acordo com Yadav e Jaggi (2015), aproximadamente 90% dos cânceres humanos tem gênese no tecido epitelial, sendo o ensaio de MN em células da mucosa bucal parece ser a abordagem adequada para o biomonitoramento que objetiva a detecção do risco aumentado de câncer em seres humanos, uma vez que as células epiteliais da cavidade bucal possuem uma capacidade de reparo do DNA mais limitada em relação à capacidade de reparo do DNA dos linfócitos de sangue periférico. Sendo assim, a frequência de MN pode refletir com precisão os eventos de instabilidade genômica relacionados à idade do tecido epitelial, e por estar em contato próximo aos agentes genotóxicos inalados e/ou ingeridos, os tecidos epiteliais são os que expressam de maneira mais precoce os efeitos genotóxicos desses agentes, visto que MN podem ser detectados em células esfoliativas bucais, de 1 a 3 semanas depois da exposição a eventos tóxicos.

A frequência de MN é uma biomarcador que mensura a quebra de cromossomos

nas divisões celulares precoces, sendo de senso comum que o número de MN sofre aumento com estímulos carcinogênicos, muito antes do aparecimento de sintomas clínicos (YADAV e JAGGI, 2015).

O ensaio do micronúcleo (MN) realizado em células bucais esfoliadas é uma técnica útil e apresenta a vantagem de ser minimamente invasiva, e pode ser utilizada para monitorar danos genéticos em seres humanos. Embora o ensaio de MN em células da mucosa oral tenha sido utilizado desde a década de 1980, visando demonstrar os efeitos citogenéticos de exposições ambientais e ocupacionais, fatores de estilo de vida, deficiências nutricionais e diferentes doenças, ainda existem importantes lacunas de conhecimento sobre as características dos micronúcleos e outras anormalidades nucleares (HOLLAND *et al.*, 2008).

É importante ressaltar que, apesar do benzeno se destacar como sendo o principal composto de relevância toxicológica presente nos solventes voláteis de PRC, o dano no material genômico observado por MN no presente estudo não pode ser atribuído exclusivamente ao benzeno, levando-se em consideração a múltipla exposição desses trabalhadores. Além disso, não se tem estudos que comprovem a segurança ocupacional da múltipla exposição ao BTEX para populações de trabalhadores de PRC. O trabalho realizado, por ser do tipo transversal e não possuir um "*follow-up*" possui uma limitação para maiores afirmações sobre a influência do tempo de trabalho em PRC e na atual ocupação, sendo necessária a realização de estudos de coorte para maiores elucidações. Portanto, estudos que relacionam a exposição ao benzeno e genotoxicidade são poucos e não conclusivos, sendo necessários mais estudos nessa área.

Por fim, a utilização de biomarcadores de genotoxicidade na avaliação da exposição ocupacional/ambiental ao benzeno, em conjunto com os biomarcadores de exposição, mostrou potencial na identificação precoce dos danos associados à exposição. Apesar dos biomarcadores de exposição serem químico-específicos, eles podem não traduzir o amplo potencial tóxico das substâncias químicas, pois substâncias genotóxicas e/ou carcinogênicas podem exercer danos ao material genético mesmo em doses muito baixas, como no caso do atual estudo relacionado a exposição ao benzeno, em que não existe exposição segura. Por isso, a importância da utilização de biomarcadores de efeito genotóxico e citotóxicos, os quais podem avaliar os danos causados ao material genético, como as técnicas de MN.

8. CONCLUSÃO

No presente estudo, os resultados das concentrações de benzeno no ar atmosférico apresentaram concentrações menores que 0.01 ppm, tanto para o grupo I quanto para o grupo II de trabalhadores. Entretanto, esse fato não exclui a ausência de risco de desenvolvimento de doenças relacionada à exposição caracterizada. Os resultados também demonstram uma maior oscilação das concentrações de benzeno no ar atmosférico no ambiente de trabalho do grupo I, oriundos dos PRC, estando esses trabalhadores expostos a maiores concentrações de benzeno em decorrência de seu processo de trabalho que inclui o manuseio de uma fonte direta de benzeno. Entretanto, o ATTM e o S-FMA não foram sensíveis a essa oscilação na concentração, indicando uma similaridade na exposição ao benzeno para os grupos I e II de trabalhadores. A avaliação da exposição por meio dos biomarcadores ATTM e S-FMA foi considerada mais fidedigna a real exposição a que esses trabalhadores estavam submetidos, em comparação com a avaliação ambiental, devido a individualização das análises realizadas da exposição.

Com relação a avaliação clínica, nenhuma diferença foi encontrada entre os grupos de trabalhadores I e II expostos ao benzeno. Mesmo assim, 15% dos trabalhadores apresentaram resultados de leucócitos ligeiramente menores que 4.5×10^9 células/L, demonstrando a importância do acompanhamento regular das condições de saúde desses trabalhadores.

O biomarcador de efeito genotóxico demonstrou a presença de anomalias nucleares (BEC e BN), sendo, portanto, sensível à discreta diferença de exposição ao benzeno, apresentada pela avaliação ambiental através da avaliação do benzeno no ar atmosférico. Apesar de não haver diferença nos resultados de ATTM e S-FMA entre os grupos I e II de trabalhadores.

Esses resultados demonstram a íntima relação entre a exposição ao benzeno, mesmo sendo em baixas concentrações, e seus possíveis efeitos relacionados ao aparecimento de danos no material genético.

Sendo assim, ambas as populações são expostas a baixas concentrações de benzeno, o que por si só já caracteriza um maior risco de adoecimento. Portanto, estudos que contemplem o monitoramento biológico de populações expostas a baixas concentrações devem continuar sendo realizados. Assim como, estudos de elucidação dos mecanismos de ação do benzeno em conjunto com os demais hidrocarbonetos e seus efeitos a saúde.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS - ANP. Portaria nº 72, de 26 de abril de 2000. Regulamenta os procedimentos a serem observados pelo distribuidor de combustíveis derivados de petróleo, álcool combustível, biodiesel, mistura de óleo diesel/biodiesel especificada ANP e outros combustíveis automotivos para aquisição de gasolina automotiva, óleo diesel e óleo combustível para turbina elétrica, do produtor. Diário Oficial da União, Brasil, 27 abr. 2000.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS - ANP. Portaria nº 309, de 27 de dezembro de 2001. Estabelece as especificações para a comercialização de gasolinas automotivas no Brasil, Diário Oficial da União, Brasil, 28/12/2001.
- AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS - ANP. Portaria nº 40, de 25 de outubro de 2013. Regulamento técnico. Diário Oficial da União, Brasil, 25 out. 2013.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY - ATSDR. Case studies in Environmental Medicine: Benzene toxicity. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA., p. 32, 2001.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY - ATSDR. Toxicological Profile for Benzene. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA., p.438, 2007.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY - ATSDR. Toxicological Profile for Benzene. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA., p.29-237 2015.
- AMERICAN CONFERENCE OF GOVERNMENTAL INDUSTRIAL HYGIENIST (ACGIH). Threshold Limit Values for Chemicals Substances and Physical Agents and Biological Exposure Indices. Cincinnati, OH, 2003.
- ANDRADE, J.A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I.C.S.F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética Química**, v. 35 n. 3 p. 17-43, 2010.

- ARCURI, A. S. A. *et al.* Benzeno não é flor que se cheire. 2011.
- ARCURI, A.S.A. *et al.* Efeitos da exposição ao benzeno para a saúde. **Série Benzeno**, Fascículo 1. São Paulo: FUNDACENTRO, 2012.
- ARNOLD, S. M.*et al.* The use of biomonitoring data in exposure and human health risk assessment: benzene case study. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 43, n. 2, p. 119-153, 2013.
- AZQUETA, O.A; COLLINS, A.R. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Archives of Toxicology*, v.87, n.6, p.949-968, 2013.
- BARATA-SILVA, C. *et al.* Benzeno: reflexos sobre a saúde pública, presença ambiental e indicadores biológicos utilizados para a determinação da exposição. **Cadernos de Saúde Coletiva**, v.22, n.4, p.329-42, 2014.
- BENITES I.C., AMADO L.L., VIANNA R.A.P., MARTINO-ROTH M.G., Micronucleus test on gas station attendants *Genet. Mol. Res.*;v.5(1), p.45-54., 2006.
- BOLDEN A. L., KWIATKOWSKI C. F., COLBORN T., New Look at BTEX: Are Ambient Levels a Problem? *Environmental Science & Technology* , v.49 (9),p. 5261-5276 doi: 10.1021/es505316f, 2015.
- BOLOGNESI, C. *et al.* The HUMN_{xl} scoring criteria for different cell types and nuclear anomalies in the buccal micronucleus cytome assay – An update and expanded photo-gallery. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v.753, p.100-113, 2013.
- BONASSI, S. *et al.* An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans, *Carcinogenesis*, v.28, n.3, p.625–631, 2007.
- BUKIVIC N. *et al.*, Sister chromatid Exchange (SCE) and micronucleus (MN) frequencies in lymphocytes of gasoline station attendants. *Mutat Res.*, v.415(1-2):p.25-33 1998.
- BRASIL. Portaria Nº 1.109, de 21 de setembro de 2016. Aprova o Anexo 2 - **Exposição Ocupacional ao Benzeno em Postos Revendedores de Combustíveis - PRC** - da Norma Regulamentadora nº 9 - Programa de Prevenção de Riscos Ambientais – PPRA.

BRASIL. Portaria Nº 3.214, de 06 de junho de 1978. Ministério do Trabalho e Emprego. NR 15 - **Atividades e operações insalubres**. Brasília, DF, 1978. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Risco químico: atenção à saúde dos trabalhadores expostos ao benzeno**. Brasília, DF: Ed. Ministério da Saúde, 2006. (Saúde do trabalhador, 7. Protocolos de complexidade diferenciada) (Série A. Normas e manuais técnicos).

CARRIERI, M. *et al.* Comparison of Exposure Assessment Methods in Occupational Exposure to Benzene in Gasolina filling-station Attendants. *Toxicology Letters*, v.162, p.146-152, 2006.

CARRIERI, Mariella *et al.* Biological monitoring of low level exposure to benzene in an oil refinery: Effect of modulating factors. *Toxicology letters*, v. 298, p. 70-75, doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.08.001 2018.

CARVALHO, L.V.B. *et al.* Exposição ocupacional a substâncias químicas, fatores socioeconômicos e Saúde do Trabalhador: uma visão integrada. **Saúde Debate**, v.41 (spe2), p.313-326, 2017.

COLLINS, A.R. & AZQUETA, O.A. DNA repair as a biomarker in human biomonitoring studies; further applications of the comet assay. *Mutation Research*. v.736, n.1-2, p.122- 129, 2012b.

CORREIA, S Benzeno- Riscos, Exposição e Formas de Prevenção em Trabalhadores da Indústria Transformadora em Portugal **Revista Portuguesa de Saúde Ocupacional**, n 5, p. 1-8, 2018. Disponível em: <http://www.rpso.pt/benzeno-riscos-exposicao-formas-prevencao-trabalhadores-da-industria-transformadora-portugal/>. Acessado em: 20/Maio/2018.

COSTA-AMARAL, I.C. *et al.* Avaliação ambiental de BTEX e biomarcadores de genotoxicidade em trabalhadores de postos de combustíveis. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v42, 2017.

COSTA-AMARAL, Isabele Campos. Estudo da genotoxicidade da exposição ocupacional em baixas doses ao benzeno em postos de combustíveis na Zona Oeste do município do

Rio de Janeiro, [Tese de Doutorado]- Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2017.

COSTA, D. F. Prevenção da exposição ao benzeno no Brasil. São Paulo. 2009. Tese de Doutorado. [Tese de Doutorado em Ciências]-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

COSTA, M.F.B. Estudo da aplicabilidade do ácido trans,trans-mucônico urinário como indicador biológico de exposição ao benzeno. [Tese de Doutorado].Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 2001.

DUCOS, P. *et al.* Improvement in HPLC analysis of urinary trans, trans-muconic acid, a promising substitute for phenol in the assessment of benzene exposure. *International archives of occupational and environmental health*, v. 62, n. 7, p. 529-534, 1990.

FENECH, Michael *et al.* The HUMAN MicroNucleus Project—an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 428, n. 1-2, p. 271-283, 1999.

FENECH, Michael. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature protocols*, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.

FENECH, Michael *et al.* Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis*, v. 26, n. 1, p. 125-132, 2011.

FONSECA, A.S.A *et al.* Classificação clínico-laboratorial para manejo clínico de trabalhadores expostos ao benzeno em postos de revenda de combustíveis, *Revista Brasileira de Saúde Ocupacional*, v. 42, Suplem.1, p e5s 1-10, 2017.

FURNESS *et al.* Increased lymphocyte micronucleus frequency in early pregnancy is associated with pre-eclampsia and/or intrauterine growth restriction, *Mutagenesis*, v.25 n.5, pp. 489–498, 2010.

- GOBBA, F. *et al.* Inter-individual variability of benzene metabolism to trans, trans-muconic acid and its implications in the biological monitoring of occupational exposure. *Science of the total environment*, v. 199, n. 1-2, p. 41-48, 1997.
- GÖETHEL, G. *et al.*, Evaluation of genotoxicity in workers exposed to benzene and atmospheric pollutants , *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 770,p. 61-65, 2014.
- GONÇALVES, E.S. *et al.*, Estratégias analíticas com cromatografia e espectrometria de massas para biomonitorização da exposição ao benzeno pela determinação do ácido S-fenilmercaptúrico urinário.*Rev Bras Saúde Ocup* [online].v.42(Supl 1): e1s.,2017
- GORDON, S. M. *et al.*, Volatile organic compounds as breath biomarkers for active and passive smoking. *Environmental Health Perspectives*, 110:689-698, 2002.
- GOUVEIA, J.L.N.; NARDOCCI, A.C. Acidentes em postos e sistemas retalhistas de combustíveis: subsídios para a vigilância em saúde ambiental. **Eng. sanit. ambient.** v.12, n.3, p.317-324, 2007.
- HALLARE A.V.*, GERVASIO M.K., GERVASIO P.L., ACASIO-CLARO .PJ., Monitoring Genotoxicity Among Gasoline Station Attendants And Traffic Enforcers In The City Of Manila Using The Micronucleus Assay With Exfoliated Epithelial Cells, *Environ. Monit. Assess.*,v..156(1-4),p.331-341. doi: 10.1007/S10661-008-0488-Y. Epub, 2008.
- HAYS, S.M. *et al.*, Biomonitoring Equivalents for benzene *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.62, p.62–73, 2012.
- HOLLAND N. *et al.*, The micronucleus assay in human buccal cells as a tool for biomonitoring DNA damage: The HUMN project perspective on current status and knowledge gaps. *Mutat Res*; v.659, p.93-108, 2008.
- INSTITUTO ESTADUAL DO AMBIENTE - INEA. Série Gestão Ambiental 7: Postos de serviços: orientações para o controle ambiental. Rio de Janeiro, 2013.

INSTITUTO ESTADUAL DO AMBIENTE - INEA. 160 áreas do Rio de Janeiro estão sendo monitoradas por técnicos do Instituto Estadual do Ambiente, 2013b. Disponível em: http://www.inea.rj.gov.br/Portal/Noticias/INEA_024506. Acesso em: 10/Ago/2016.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC. Some Industrial Chemicals and DyeStuffs. Monogr. Eval. Carcinogen. Risk Chem. Hum., 1982.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER - IARC Preventable Exposures Associated With Human Cancers, 2018 Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/Table4.pdf>. Acessado em 20/Maio/2018.

KASHYAP, B.; REDDY, P. S. Micronuclei assay of exfoliated oral buccal cells: Means to assess the nuclear abnormalities in different diseases, *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, v. 8 , p. 184-191, 2012.

KIM, S. *et al.*, Modeling Human Metabolism of Benzene Following Occupational and Environmental Exposures. *Cancer Epidemiol. Biomarkers*,v.15,p.2246–2252, 2006

KIM, Y.J. Micronucleus-centromere assay in workers occupationally exposed to low level of benzene. *Human and Experimental Toxicology*, v.29, n.5, p.343–350, 2010.

KIRSCH-VOLDERS, M. *et al.* In vitro genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models. *Mutagenesis*, v. 26, n. 1, p. 177-84, 2011.

LACERDA, L.P. *et al.* Occupational toxicology study emphasizing the citotoxic and mutagenic activity among workers exposed to gasoline. *Biotemas*; v.28(3), p.135-41,2015.

LOOMIS, Dana *et al.* Carcinogenicity of benzene. *The Lancet Oncology*, v. 18, n. 12, p. 1574-1575, 2017.

LOVREGLIO, P. *et al* Evaluation of chromosome aberration and micronucleus frequencies in blood lymphocytes of workers exposed to low concentrations of benzene. *Mutation Research / Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* v. 770, p.55-60, 2014.

- MACHADO, J.M.H. *et al.* Alternativas e Processos de Vigilância em Saúde do Trabalhador Relacionados à Exposição ao Benzeno no Brasil. **Ciênc. Saúde Coletiva**, v.8, n.4, p.913-921, 2003.
- MARCHETTI, M. D. Tratamento de águas subterrâneas contaminadas com BTEX utilizando processo oxidativo de fenton. [Dissertação de Mestrado]. Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 89p, 2009.
- MEEK, M. E.; KLAUNIG, J. E. Proposed mode of action of benzene-induced leukemia: Interpreting available data and identifying critical data gaps for risk assessment. **Chem. Biol. Interact.**, v.184, p.279–285, 2010.
- MELIKIAN, A. *et al.* Personal exposure to different levels of benzene and its relationships to the urinary metabolites S-phenylmercapturic acid and trans,trans-muconic acid. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, v.778, p.211–221, 2002.
- MENDES, M. *et al.* Normas ocupacionais do benzeno: uma abordagem sobre o risco e exposição nos Postos de Revenda de Combustíveis. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, 42(supl 1):e3s 2017.
- MINISTÉRIO DE MINAS E ENERGIA - MME. Empresa de Pesquisa Energética - EPE. Balanço energético nacional 2014. Relatório Síntese [ano base 2013]. Rio de Janeiro: MME/EPE; 2014.
- MORO, Angela M. *et al.* Genotoxicity and oxidative stress in gasoline station attendants. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 754, n. 1-2, p. 63-70, 2013.
- MOURA-CORREA, Maria Juliana *et al.* Exposição ao benzeno em postos de revenda de combustíveis no Brasil: Rede de Vigilância em Saúde do Trabalhador (VISAT). **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 19, p. 4637-4648, 2014..
- MOURA-CORREA, Maria & LARENTIS, Ariane. (2017). Exposição ao benzeno no trabalho e seus efeitos à saúde. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v.42. 10.1590/2317-6369ed0000117.

- NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH -NIOSH. NIOSH **Manual of Analytical Methods** (NMAM). Hidrocarbons, Aromatic: Method 1501. 4o Edição, v.3, p.2-7, 2003.
- OGA, S.; CAMARGO, M.M.A.; BATISTUZZO, J.A.O. *Fundamentos de Toxicologia*. 3.Ed. São Paulo: Atheneu. 2008.
- OKUMURA, L.L. & STRADIOTTO, N.R. Simultaneous determination of neutral nitrogen compounds in gasoline and diesel by differential pulse voltammetry. **Talanta.**, v.72, n.3, p.1106-13, 2007.
- OSTERREICHER-CUNHA, P. et al, Evaluation of bioventing on a gasoline-ethanol contaminated undisturbed residual soil. **J Hazard Mater**, v.110, n.1-3, p.63-76, 2004.
- PAULA, F.C.S. *et al.*, Avaliação do ácido trans, trans-mucônico urinário como biomarcador de exposição ao benzeno. **Rev. Saúde Pública**, v.37,p. 780–785, doi:10.1590/S0034-89102003000600014, 2003.
- QU, Q. *et al.*,. Hematological changes among Chinese workers with a broad range of benzene exposures. **Am. J. Ind. Med.**v. 42, p.275–285, 2002.
- RAPPAPORT, S.M, et al. Low-dose metabolism of benzene in humans: science and obfuscation. **Carcinogenesis** vol.34 n°.1 pp.2–9, 2013 doi:10.1093/carcin/bgs382 Advance Access publication December 7, 2012 Disponível em: < > Acessado em 15 Mai. 2018.
- RIBEIRO, L.R., Mutagenese Ambiental Editora SBMCTA, 1 Edição, 2003.
- ROSA J.C.F. *et al.* Cytogenetic evaluation and the association with polymorphisms the CPY1A1 and NR1I3 genes in individuals exposed to BTEX. **Environ. Monit. Assess.**, v.185(7):p.5883-90, 2013.
- SANTOS, M.V.C. *et al.* Aspectos toxicológicos do benzeno, biomarcadores de exposição e conflitos de interesses. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v.42, supl.1:e13s, 2017.

- SELLAPA S., SADHANANDHAN B., VASUDEVAN S.G., Evaluation of genotoxicity in petrol station workers in south india using micronucleus assay ind health., v.48(6),p.852-856. Epub, 2010.
- SURRALLÉS, J.; NATARAJAN, A. T. Human lymphocytes micronucleus assay in Europe. An international survey. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 392, n. 1-2, p. 165-174, 1997.
- THOMAS, P. et al. Buccal micronucleus cytome assay, *Nature Protocols*, v.4, n.6, p.825-837, 2009.
- TONELINE, M. T, et al. Frequência de micronúcleos e outras alterações nucleares em pacientes portadores de diabetes mellitus. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**. [S.l.], v. 16, n. 2, p. 80-85, jun. 2014. ISSN 1984-4840.
- TSITOU, P.; HENEWEER, M.; BOOGAARD, P.J. Toxicogenomics in vitro as an alternative tool for safety evaluation of petroleum substances and PAHs with regard to prenatal developmental toxicity. *Toxicol In Vitro*. v.29, n.2, p.299-307, 2015. [Epub 3 Dec 2014.]
- TUNSARINGKARN, T.et al. Occupational exposure of gasoline station workers to BTEX compounds in Bangkok, Thailand. *Int. J. Occup. Environ. Med.*, v.3, n.3, p.117-25, 2012.
- VALENTE, D.et al., Utilização dos biomarcadores de genotoxicidade e expressão gênica na avaliação de trabalhadores de postos de combustíveis expostos a vapores de gasolina. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v .42, Suplem.1, e8s p.1-14, 2017.
- WEISEL, C.P., Benzene exposure: an overview of monitoring methods and their findings. **Chem Biol Interact**. 2010 Mar 19; 184(1-2):58-66. doi: 10.1016/j.cbi.2009.12.030. Epub 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Environmental Health Criteria. 155. Biomarkers and Risk Assessment concept and Principles. ICPS, Geneva, 1993.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Environmental Health Criteria. 150. Benzene. IPCS, Geneva, 1993a.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Environmental Health Criteria; 214. Human exposure assessment. Geneva: International Programme on Chemical Safety. ICPS, Geneva, 2000.
- YADAV, A. S.; JAGGI, A. S., Buccal Micronucleus Cytome Assay- A Biomarker of Genotoxicity , **J. Mol. Biomark. Diagn**,v.6,p.1-6,. DOI: 10.4172/2155-9929.1000236, 2015.
- YOON, B.I. *et al.* Mechanism of action of benzene toxicity: cell cycle suppression in hemopoietic progenitor cells (CFU-GM). **Experimental Hematology**, v.29, p.278–285, 2001.
- ZANG, G. *et al.* Effect Of Polymorphic Metabolizing Genes On Micronucleus Frequencies Among Benzene-Exposed Shoe Workers In China, International **Journal Of Hygiene And Environmental Health**, v.217, p. 726-732, 2014.

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) População exposta ao benzeno

Senhor (a) Participante,

Você está sendo convidado (a) para participar da Pesquisa “Avaliação da Exposição Ocupacional ao Benzeno em Postos de Combustíveis no município do Rio de Janeiro: uma abordagem integrada para as ações de vigilância em saúde”, a ser desenvolvida por um grupo de pesquisadores do Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (Cesteh), da Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (Ensp), uma das Unidades Técnico-Científicas da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Instituição vinculada ao Ministério da Saúde, sob a Coordenação de Paula de Novaes Sarcinelli e Vice-coordenação de Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos.

O objetivo da pesquisa é avaliar a exposição ocupacional ao benzeno em postos de combustíveis no município do Rio de Janeiro, localizados em Paciência, Santa Cruz e Sepetiba e você está sendo convidado para participar devido à exposição ao benzeno no seu ambiente de trabalho. O benzeno é uma substância tóxica presente nos combustíveis, que pode produzir efeitos graves no seu organismo como o câncer, além de efeitos no sistema nervoso e alterações no sistema hematológico. Serão avaliadas as condições do postos de combustível com relação às instalações físicas e obediência às normas de segurança e os níveis dos solventes benzeno, tolueno e xileno presentes no ar (em torno das bombas).

Informe que sua participação na pesquisa é voluntária, não havendo qualquer forma de pagamento, tendo plena liberdade para decidir se deseja ou não participar, desistir a qualquer momento de participar, retirando inclusive o seu consentimento, sem

que sua recusa traga para você nenhuma penalidade ou prejuízo em sua relação com a pesquisadora ou com a instituição.

Se você concordar em participar deste estudo responderá a perguntas de dois questionários, um sobre a exposição individual e outro clínico, sobre seu histórico de saúde, estilo de vida e seu histórico de saúde familiar, aplicado por um médico. O responsável pelo posto de combustível também assinou um termo de consentimento que autoriza esse projeto e vai facilitar sua participação no horário de trabalho. A duração da entrevista será de cerca de 30 minutos e será feita em local reservado. Você fará um exame clínico realizado por um médico capacitado e concordará em doar uma amostra de urina e cerca de 20 ml de sangue. A coleta de sangue será feita por um profissional experiente, habilitado a utilizar os procedimentos adequados para não haver riscos para você. Entretanto, há a possibilidade de ocorrerem riscos e desconfortos relacionados à coleta venosa, ainda que raros e passageiros, como dor localizada, hematoma e desmaio. Se algum destes eventos acontecer você receberá imediatamente o atendimento adequado.

Serão avaliadas as concentrações de benzeno no seu organismo através da dosagem de um indicador (ácido trans-trans mucônico) na urina, e no sangue as seguintes análises serão realizadas com o objetivo de detectar alterações em casos de intoxicação por benzeno:

1-Hemograma completo;

2-Avaliação da função hepática (fígado) através da avaliação dos níveis de transaminases, gama glutaril transferase, bilirrubinas totais e frações e LDH;

3-Provas de atividade reumática ou inflamatórias: VHS, proteína C reativa e FAN; Estes exames serão realizados somente se houver alteração nos exames: marcadores de hepatite B e C (anti-HBS Ag, anti-HBc-IgM e anti-HCV);

Os exames clínicos e laboratoriais poderão indicar a necessidade de realizar análise para detectar se há infecção por HIV, o vírus causador de AIDS. Neste caso, o exame será solicitado pelo médico responsável pelo Ambulatório do CESTE/ Fiocruz, e você será encaminhado para o laboratório do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas, também da Fiocruz, para a coleta e análise de sangue. O laudo será entregue primeiro ao médico que solicitou o exame, que irá conversar com você, explicar o resultado e encaminhá-lo para atendimento.

Na coleta de sangue, uma parte será destinada a análise de biomarcadores de genotoxicidade e de susceptibilidade. Essas análises são importantes, pois permitirão investigar se o indivíduo tem uma maior predisposição a apresentar os efeitos tóxicos do benzeno e se a exposição ao benzeno produziu algum tipo de dano ao material genético.

Os resultados dos exames clínicos e laboratoriais serão entregues diretamente a você em envelope lacrado. No caso de detecção de problema de saúde, você será encaminhado (a) para atendimento pela Equipe de Profissionais de Saúde do Ambulatório do Cesteh/Ensp/Fiocruz – MS e, se necessário, o encaminharão para um serviço de referência.

Os benefícios diretos relacionados à sua participação são saber como está sua saúde e se está contaminado, como pode ter se contaminado e aprender a se proteger para diminuir essa contaminação e também os efeitos que possa apresentar. Você será acompanhado pela Equipe de Profissionais de Saúde do Ambulatório do Cesteh/Ensp/Fiocruz – MS, durante toda a pesquisa. Quanto aos benefícios indiretos as informações e dados obtidos alimentarão um banco de dados sobre o assunto, o qual fornecerá subsídios para ações estratégicas do Ministério da Saúde em Vigilância em Saúde do Trabalhador na atuação do Sistema Único de Saúde (SUS). Esse estudo está sendo realizado em todo país e os resultados serão úteis para que sejam adotadas medidas de redução e controle da exposição a agentes tóxicos presentes nos combustíveis em todo país.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Seu nome e endereço serão transformados em um código de identificação único. As informações coletadas nas entrevistas e nas amostras de sangue e urina serão identificadas apenas através deste código. Após as análises, as amostras de sangue e urina que não foram utilizadas serão descartadas segundo as normas de biossegurança. Os resultados serão usados em relatórios de pesquisa e artigos científicos. Os questionários e os termos de consentimento serão mantidos em total segurança, e apenas a coordenação e a equipe de pesquisa terão acesso a essas informações.

Você receberá uma das duas vias deste Termo, cujas páginas deverão ser rubricadas e a última página assinada. E, para garantir o seu direito a receber todo e qualquer tipo de esclarecimento sobre a sua participação na pesquisa, desde o seu recrutamento até após a finalização, seguem, abaixo, os meus meios de contato:

<i>Paula de Novaes Sarcinelli</i> Assinatura da Pesquisadora Responsável	
Local:	Data:
E-mail:	paula@ensp.fiocruz.br
Endereço Funcional:	Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (Cesteh) Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (Ensp) Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) – Ministério da Saúde Rua Leopoldo Bulhões, 1480 – Prédio Primeiro de Maio
Telefones para contato:	Telefone: (0xx) (21) 2598-2434

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios da minha participação na Pesquisa e que concordo em participar.

Nome do Participante da Pesquisa (por extenso)	
Assinatura do Participante da Pesquisa	
Local:	Data:
E-mail do Participante da Pesquisa:	
Telefones para contato:	

Em caso de dúvida quanto à condução ética do estudo entre em contato com o: Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) Ensp/Fiocruz – MS, localizado na Rua Leopoldo Bulhões, 1480 – Pavilhão Emani Braga – Térreo – Manguinhos - Telefax: (0xx) (21) 2598-2863 - E-mail: cep@ensp.fiocruz.br - Site: <http://www.ensp.fiocruz.br/ética>

MÓDULO 2: INFORMAÇÕES SOBRE EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL

63(20) Qual sua situação atual no mercado de trabalho?

1-Empregado registrado CLT 5-Cooperativado 9-NS/NR
 2-Empregado não registrado 6-Aposentado
 3-Autônomo / conta própria 7-Empregador
 4-Trabalho temporário 8-Outros: _____

(21) Você é sindicalizado? 1-Sim 0-Não 9-NS/NR

(21a) Se sim, qual o sindicato? _____

(22) Com que idade começou a trabalhar em postos de combustíveis? _____ anos 9-NS/NR

(23) Antes de trabalhar neste posto de abastecimento, quais trabalhos que o sr (a) permaneceu por mais tempo?

ONDE?	O QUE FAZIA?	POR QUANTO TEMPO?	
		Nº.	Meses/Ano

(24) Qual sua ocupação atual?

(24.1) Qual ou quais atividade(s) que o sr (a) desempenha nessa ocupação?

(25) Há quanto tempo o sr (a) trabalha nesta ocupação? _____ 9-NS/NR

(26) Qual seu horário de trabalho predominante?

1- |__|__| às |__|__| 9-NS/NR

(26.1) Turno:

1-Turno Fixo 2-Turno Alternado 9-NS/NR
 3- Outros: _____

(27) O sr (a) tem folga?	
<input type="checkbox"/> 1-Sim	
<input type="checkbox"/> 0-Não (Passe para a pergunta 30)	
<input type="checkbox"/> 9-NS/NR	
(28) Quantos dias na semana o sr (a) tem de folga?	
n° de dias da semana __ __	<input type="checkbox"/> 9-NS/NR
(29) Suas folga (s) são em dias fixos ou alternados?	
<input type="checkbox"/> 1-Fixo	
<input type="checkbox"/> 2-Alternado	
<input type="checkbox"/> 9-NS/NR	
(30) Quais desses procedimentos o sr (a) realiza durante o seu trabalho? ENTREVISTADOR LEIA TODAS AS OPÇÕES	
A- Uso do paninho	<input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 0-Não <input type="checkbox"/> 9-NS/NR
B- Aproxima o rosto quando abastece até a boca	<input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 0-Não <input type="checkbox"/> 9-NS/NR
C- Cheira a tampa do carro antes de abastecer	<input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 0-Não <input type="checkbox"/> 9-NS/NR
D- Confia no bico automático	<input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 0-Não <input type="checkbox"/> 9-NS/NR
E- Aspira combustíveis com a mangueira	<input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 0-Não <input type="checkbox"/> 9-NS/NR
F- Roupa molhada de combustível	<input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 0-Não <input type="checkbox"/> 9-NS/NR
G- Lava carros	<input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 0-Não <input type="checkbox"/> 9-NS/NR
H- Uso do querosene ou outra substância para dar brilho no carro	<input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 0-Não <input type="checkbox"/> 9-NS/NR
I- Outro?	
II- <input type="checkbox"/> 1-Sim Qual: _____	<input type="checkbox"/> 0-Não <input type="checkbox"/> 9-NS/NR
(31) Quais combustíveis o sr(a) abastece? ENTREVISTADOR LEIA TODAS AS OPÇÕES	
<input type="checkbox"/> 1-Gasolina Comum	<input type="checkbox"/> 4-Etanol <input type="checkbox"/> 9-NS/NR
<input type="checkbox"/> 0-Gasolina Aditivada	<input type="checkbox"/> 5-GNV
<input type="checkbox"/> 3-Diesel	<input type="checkbox"/> 6-Outros: _____
(32) O sr(a) realiza (ou) coleta de amostras do caminhão tanque?	
<input type="checkbox"/> 1-Sim	
<input type="checkbox"/> 0-Não (Passe para a questão 35)	2- <input type="checkbox"/> Continua realizando
<input type="checkbox"/> 9-NS/NR	

<p>(33) Caso o sr(a) tenha realizado amostras no caminhão tanque, por quanto tempo fez isto?</p> <p>Tempo: __ __ meses / anos</p> <p>Quantas vezes na semana __ __ </p>
<p>(34) O sr(a) usa equipamentos diferentes do uniforme durante as coletas do caminhão tanque?</p> <p><input type="checkbox"/> 1-Sim Quais: _____</p> <p><input type="checkbox"/> 0-Não</p> <p><input type="checkbox"/> 9-NS/NR</p>
<p>(35) O sr(a) realiza análise de qualidade do combustível a partir das amostras do caminhão tanque?</p> <p><input type="checkbox"/> 1-Sim Há quanto tempo: __ __ meses / anos Quantas vezes na semana __ __ </p> <p><input type="checkbox"/> 0-Não <input type="checkbox"/> 9-NS/NR</p>
<p>(36) Onde são armazenadas as amostras de combustíveis?</p> <p>A- <input type="checkbox"/> escritório B- <input type="checkbox"/> sala de refeição/refeitório C- <input type="checkbox"/> loja de conveniência D- <input type="checkbox"/> banheiro</p> <p>E- <input type="checkbox"/> sala exclusiva para armazenar combustível F- <input type="checkbox"/> outro local fora do posto</p> <p>G- <input type="checkbox"/> Outros: Quais: _____</p> <p><input type="checkbox"/> 9-NS/NR</p>
<p>(37) O sr(a) realiza ou já realizou medição manual (com régua) dos níveis dos tanques do subsolo?</p> <p><input type="checkbox"/> 1-Sim Como: _____</p> <p><input type="checkbox"/> 0-Não (Passe para a questão 40)</p> <p><input type="checkbox"/> 9- NS/NR</p>
<p>(38) Por quanto tempo o sr(a) realizou este tipo de medição dos níveis dos tanques do subsolo?</p> <p>Tempo: __ __ meses / anos Quantas vezes na semana __ __ </p> <p><input type="checkbox"/> 9-NS/NR</p>
<p>(39) O sr(a) fez uso de algum equipamento além do uniforme durante a medição dos níveis dos tanques do subsolo?</p> <p><input type="checkbox"/> 1-Sim Quais: _____</p> <p><input type="checkbox"/> 0-Não <input type="checkbox"/> 9-NS/NR</p>

(40) O sr(a) já realizou limpeza da caixa separadora de água e óleo?				
<input type="checkbox"/> 1-Sim - Por quanto tempo? _ _ meses / anos 2- <input type="checkbox"/> Continua realizando				
Quantas vezes na semana _ _				
<input type="checkbox"/> 0-Não		<input type="checkbox"/> 9-NS/NR		
(41) O sr(a) já realizou troca de óleo de carro?				
<input type="checkbox"/> 1-Sim – Por quanto tempo? _ _ meses / anos 2- <input type="checkbox"/> Continua realizando				
Quantas vezes na semana _ _				
<input type="checkbox"/> 0-Não		<input type="checkbox"/> 9-NS/NR		
(42) O sr(a) já realizou aferição da bomba de combustível?				
<input type="checkbox"/> 1-Sim – Por quanto tempo? _ _ meses / anos 2- <input type="checkbox"/> Continua realizando				
Quantas vezes na semana _ _				
<input type="checkbox"/> 0-Não		<input type="checkbox"/> 9-NS/NR		
(43) O sr(a) já realizou drenagem da bomba de combustível? (sump da bomba)				
<input type="checkbox"/> 1-Sim – Por quanto tempo? _ _ meses / anos 2- <input type="checkbox"/> Continua realizando				
Quantas vezes na semana _ _				
<input type="checkbox"/> 0-Não		<input type="checkbox"/> 9-NS/NR		
(44) Algumas desses eventos foram sofridos pelo sr (a) nesta função? Quantas vezes?				
A- Assaltos	<input type="checkbox"/> 1-Sim	<input type="checkbox"/> 0-Não	<input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/>
B- Atropelamentos	<input type="checkbox"/> 1-Sim	<input type="checkbox"/> 0-Não	<input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/>
C- Incêndio / explosão	<input type="checkbox"/> 1-Sim	<input type="checkbox"/> 0-Não	<input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/>
D- Vazamento de combustível no posto	<input type="checkbox"/> 1-Sim	<input type="checkbox"/> 0-Não	<input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/>
E- Exposição ao combustível (banho/intoxicação)	<input type="checkbox"/> 1-Sim	<input type="checkbox"/> 0-Não	<input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/>
F- Vazamento de gás (GNV)	<input type="checkbox"/> 1-Sim	<input type="checkbox"/> 0-Não	<input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/>
G- Queimadura	<input type="checkbox"/> 1-Sim	<input type="checkbox"/> 0-Não	<input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/>
H- Vazamento de combustível no carro do cliente	<input type="checkbox"/> 1-Sim	<input type="checkbox"/> 0-Não	<input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/>
I- Discussão com cliente	<input type="checkbox"/> 1-Sim	<input type="checkbox"/> 0-Não	<input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/>
J- Outro:	<input type="checkbox"/> 1-Sim	Quais: _____		<input type="checkbox"/>
				<input type="checkbox"/> 0-Não

EXPOSIÇÃO ATUAL:

POR FAVOR, INFORME TODAS AS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS AS QUAIS O(A) SR.(A) É EXPOSTO NESTE TRABALHO ATUAL.

SUBSTÂNCIAS E PRODUTOS QUÍMICOS

45. O (a) sr(a) tem contato ou sente o cheiro de?	46. Com que frequência o (a) sr(a) tem contato ou sente cheiro de? <i>Entrevistador:</i> <u>Leia as alternativas</u>
A. Gasolina <input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/> 1-Diariamente <input type="checkbox"/> 2-Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana <input type="checkbox"/> 3- Raramente/Nunca <input type="checkbox"/> 4- Não tem contato <input type="checkbox"/> 9-NS/NR
B. Etanol (Álcool) <input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/> 1-Diariamente <input type="checkbox"/> 2-Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana <input type="checkbox"/> 3- Raramente/Nunca <input type="checkbox"/> 4- Não tem contato <input type="checkbox"/> 9-NS/NR
C. Diesel <input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/> 1-Diariamente <input type="checkbox"/> 2-Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana <input type="checkbox"/> 3- Raramente/Nunca <input type="checkbox"/> 4- Não tem contato <input type="checkbox"/> 9-NS/NR
D. GNV <input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/> 1-Diariamente <input type="checkbox"/> 2-Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana <input type="checkbox"/> 3- Raramente/Nunca <input type="checkbox"/> 4- Não tem contato <input type="checkbox"/> 9-NS/NR
E. Fumaças de carro, caminhão e motos <input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/> 1-Diariamente <input type="checkbox"/> 2-Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana <input type="checkbox"/> 3- Raramente/Nunca <input type="checkbox"/> 4- Não tem contato <input type="checkbox"/> 9-NS/NR
F. Querosene <input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/> 1-Diariamente <input type="checkbox"/> 2-Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana <input type="checkbox"/> 3- Raramente/Nunca <input type="checkbox"/> 4- Não tem contato <input type="checkbox"/> 9-NS/NR
G. Óleo lubrificante <input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/> 1-Diariamente <input type="checkbox"/> 2-Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana <input type="checkbox"/> 3- Raramente/Nunca <input type="checkbox"/> 4- Não tem contato <input type="checkbox"/> 9-NS/NR
H. Produtos de Limpeza especificar: _____ <input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/> 1-Diariamente <input type="checkbox"/> 2-Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana <input type="checkbox"/> 3- Raramente/Nunca <input type="checkbox"/> 4- Não tem contato <input type="checkbox"/> 9-NS/NR

45. O (a) sr(a) tem contato ou sente o cheiro de?	46. Com que frequência o (a) sr(a) tem contato ou sente cheiro de? <u>Entrevistador:</u> <u>Leia as alternativas</u>
I. Graxa e cera <input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/> 1-Diariamente <input type="checkbox"/> 2-Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana <input type="checkbox"/> 3- Raramente/Nunca <input type="checkbox"/> 4- Não tem contato <input type="checkbox"/> 9-NS/NR
J. Solventes, removedores, aguarrás, thinner <input type="checkbox"/> 1-Sim <input type="checkbox"/> 2-Não <input type="checkbox"/> 9-NS/NR	<input type="checkbox"/> 1-Diariamente <input type="checkbox"/> 2-Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana <input type="checkbox"/> 3- Raramente/Nunca <input type="checkbox"/> 4- Não tem contato <input type="checkbox"/> 9-NS/NR
L. Outros, Especificar: _____ _____ _____	<input type="checkbox"/> 1-Diariamente <input type="checkbox"/> 2-Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana <input type="checkbox"/> 3- Raramente/Nunca <input type="checkbox"/> 4- Não tem contato <input type="checkbox"/> 9-NS/NR
M. Outros, Especificar: _____ _____ _____	<input type="checkbox"/> 1-Diariamente <input type="checkbox"/> 2-Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana <input type="checkbox"/> 3- Raramente/Nunca <input type="checkbox"/> 4- Não tem contato <input type="checkbox"/> 9-NS/NR
N. Outros, Especificar: _____ _____ _____	<input type="checkbox"/> 1-Diariamente <input type="checkbox"/> 2-Semanalmente <input type="checkbox"/> vezes da semana <input type="checkbox"/> 3- Raramente/Nunca <input type="checkbox"/> 4- Não tem contato <input type="checkbox"/> 9-NS/NR

PERCEPÇÃO DO ENTREVISTADOR:

A - Confiança nas respostas:

- Confio totalmente
- Confio Parcialmente
- Não Confio

OBSERVAÇÕES: _____

ANEXO C - ARTIGO

RBSO

Revista Brasileira de Saúde Ocupacional
ISSN: 2317-6369 (online)
http://dx.doi.org/10.1590/2317-6369000124515

Dossiê: Benzeno em Postos de Combustíveis



Artigo

Isabele Campos Costa Amara¹
Leandro Vargas Barreto de Carvalho²
Joyce Neri da Silva Pimenta³
Angélica Cardoso Pereira⁴
Jucilene Aparecida Vieira⁵
Vinício Soares de Castro⁶
Renato Marquillo Borges⁷
Sérgio Rabello Alves⁸
Simone Mitri Nogueira⁹
Marianne de Medeiros Tabalpa¹⁰
Ubirani Barros Otero¹¹
Kátia Maria Pinto Guedes de Oliveira¹²
Sérgio Machado Correia¹³
Antônio Sérgio Almeida Fonseca¹⁴
Josino Costa Moreira¹⁵
Frederico Peres¹⁶
Liliane Reis Teixeira¹⁷
Marco Antônio Carneiro Menezes¹⁸
Rita de Cássia Oliveira da Costa Mattos¹⁹
Paula de Novaes Sarcinelli²⁰
Ariane Leites Larentis²¹

Avaliação ambiental de BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos) e biomarcadores de genotoxicidade em trabalhadores de postos de combustíveis

Environmental assessment of BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes) and biomarkers of genotoxicity in gas stations workers

Resumo

Introdução: trabalhadores de postos de combustíveis estão expostos às diversas substâncias químicas presentes no ambiente de trabalho, destacando-se entre elas o benzeno, devido às suas propriedades carcinogênicas. **Objetivo:** avaliar os danos genotóxicos relacionados à exposição ocupacional ao BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno, xilenos) em trabalhadores de cinco postos de combustíveis do município do Rio de Janeiro, RJ. **Metodologia:** foram analisadas concentrações de BTEX no ar; atividades das enzimas catalase e glutathione S-transferase; e ensaio cometa em amostras de sangue total de 97 trabalhadores. **Resultados:** as concentrações de BTEX estavam dentro dos valores preconizados pela NR 15, incluindo Anexo 13-A. Entretanto, uma oscilação nos resultados de ensaio cometa foi observada entre os trabalhadores dos diferentes postos de combustíveis, principalmente em trabalhadores de postos com menores concentrações de benzeno. **Discussão:** esse resultado está de acordo com a literatura científica atual, que indica uma curva dose-resposta supralinear para o benzeno, observando-se em baixas concentrações um aumento não linear do risco de leucemia, provavelmente relacionado à maior metabolização do benzeno e à maior produção de seus metabólitos tóxicos nessas concentrações. **Conclusão:** os resultados deste estudo sugerem que a exposição ao BTEX, mesmo em baixas concentrações, contribui para o risco genotóxico à saúde humana. **Palavras-chave:** saúde ocupacional; postos de combustíveis; BTEX; ensaio cometa; estresse oxidativo.

Abstract

Introduction: gas station workers are exposed to several chemicals in their workplace, highlighting benzene, due to its carcinogenic properties. **Objective:** to assess the genotoxic damage related to occupational exposure to BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene, xylenes) in workers of five gas stations in Rio de Janeiro, RJ. **Methods:** analysis of BTEX concentrations in the air were carried out, as well as activities of catalase and glutathione S-transferase, and comet assay in whole blood samples of 97 workers. **Results:** BTEX levels were within the Brazilian threshold levels recommended by the NR 15, including Annex 13-A. However, an oscillation of the comet assay results was observed among workers of different gas stations, mainly in workers from gas stations with lower concentrations of benzene. **Discussion:** this result is in accordance with the current international scientific literature that indicates a supralinear exposure-response curve for benzene. In lower concentrations we could observe a high non-linear risk of leukemia, probably due to a greater benzene metabolism and a higher production of its toxic metabolites. **Conclusion:** the results of this study suggest that exposure to BTEX, even in low concentrations, contributes to genotoxic risk to human health.

Keywords: occupational health; gas stations; BTEX; comet assay; oxidative stress.

¹Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca (ENSP), Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana (CESTEH), Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

²Instituto Nacional do Câncer (INCA), Coordenação de Prevenção e Vigilância, Área de Vigilância do Câncer Relacionado ao Trabalho e ao Ambiente, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

³Universidade Federal Fluminense (UFF), Campus do Valonguinho, Departamento de Química, Niterói, RJ, Brasil.

⁴Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ), Departamento de Química e Ambiental, Resende, RJ, Brasil.

Contato:
Isabele Campos Costa Amara
E-mail:
costa.isabele@gmail.com

Os autores declaram não haver conflitos de interesses.

Este artigo faz parte do projeto "Caracterização de riscos relacionados à exposição ocupacional ao benzeno em postos de gasolina do município do Rio de Janeiro: estudo-piloto" desenvolvido por meio de parceria entre os autores e suas respectivas instituições.

Este estudo recebeu fomento através de cooperação interinstitucional (2010-2012) com a Coordenação Geral de Vigilância em Saúde Ambiental (CGVAM/SVS/Ministério da Saúde), do Programa Inova-ENSP (Edital 2013-2015 do Programa de Apoio à Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação em Saúde Pública da ENSP/Fiocruz), Edital Fapej nº 32/2013 – Programa Apoio às Instituições de Ensino e Pesquisa Sedeadas no Estado do Rio de Janeiro – 2013 (Processo E-26/11.732/2013) e do Chamamento Público nº 05/2014 – Iniciativas Educacionais Aplicadas à Vigilância em Saúde da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS), por meio do CESTEHE, Centro Colaborador da OPAS/OMS para Saúde Pública e Ambiental.

Os autores informam que o trabalho não foi baseado em tese e não foi apresentado em reunião científica.

Submetido: 14/09/2015
Revisado: 08/07/2016
Aprovado: 11/07/2016

Introdução

Contaminações ambientais e ocupacionais relacionadas a postos de combustíveis atingem um grande número de trabalhadores^{1,2} e residentes no entorno dos postos, especialmente as contaminações relacionadas à gasolina, combustível fóssil derivado do petróleo e de grande consumo no Brasil e no mundo^{3,4}. A gasolina é uma mistura complexa de frações líquidas leves do petróleo, contendo diversos hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos⁵, como benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos (BTEX), compostos lipossolúveis e tóxicos que agem como depressores do sistema nervoso central e apresentam toxicidade mesmo em baixas concentrações⁶. Além disso, dentre os BTEX, o benzeno destaca-se como o principal composto de relevância toxicológica, devido aos seus efeitos à saúde humana, como síndromes mielodisplásticas (SMD) e, principalmente, a seu efeito carcinogênico, como leucemia mieloide aguda (LMA)⁷⁻⁹. Com isso, mesmo que as concentrações de benzeno sejam menores que 1% na gasolina, como estabelecido pela Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), o estímulo ao consumo de combustíveis fósseis oriundos da cadeia produtiva do petróleo como política de desenvolvimento econômico, faz com que a exposição ao benzeno a partir da gasolina tenha grande influência no âmbito da saúde ambiental e ocupacional^{10,11}.

O benzenismo corresponde ao conjunto de sinais e sintomas decorrentes da exposição ao benzeno. Seu diagnóstico, de natureza ocupacional, é eminentemente clínico e epidemiológico, fundamentando-se na história de exposição ocupacional e na observação de sintomas e sinais clínicos e laboratoriais dos expostos^{12,13}. O mecanismo de ação da toxicidade

hematopoiética do benzeno ainda permanece em grande parte desconhecido, tanto no desenvolvimento de citopenias periféricas quanto no processo leucogênico da LMA^{14,15}. Meek e Klaunig¹⁴ descreveram uma etapa crítica, relacionada à exposição ao benzeno, que inclui necessariamente um dano oxidativo ao DNA e às macromoléculas celulares importantes, induzindo a mutações e à proliferação clonal das células mutadas. Evidências indicam que os metabólitos do benzeno podem interferir no ciclo celular, induzir apoptose de células precursoras do sistema hematopoiético e alterar importantes vias de sinalização celular, resultando em citotoxicidade^{15,16}. Com isso, espécies reativas de oxigênio (EROs), por intermédio de danos oxidativos no DNA (quebras, formação de adutos), parecem estar associadas à exposição ao benzeno e ao aparecimento de seus efeitos, sendo necessários indicadores sensíveis no monitoramento biológico de populações expostas, como o ensaio cometa e outros indicadores de

genotoxicidade. Essas espécies reativas podem gerar dano celular, inclusive no material genético, e, dessa forma, os indicadores de estresse oxidativo e o ensaio cometa têm relação direta na avaliação do potencial de dano derivado desse tipo de exposição¹⁷. Entre os indicadores biológicos de efeito estão as enzimas catalase (CAT) e glutatona S-transferase (GST), que correspondem a fatores de proteção para o estresse oxidativo. A CAT atua na degradação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a GST, enzima de biotransformação de fase II, conjuga a glutatona na molécula do benzeno pela ligação com o grupo-tiol, favorecendo o processo de eliminação do benzeno pelo organismo¹⁷.

O ensaio cometa, também conhecido como Single-Cell Gel (SCG) ou Single-Cell Gel Electrophoresis (SCGE), é um teste de genotoxicidade utilizado na detecção de lesões genômicas, que, após serem processadas pelo aparato enzimático celular de reparo do DNA, podem ser corrigidas ou levadas a mutações e danos cromossômicos^{18,19}. Uma vez que danos no DNA são frequentemente célula- e tecido-específicos, uma técnica como a do ensaio cometa, que permite a detecção de danos e seus reparos em uma única célula ou em determinada subpopulação celular, é de extrema relevância para a avaliação da genotoxicidade de diferentes compostos^{18,19}. Sendo assim, o ensaio cometa possui amplas aplicações, como testes de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, no biomonitoramento ambiental e no monitoramento populacional humano²⁰. A aplicação do ensaio cometa no monitoramento populacional humano objetiva avaliar o nível dos danos ao DNA provocados por exposição a compostos tóxicos, estudar os efeitos ou fatores que contribuem para o aparecimento de doenças e investigar variações individuais, como a capacidade de reparo do DNA ou resistência antioxidante¹⁸.

No Brasil, estudos sobre avaliação toxicológica de trabalhadores de postos de combustíveis com monitoramento biológico ainda são insuficientes e escassos frente à demanda desses trabalhadores e à real situação de risco em que se encontram. De acordo com Moura-Correa et al.²¹, a exposição ocupacional relacionada a postos de combustíveis atinge 184.733 frentistas distribuídos em 39.450 postos de venda de combustíveis em todo o país. Até o presente momento, estudos sobre genotoxicidade com trabalhadores de postos de combustíveis brasileiros foram publicados por Benites et al.²², Moro et al.¹⁷, Rosa et al.²³, Trevisan et al.²⁴, Santiago et al.²⁵, Mítri et al.²⁶, Lacerda et al.²⁷.

Moro et al.¹⁷ avaliaram a exposição ao BTEX empregando ensaio cometa, micronúcleo e indicadores de estresse oxidativo (GSH, SOD, CAT e GST), e encontraram danos maiores no material genético de trabalhadores expostos em comparação ao grupo

controle. Entretanto, comparações de indicadores de genotoxicidade e estresse oxidativo entre trabalhadores de postos de combustíveis com diferentes níveis de concentração ambiental ainda não foram realizadas. Dessa forma, este artigo tem como objetivo avaliar os danos genotóxicos relacionados à exposição ocupacional ao BTEX em trabalhadores de diferentes postos de combustíveis da Zona Norte do município do Rio de Janeiro, por meio da técnica de ensaio cometa, da análise dos níveis de enzimas do estresse oxidativo (CAT e GST) e da determinação analítica dos BTEX no ar.

Metodologia

Este artigo corresponde a um estudo transversal, cuja seleção dos postos de combustíveis ocorreu de forma conveniente, realizada juntamente com o Sindicato dos Empregados em Postos de Serviços de Combustíveis e Derivados de Petróleo do Estado do Rio de Janeiro (Sinpospetro-RJ) a partir do cadastro dos postos de combustíveis do município do Rio de Janeiro. Segundo dados fornecidos pelo Sinpospetro-RJ, existem 3.080 postos revendedores de combustíveis no estado do Rio de Janeiro, sendo 1.108 localizados no município do Rio de Janeiro. De acordo com a Secretaria Municipal de Urbanismo, o município do Rio de Janeiro é dividido em cinco grandes áreas de planejamento subdivididas em regiões administrativas (RA) geograficamente delimitadas por seus respectivos bairros ou regiões de favelas. De forma conveniente, devido à proximidade, foram selecionadas as RA VII, VIII, IX, X e XIII como área de estudo. Posteriormente, para cada RA, foi sorteado um bairro (Bonsucesso, São Cristóvão, Tijuca, Vila Isabel e Lins de Vasconcelos) e, em seguida, para cada bairro foi sorteado um posto. Os critérios para a seleção foram a acessibilidade do posto, seu consentimento em participar do estudo e sua regulamentação.

Foram incluídos na pesquisa trabalhadores de ambos os sexos, com idade superior a 18 anos. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da ENSP/Fiocruz sob o protocolo CAAE-0021.0.031.000-10. Todos os proprietários dos postos foram contactados previamente, autorizaram a pesquisa e assinaram os devidos termos de anuência. Além disso, a aplicação do questionário e as coletas ambientais e biológicas foram realizadas no local de trabalho, sempre que possível em ambiente privado, buscando-se minimizar possíveis influências na coleta de dados.

O questionário, aplicado individualmente, continha questões abertas e fechadas, relativas a idade, sexo, histórico de exposição, tempo de trabalho,

tempo na função exercida, consumo de álcool e fumo e características do perfil sociodemográfico.

Avaliação ambiental

A avaliação ambiental foi realizada em cada posto por meio da determinação das concentrações de BTEX no ar do ambiente de trabalho por um período máximo de três meses entre a primeira e a última coleta. As amostras de ar foram coletadas em cartuchos de carvão ativo da marca SKC (Anasorb CSC SKC - 226-01 com leitos de 100 e 50 mg) específicos para BTEX, com auxílio de bombas coletoras de ar SKC (PCXR4) calibradas para vazão de 1,0 L min⁻¹. As amostras foram extraídas com 1,0 mL de diclorometano a -20 °C e analisadas por Cromatografia Gasosa com Detector Seletivo de Massas (CG-DSM) em um equipamento Varian 450GC MS220²⁸. Os pontos de amostragem foram posicionados a 1,5 m de altura do solo na área de circulação dos trabalhadores envolvidos no estudo, próximos às bombas de combustíveis, sendo o ar coletado durante um período médio de 40 minutos por amostra. Tanto o tempo de duração da amostragem quanto a sua vazão foram validados anteriormente por Corrêa et al.²⁸ e utilizados neste estudo.

É importante ressaltar que a eficácia da amostragem foi testada por meio da análise de BTEX no leito principal e no leito secundário dos cartuchos, tendo como critério a quantidade de BTEX no leito secundário permanecer inferior a 5% da quantidade contida no leito primário, garantindo a sua não saturação. O número de amostras coletadas por dia de avaliação ambiental variou entre um e três de acordo com o tamanho do posto. Em cada posto, buscou-se contemplar os períodos de trabalho da manhã e da tarde, com avaliações ambientais feitas em quatro dias diferentes e em horários alternados, com a finalidade de se ter uma amostragem mais representativa das condições ambientais dos postos²⁹. Além disso, a dispersão dos BTEX no ambiente ao redor dos pos-

tos de combustíveis também foi avaliada. Pontos posicionados a aproximadamente 200 metros de distância das bombas de combustível da amostragem, seguindo a direção do vento, foram utilizados como controle. Para análise da dispersão, amostras diárias foram coletadas em cada um dos postos durante os quatro dias de avaliação, seguindo os mesmos critérios descritos anteriormente.

Avaliação biológica

A avaliação biológica foi realizada mediante análise dos indicadores biológicos de genotoxicidade e estresse oxidativo. A avaliação da genotoxicidade se deu por meio da análise de ensaio cometa; e a avaliação dos parâmetros enzimáticos do estresse oxidativo

pela determinação das atividades das enzimas CAT e GST. As amostras de sangue total foram coletadas em tubos a vácuo com EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) para a realização de hemograma completo, e com heparina para as análises de ensaio cometa, CAT e GST. As amostras coletadas foram transportadas em recipiente adequadamente refrigerado até os locais de análise.

Ensaio cometa

Alíquotas de 5 μL de sangue total foram misturadas homogeneamente a 120 μL de agarose de baixo ponto de fusão, sendo sequencialmente adicionadas sobre uma lâmina previamente revestida com agarose de ponto de fusão normal. As lâminas foram imersas em solução de lise celular por 24 horas. Após essa etapa, as lâminas foram deixadas por 20 minutos em tampão alcalino e, posteriormente, submetidas a eletroforese sob as condições fixadas em 25 V e 300 mA por 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram neutralizadas com posterior fixação em etanol PA e secagem. Para revelação, as lâminas foram coradas com prata [Ag] e visualizadas em microscópio visível com aumento de 400x. Um total de 100 nucleóides (50 por lâmina) foram analisados por classificação visual, de acordo com o comprimento da cauda. A classificação foi realizada em 5 categorias (0, 1, 2, 3, 4), (0) = menor dano e (4) = maior dano, sendo contabilizado o total de Unidades Arbitrárias (UA) por amostra. O total de UA variou entre 0 e 400 para cada amostra individual.

Catalase (CAT)

A atividade da enzima CAT foi determinada em sangue total empregando H_2O_2 como substrato pelo método espectrofotométrico de Aebi (1984)³⁰, que se baseia na quantificação da decomposição de 1 μmol de $\text{H}_2\text{O}_2/\text{min}$, monitorada em um comprimento de onda de 240 nm por 15 segundos.

Glutathione S-transferase (GST)

A atividade da enzima GST foi determinada em sangue total, empregando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno e glutathione reduzida como substrato pelo método espectrofotométrico de Habig (1981)³¹, que se baseia na quantificação da formação de 1 μmol do complexo analito GS-DNB/min, monitorada em um comprimento de onda de 340 nm por 60 segundos.

Análise estatística

A variabilidade dos dados da avaliação ambiental inerente à dispersão dos BTEX no ar foi examinada estatisticamente pelo teste *t* de Student, com intervalo de confiança de 95%³². Algumas amostras

apresentaram concentrações superiores de BTEX, pois durante a avaliação ambiental presenciou-se a atividade de abastecimento dos tanques subterrâneos em três postos de combustíveis avaliados. Esses resultados foram analisados separadamente, pois representam momentos de atividades distintas daquelas comumente exercidas pelos trabalhadores.

Na análise descritiva, foram calculadas médias e desvios-padrão das variáveis contínuas (concentração de BTEX, idade, tempo de trabalho em postos de combustíveis, tempo de trabalho na atual função, ensaio cometa, CAT e GST) e frequência percentual de distribuição das variáveis categóricas (sexo, função, consumo de álcool e hábito de fumar). A normalidade da distribuição das variáveis contínuas foi testada por meio do teste Kolmogorov-Smirnov com um nível de significância de 5%. Para comparação de variáveis com distribuição normal, foram utilizados os testes paramétricos *t* de Student ou ANOVA e para variáveis com distribuição não normal empregaram-se os testes não paramétricos Mann-Whitney (*U*) ou Kruskal-Wallis (*H*). Testes de correlação de Person (*r*) e de Spearman (*rho*) foram realizados para as variáveis contínuas com distribuição normal e não normal, respectivamente. As variáveis sexo e idade serviram como variáveis de controle. Os dados foram analisados com auxílio do programa SPSS for Windows versão 20.0.

Resultados

Participaram do estudo 97 trabalhadores oriundos de 5 postos de combustíveis localizados nos bairros de Bonsucesso, São Cristóvão, Tijuca, Vila Isabel e Lins de Vasconcelos, selecionados das RA VII, VIII, IX, X e XIII do município do Rio de Janeiro. Os resultados da avaliação ambiental, que correspondem às concentrações de BTEX nas amostras de ar coletadas nos cinco postos de combustíveis, são

apresentados na Tabela 1 em ordem crescente de concentração do benzeno.

As concentrações de benzeno no ar atmosférico foram menores nos Postos 1 e 2 em comparação aos outros postos de combustíveis. Para as concentrações de tolueno, etilbenzeno e xilenos, somente o Posto 1 apresentou diferença estatística quando comparado aos Postos 2, 3, 4 e 5. Em todos os postos, os resultados dos pontos de medição a 200 metros da área de circulação dos trabalhadores apresentaram concentrações de BTEX menores comparadas às concentrações dos pontos de amostragem próximos às bombas de combustível (Tabela 1). Os resultados dos cinco pontos de amostragem referentes à atividade de abastecimento dos tanques subterrâneos, presenciada durante a avaliação ambiental em três postos

de combustíveis, estão apresentados separadamente na Tabela 2.

As características sociodemográficas são apresentadas na Tabela 3. A amostra do estudo foi composta por 72% de homens e 28% de mulheres, com idade média de 40 e 32 anos, respectivamente, não havendo diferença estatística por meio do teste *t* de Student. A maior parte da população foi composta por frentistas (45,4% homens e 40,0% mulheres). A maioria dos entrevistados relatou fazer uso de bebida alcoólica (89,7% dos homens e 58,3% das mulheres) e não fumar (59,1% dos homens e 86,6% das mulheres). Não foi relatada a utilização de nenhum equipamento de proteção individual ou coletiva durante a jornada de trabalho, inclusive durante o recebimento de combustíveis e os testes de qualidade, atividades de maior exposição.

Os resultados das análises biológicas (ensaio cometa, CAT e GST) e dados ocupacionais (tempo de trabalho em postos de combustíveis e tempo de trabalho na atual função) foram comparados entre os

diferentes postos de combustíveis e são apresentados na Tabela 4.

Os resultados das análises biológicas foram comparados entre os grupos masculino e feminino, sendo encontrada diferença estatisticamente significativa para os resultados de CAT. Essa diferença entre os sexos, entretanto, não foi observada para a atividade da enzima GST e nem para os danos no DNA, avaliados por ensaio cometa. Além disso, a totalidade dos trabalhadores do grupo masculino apresentou média diferente do grupo feminino para tempo de trabalho em postos de combustíveis. Da mesma forma, foi encontrada uma diferença significativa das médias do tempo de trabalho na atual função entre os grupos masculino e feminino. Essa diferença estatística de médias dos dados ocupacionais também foi observada entre os grupos masculino e feminino do Posto 2. Não foi observada diferença significativa nas médias de idade dos trabalhadores entre os diferentes postos de combustíveis, tanto para o grupo masculino quanto para o feminino.

Tabela 1 Resultados da avaliação ambiental nos postos de combustíveis no município do Rio de Janeiro, em 2012. Concentrações médias de BTEX das amostras de ar coletadas

Postos avaliados	Posto 1		Posto 2		Posto 3		Posto 4		Posto 5	
	Pontos de medição		Pontos de medição		Pontos de medição		Pontos de medição		Pontos de medição	
	A	D	A	D	A	D	A	D	A	D
N	16	4	17	4	4	3	14	4	15	3
Benzeno ($\mu\text{g m}^{-3}$)	6,4 (2,3) ^{†*}	3,5 (2,0) [†]	27,2 (12,1) ^{††}	1,8 (25,6) [†]	373,7 (186,9) ^{†††}	60,9 (37,5) [†]	452,8 (358,0) ^{†††}	23,6 (50,0) [†]	492,5 (180,7) ^{†††}	75,6 (15,3) [†]
Tolueno ($\mu\text{g m}^{-3}$)	7,5 (3,8) ^{†*}	4,3 (2,3)	97,1 (39,7) ^{††}	8,5 (12,0) [†]	101,7 (63,0) ^{††}	14,2 (10,0) [†]	92,3 (39,7) ^{††}	10,1 (13,8) [†]	110,5 (29,6) ^{††}	18,1 (6,1) [†]
Etilbenzeno ($\mu\text{g m}^{-3}$)	3,2 (1,6) ^{†*}	1,5 (1,0)	24,4 (14,6) ^{††}	1,3 (3,7) [†]	32,5 (12,9) ^{††}	4,3 (3,1) [†]	32,2 (12,7) ^{††}	3,3 (4,4) [†]	41,8 (18,2) ^{††}	6,0 (1,4) [†]
Xilenos ($\mu\text{g m}^{-3}$)	9,1 (2,2) ^{†*}	4,6 (2,9)	72,9 (46,9) ^{††}	3,1 (5,8) [†]	102,6 (42,8) ^{††}	10,3 (6,2) [†]	96,1 (41,7) ^{††}	5,6 (9,0) [†]	132,2 (40,1) ^{††}	14,0 (3,1) [†]

Resultados expressos em média ponderada (desvio-padrão) com tempo de amostragem de 40 minutos. N = número total de amostras; A = ponto de medição na área de circulação do posto de combustível e D = ponto de medição a 200 m da área de circulação do posto de combustível. Comparação das médias das concentrações de BTEX entre A e D por posto de combustível, utilizando teste *t* de Student, considerando $p = p\text{-valor}$ ($p\text{-valor}$), [$\ddagger p < 0,05$], sendo \ddagger referente à diferença estatística entre os pontos de medição A e D. Comparação das médias das concentrações de BTEX de A e D entre os postos de combustíveis, utilizando teste ANOVA, considerando $p = p\text{-valor}$ ($p\text{-valor}$), [$\dagger p < 0,05$], sendo \dagger referente à diferença estatística em relação ao Posto 1; \ddagger referente à diferença estatística em relação ao Posto 2.

Tabela 2 Resultados da avaliação ambiental nos postos de combustíveis no município do Rio de Janeiro em 2012. Concentrações de BTEX das amostras coletadas durante a atividade de abastecimento dos tanques subterrâneos

Postos avaliados	Posto 1		Posto 3	Posto 4	
	1	2	3	4	5
Amostras					
Benzeno ($\mu\text{g m}^{-3}$)	19,1	21,9	1244,5	1036,8	991,2
Tolueno ($\mu\text{g m}^{-3}$)	33,9	15,2	192,3	165,6	264,8
Etilbenzeno ($\mu\text{g m}^{-3}$)	33,0	12,1	150,6	110,8	252,3
Xilenos ($\mu\text{g m}^{-3}$)	10,9	2,5	47,9	37,5	95,5

Resultados das concentrações com tempo de amostragem de 40 minutos

Tabela 3 Características sociodemográficas da população do estudo

Variáveis	Homens (N = 70)		Mulheres (N = 27)	
	N	%	N	%
Função				
Administrativa	12	18,2	15	60,0
Frentista	30	45,4	10	40,0
Borracheiro	7	10,6	0	0,0
Lavador	17	25,8	0	0,0
Consumo de álcool				
Não consomem	9	13,6	0	0,0
Consumem	46	69,7	14	58,3
Pararam o consumo	11	16,7	10	41,7
Hábito de fumar				
Não fumante	39	59,1	16	66,6
Fumante	15	22,7	4	16,7
Ex-fumante	12	18,2	4	16,7
Idade	40 (11) [†]		32 (8) [†]	

N = número total de casos. Idade expressa em média (desvio padrão). Comparação das médias de idade entre homens e mulheres, utilizando teste t de Student, considerando $p = p\text{-valor}$ ($p\text{-valor}$), [$\ddagger p < 0,05$], sendo \ddagger referente à diferença estatística entre homens e mulheres

Os dados ocupacionais “tempo de trabalho em postos” e “tempo de trabalho na atual função” apresentaram diferença significativa entre o Posto 2 e os Postos 1, 4 e 5, para o grupo masculino. A média de tempo de trabalho em postos de combustíveis também foi estatisticamente diferente entre os Postos 3 e 5 no grupo masculino. No grupo feminino, foi encontrada diferença significativa de tempo de trabalho na atual função entre o Posto 5 e os Postos 1 e 4 (Tabela 4).

Os resultados das análises biológicas foram comparados entre os diferentes postos de combustíveis. Os trabalhadores do sexo masculino dos Postos 1 e 2, com as menores concentrações de benzeno no ar atmosférico, apresentaram danos no material genético significativamente maiores quando comparados aos trabalhadores de mesmo sexo do Posto 3, o terceiro em maior concentração de benzeno. Além disso, os Postos 3 e 5 também apresentaram diferença significativa para o teste de ensaio cometa, sendo o dano no material genético maior no Posto 5. No grupo feminino, uma diferença significativa também pode ser observada entre o Posto 2 e os Postos 3 e 4; e entre o Posto 5 e os Postos 3 e 4. Essas mesmas diferenças entre os postos se mantêm quando somados os grupos masculino e feminino. A oscilação dos resultados de genotoxicidade por ensaio cometa pode ser melhor visualizada por meio das classificações dos danos no DNA, que precedem o resultado final expresso em unidades arbitrárias (UA).

É possível observar, tanto no grupo de homens (Figura 1a) quanto no grupo de mulheres (Figura 1b),

um aumento da classificação do dano 0 e uma diminuição da classificação do dano 1, ambos acentuados no Posto 3 e discrepantes dos Postos 1, 2 e 5. Com relação às enzimas do estresse oxidativo, apenas a CAT apresentou diferença significativa na comparação dos Postos 1 e 2 com os Postos 3, 4 e 5, no grupo masculino. No grupo feminino, essa diferença se mantém entre o Posto 3 e os postos 1, 4 e 5. Para o total da população, ou seja, juntando-se os grupos masculino e feminino, essa diferença entre os Postos permanece somente na comparação entre o Posto 2 com os Postos 3, 4 e 5.

Os resultados das análises dos indicadores biológicos, assim como os dados ocupacionais, também foram comparados entre as diferentes funções, classificadas como administrativa, frentista, borracheiro e lavador, e estão apresentados na Tabela 5. A função administrativa foi considerada a de menor exposição aos solventes da gasolina, e as funções de frentista e borracheiro consideradas as de maior exposição, de acordo com as observações das atividades de trabalho das respectivas funções.

A função de trabalho de frentista apresentou diferença entre os grupos masculino e feminino para todos os indicadores biológicos e dados ocupacionais. A atividade enzimática da CAT também apresentou diferenças estatísticas entre os sexos na função administrativa. Além disso, as funções de trabalho foram comparadas com relação ao sexo separadamente. Dos indicadores biológicos, o ensaio cometa apresentou diferença entre as funções administrativa e frentista no grupo feminino; a CAT, entre

as funções administrativa e lavador no grupo masculino. Entretanto, para o conjunto total da população de homens e mulheres, somente a CAT apresentou diferença entre a função administrativa e as funções de frentista e lavador, e entre as funções frentista e lavador. Dos dados ocupacionais, o tempo de trabalho na atual função apresentou diferença entre as funções administrativa e borracheiro somente no grupo masculino. Essa diferença se mantém quando agrupados os trabalhadores homens e mulheres. Além disso, o total da população também apresentou diferença nas médias de tempo de trabalho em postos de

combustíveis entre a função administrativa e as funções frentista e borracheiro.

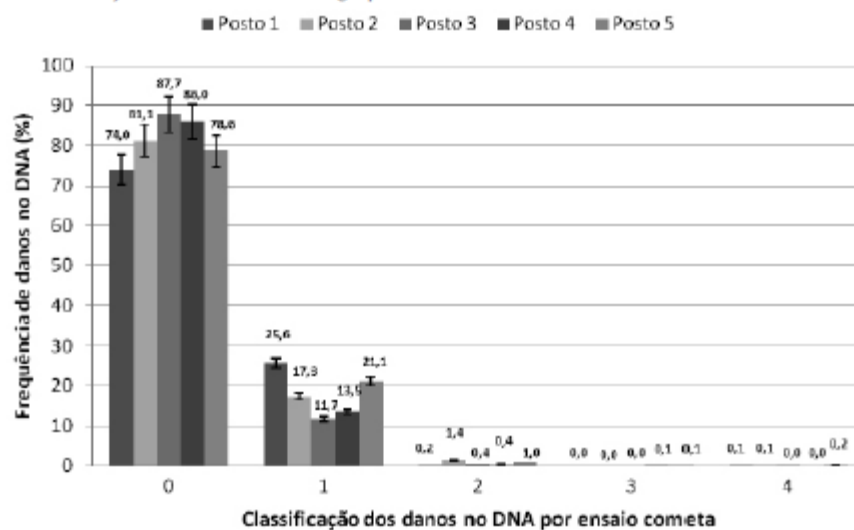
Por fim, os resultados dos indicadores biológicos e os dados ocupacionais foram analisados quanto à linearidade. O teste de ensaio cometa apresentou correlação negativa, por Spearman, com a atividade enzimática da GST ($p = 0,028$, $R = -0,228$) e com o tempo de trabalho na atual função ($p = 0,031$, $R = -0,232$). A atividade da enzima GST apresentou uma correlação positiva, por Pearson, com o tempo de trabalho na atual função ($p = 0,011$, $R = +0,276$) e negativa com ensaio cometa ($p = 0,0013$, $R = -0,256$).

Tabela 4 Comparação dos resultados dos indicadores biológicos e dos dados ocupacionais dos trabalhadores entre os diferentes postos de combustíveis

	Sexo	Posto 1	Posto 2	Posto 3	Posto 4	Posto 5	População global
N	M	13	9	23	13	13	71
	F	4	13	3	3	4	27
	M+F	17	21	26	16	17	97
Ensaio cometa (UA)	M	21 (15) [*]	20 (5) ^É	13 (15) ^{Éo}	16 (18)	22 (15) ^o	17 (15)
	F	1 (16)	25 (15) ^É	6 (4) ^{Éo}	8 (3) ^{Én}	27 (16) ^{no}	20 (15)
	M+F	20 (15) [*]	23 (13) ^É	12 (14) ^{Éo}	14 (16) ^{Én}	23 (15) ^{no}	18 (15)
Catalase (KU/g Hb)	M	210 (19) ^{ta}	211 (13) ^{ÉÉ}	195 (16) ^{ÉÉÉ}	194 (18) ^{ÉÉÉ}	195 (14) ^{ÉÉÉ}	199 (18) ^É
	F	265 (26) ^{ta}	252 (52) ^É	237 (48) ^{Éno}	255 (13) ^{Én}	253 (25) ^{Éo}	253 (35) ^É
	M+F	223 (32) [*]	235 (44) ^É	200 (20) ^{ÉÉ}	206 (30) ^É	209 (28) ^É	213 (33)
GST (U/g Hb)	M	7,9 (1,3)	7,2 (1,2)	9,1 (2,1)	7,8 (2,1)	7,2 (1,5)	8,1 (1,9)
	F	8,1 (1,8)	6,1 (2,2)	10,2 (2,5)	7,4 (2,7)	6,9 (2,3)	7,2 (2,4)
	M+F	8,0 (0,1)	6,6 (1,9)	9,2 (2,1)	7,7 (2,1)	7,2 (1,7)	7,9 (2,1)
Tempo de trabalho em posto (anos)	M	12 (13) [*]	27 (6) ^{ÉÉ}	18 (12)	14 (11) ^É	14 (9) ^É	16 (11) ^É
	F	6 (3)	10 (8) ^É	13 (11)	9 (13)	5 (6)	9 (8) ^É
	M+F	11 (12)	17 (10)	18 (12)	13 (11)	12 (9)	14 (11)
Tempo de trabalho na atual função (anos)	M	8 (9) [*]	16 (9) ^{ÉÉ}	14 (10) ^o	9 (8) ^É	6 (7) ^{Éo}	11 (9) ^É
	F	3 (2) [*]	4 (3) ^É	13 (11)	7 (8) ⁿ	1 (1) ^{no}	5 (6) ^É
	M+F	7 (8)	9 (9)	14 (11) ^o	8 (8)	4 (6) ^o	9 (9)

Resultados expressos em média (desvio-padrão). N = número total de trabalhadores; M = Masculino; F = Feminino; UA = unidade arbitrária; U = unidade ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$); Hb = hemoglobina. Comparação das médias dos indicadores (ensaio cometa, CAT, GST, tempo de trabalho em postos e tempo de trabalho na atual função) entre sexo (M e F) por posto de combustível, utilizando teste t de Student para GST e Mann-Whitney para os demais indicadores, considerando $p = p$ -valor (p -valor), [\bar{I}] $p < 0,05$, sendo \bar{I} referente à diferença estatística entre M e F. Comparação das médias dos indicadores (ensaio cometa, CAT, GST, tempo de trabalho em postos e tempo de trabalho na atual função) entre os postos de combustíveis, utilizando teste ANOVA para GST e teste Kruskal-Wallis para os demais indicadores, considerando $p = p$ -valor (p -valor), [\bar{I}] \bar{I} e \bar{I} $p < 0,05$, sendo \bar{I} referente à diferença estatística em relação ao Posto 1; \bar{E} referente à diferença estatística em relação ao Posto 2; \bar{o} referente à diferença estatística em relação ao Posto 3; \bar{n} referente à diferença estatística em relação ao Posto 4

a – Classificação dos danos de DNA no grupo de homens



b – Classificação dos danos de DNA no grupo de mulheres

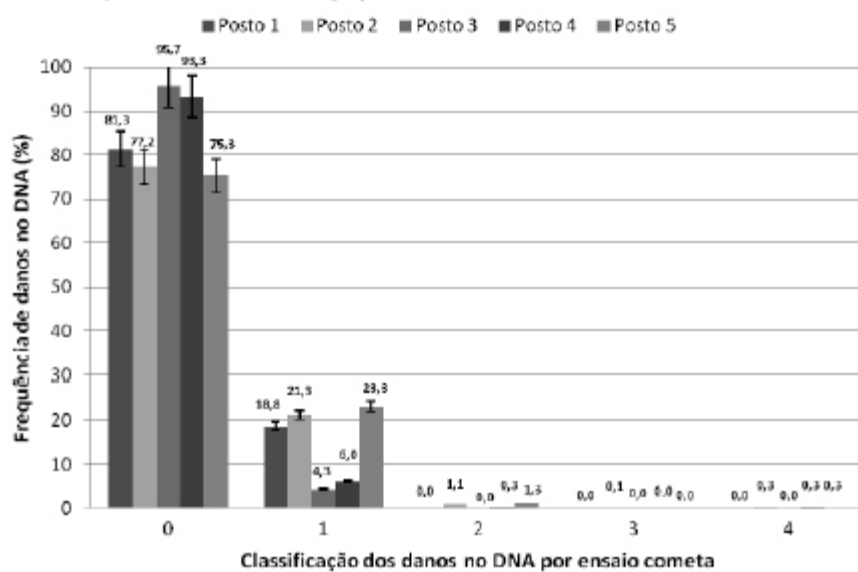


Figura 1 Classificação dos danos de DNA por ensaio cometa entre as populações dos diferentes postos de combustíveis combustíveis para homens (a) e mulheres (b)

Tabela 5 Comparação dos resultados dos indicadores biológicos e dos dados ocupacionais dos trabalhadores entre as diferentes funções de trabalho

	Sexo	Administrativa	Frentista	Borracheiro	Lavador
N	M	13	30	7	17
	F	15	10	0	0
	M+F	28	40	7	17
Ensaio cometa (UA)	M	19 (18)	17 (15) [†]	15 (9)	17 (16)
	F	15 (13) [*]	30 (16) ^{†*}	–	–
	M+F	17 (15)	20 (16)	15 (9)	17 (16)
Catalase (KU/g Hb)	M	206 (17) ^{†*}	200 (17) [†]	208 (17)	193 (15) [*]
	F	252 (18) [†]	258 (58) [†]	–	–
	M+F	231 (30) [*]	212 (38) ^{†E}	207 (17)	193 (15) ^{†E}
GST (U/g Hb)	M	7,7 (2,6)	8,0 (1,7) [†]	8,3 (1,6)	8,4 (2,0)
	F	7,7 (2,4)	6,3 (2,8) [†]	–	–
	M+F	7,8 (2,4)	7,6 (2,1)	8,3 (1,6)	8,4 (2,0)
Tempo de trabalho em posto (anos)	M	12 (12)	17 (10) [†]	24 (14)	15 (11)
	F	9 (8)	10 (7) [†]	–	–
	M+F	10 (10) [*]	15 (10) [*]	24 (14) [*]	15 (11)
Tempo de trabalho na atual função (anos)	M	7 (8) [*]	11 (10) [†]	16 (9) [*]	10 (9)
	F	6 (7)	3 (2) [†]	–	–
	M+F	6 (7) [*]	9 (9)	16 (9) [*]	10 (9)

Resultados expressos em média (desvio-padrão); N = número total de trabalhadores; M = Masculino; F = Feminino; UA = unidade arbitrária; U = unidade (L.mol⁻¹.cm⁻¹); Hb = hemoglobina; comparação das médias dos indicadores (ensaio cometa, CAT, GST, tempo de trabalho em postos e tempo de trabalho na atual função) entre sexo (M e F) por função de trabalho, utilizando teste t de Student para GST e Mann-Whitney para os demais indicadores, considerando $p = p$ -valor (p -valor), [$\ddagger p < 0,05$], sendo \ddagger referente à diferença estatística entre M e F; comparação das médias dos indicadores (ensaio cometa, CAT, GST, tempo de trabalho em postos e tempo de trabalho na atual função) entre as funções de trabalho, utilizando teste ANOVA para GST e teste Kruskal-Wallis para os demais indicadores, considerando $p = p$ -valor (p -valor), [$^* p < 0,05$], sendo * referente à diferença estatística em relação à função administrativa; E referente à diferença estatística entre as funções frentista e lavador

Discussão

Neste estudo, os resultados da avaliação ambiental, tanto na área de circulação dos trabalhadores próxima às bombas de abastecimento quanto a 200 metros de distância destas, apresentaram concentrações de BTEX dentro dos valores preconizados pela legislação brasileira, inclusive durante a atividade de abastecimento dos tanques subterrâneos, cuja atividade apresentou os pontos de maior exposição^{33,34}. Os Postos 1 e 2 apresentaram as menores concentrações de BTEX no ar atmosférico, o que pode ser explicado pelo fato desses postos estarem localizados em uma área com poucos prédios ao seu redor, o que facilita a dispersão dos vapores de BTEX. Por sua vez, com as maiores concentrações de BTEX, o Posto 5 está localizado em uma área com muitos prédios ao seu redor. Além disso, trata-se de um posto de grande porte, com grande volume de vendas, o que influencia a dispersão dos vapores.

É importante ressaltar que, mesmo com os resultados da avaliação ambiental apresentando concentrações de benzeno abaixo do Valor de Referência Tecnológico de 1 ppm ou 3,19 mg.m⁻³, estabelecido pela NR 15 (Anexo 13-A)³³ para setores de atividade com benzeno, tal fato não exclui o risco à saúde humana, pois não existe limite de exposição seguro para substâncias carcinogênicas, como no caso do benzeno. Da mesma forma, para tolueno, xilenos e etilbenzeno, mesmo com concentrações no ar atmosférico dentro dos limites estabelecidos pela NR 15 (460 mg.m⁻³ para tolueno; 340 mg.m⁻³ para xilenos e etilbenzeno)³⁴, não há estudos que comprovem a segurança ocupacional e ambiental tanto para a população de trabalhadores de postos de combustíveis quanto para a população do entorno.

Com isso, mesmo com os compostos estando abaixo das concentrações estabelecidas, não se pode descartar a possibilidade de um risco ocupacional e ambiental tanto para a população de trabalhadores quanto para a população em geral, não exposta

ocupacionalmente, que transita ou reside no entorno dos postos de combustíveis avaliados. O risco da exposição se configura pelo espalhamento dos vapores de BTEX no entorno do estabelecimento em várias direções definidas pela direção do vento e as características do local. Segundo Carrieri et al.³⁵, a população em geral se expõe ambientalmente devido à volatilização dos solventes presentes na gasolina oriunda tanto dos postos de combustíveis, durante o abastecimento de tanques e veículos, quanto das emissões veiculares, o que acaba por gerar uma difusão universal.

Considerando a população total de trabalhadores dos postos de combustíveis avaliados, o único indicador biológico que apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos masculino e feminino foi a atividade enzimática da CAT, juntamente com os dados de tempo de trabalho em posto, tempo de trabalho na atual função e idade. A diferença da CAT entre os grupos masculino e feminino permanece quando os dados da avaliação biológica dos trabalhadores são comparados entre os diferentes postos de combustíveis (Tabela 4) e entre as funções de trabalho (Tabela 5), sendo a atividade enzimática maior no grupo de mulheres. Essa maior atividade da CAT no grupo feminino não parece ter relação com as diferentes concentrações de BTEX no ar atmosférico dos postos, pois essa diferença significativa se mantém em todos os postos estudados e nas funções de trabalho. Contrariamente aos resultados observados no atual estudo, Góth³⁶ encontrou média da atividade da CAT menor no grupo de mulheres quando comparada ao grupo de homens. Um fator importante que deve ser levado em consideração é o fato de mulheres possuírem tendência a ter taxas cardiovascular, respiratória e metabólica menor quando comparadas aos homens, tornando-as menos vulneráveis aos efeitos das EROs³⁷.

Além disso, uma diferença significativa foi observada entre os postos de menor concentração de BTEX (1 e 2) e os postos de maior concentração (3, 4 e 5), sendo a atividade da CAT menor nestes últimos. Essa depleção da atividade da CAT pode ter ocorrido devido à saturação enzimática com o aumento da exposição aos BTEX e, conseqüentemente, de seus metabólitos. Entretanto, estudos em humanos comparando a atividade enzimática da CAT de populações expostas e entre homens e mulheres, além de escassos, possuem resultados controversos e não conclusivos, necessitando-se ainda de mais estudos nessa área³⁶⁻³⁸.

Com relação aos outros indicadores biológicos, além da atividade enzimática da CAT, o ensaio cometa também foi sensível às variações de concentração de BTEX nos diferentes postos de combustíveis. Trabalhadores masculinos alocados nos

Postos 1 e 2, expostos às menores concentrações de benzeno no ar identificadas neste estudo, apresentaram maiores danos no material genético quando comparados aos trabalhadores masculinos alocados no Posto 3, um dos postos com maior concentração de benzeno no ar. Por sua vez, esses mesmos trabalhadores do Posto 3 apresentaram dano no material genético estatisticamente menores quando comparados aos trabalhadores do Posto 5. Essa mesma oscilação nos resultados do teste de ensaio cometa também pode ser observada para o grupo feminino. Esses resultados indicam o efeito genotóxico precoce da exposição ocupacional desses trabalhadores, ou seja, um aumento do dano genotóxico mesmo em menores concentrações, corroborando o fato de o Valor de Referência Tecnológico (1 ppm ou 3,19 mg.m⁻³) estabelecido para setores de atividade com benzeno não excluir risco à saúde³³.

É importante ressaltar que trabalhadores do Posto 5, com a maior concentração de benzeno no ar, apresentaram um elevado dano no material genético e uma baixa média de tempo de trabalho na atual função. Esse resultado chama atenção para uma possível influência do tempo recente de trabalho na atual função no aumento do dano genotóxico. Corroborando esse resultado, a análise de correlação apresentou correlação negativa entre o teste de ensaio cometa e o tempo de trabalho na atual função ($p = 0,031$, $R = -0,232$). Quando essa correlação foi controlada pela idade, houve aumento do coeficiente de correlação ($p = 0,009$, $R = -0,296$).

Evidências recentes mostram que os seres humanos metabolizam o benzeno de forma mais eficiente em baixas concentrações ambientais do que em altas concentrações, devido a um processo de saturação das enzimas de metabolização. Rappaport et al.³⁹, por meio da comparação de modelos cinéticos de duas vias metabólicas do benzeno, sugerem maior risco

de leucemia em baixos níveis ambientais de exposição. Confirmando essa suposição, Vlaanderen et al.⁴⁰ realizaram um estudo de metanálise por metarregressão com o objetivo de avaliar a curva dose-resposta benzeno e risco de leucemia, sendo indicado pelo modelo uma forma supralinear da curva dose-resposta na região de baixas doses de exposição ao benzeno. Provavelmente, esse resultado de maior risco de leucemia em baixas doses ocorre pelo benzeno ser mais eficientemente metabolizado em baixas concentrações, aumentando a produção de seus metabólitos reativos, que são hematotóxicos⁴¹⁻⁴⁴.

Dessa forma, uma possível explicação para os resultados de ensaio cometa encontrados neste estudo é a suposição de que trabalhadores dos postos de combustíveis com as concentrações mais baixas de benzeno e menor tempo de trabalho na atual função possam produzir metabólitos hematotóxicos

do benzeno em maior concentração e, conseqüentemente, um maior dano ao DNA seria causado pela exposição recente. Além disso, os resultados obtidos neste estudo estão na mesma faixa de resultados que demonstram um maior dano genotóxico em baixas concentrações de benzeno, em razão da forma supra-linear da curva dose-resposta a baixas doses.

A influência do tempo na atual função nos resultados observados neste estudo também pode ser explicada pelo fato de que lesões genômicas, após serem processadas pelo aparato enzimático celular de reparo do DNA, podem ser corrigidas, não formando quebras no DNA, o que impossibilitaria que essas lesões fossem observadas no teste de ensaio cometa tradicional empregado neste estudo¹⁸⁻¹⁹. Dessa forma, trabalhadores expostos a maiores concentrações de benzeno no ar atmosférico, como é o caso do grupo de trabalhadores do Posto 3, podem não ter apresentado maiores danos no DNA devido a menores concentrações dos metabólitos hematotóxicos do benzeno e ao reparo ocorrido no material genômico. Como os danos no DNA apresentados pelo teste de ensaio cometa são extremamente precoces e passíveis ainda de serem reparados, pode-se considerar que os danos evidenciados pelo ensaio cometa antecedem o dano hematológico, como desfecho.

As diferenças dos resultados genotóxicos podem ser melhor observadas quando comparadas às diferentes classificações de danos no DNA por ensaio cometa entre as populações dos diferentes postos de combustíveis. As Figuras 1a e 1b, para os grupos de trabalhadores masculino e feminino, respectivamente, mostram a oscilação da frequência de nucleóides da classe 0 (i.e., sem danos no DNA) e da frequência de nucleóides da classe 1 (com dano no DNA) com o aumento da concentração de benzeno nos postos de combustíveis.

É importante ressaltar que, apesar do benzeno destacar-se como o principal composto de relevância toxicológica presente nos solventes voláteis de postos de combustíveis, o dano no material genômico observado neste estudo não pode ser atribuído exclusivamente ao benzeno, levando-se em consideração a múltipla exposição desses trabalhadores. Além disso, não há estudos que comprovem a segurança ocupacional da múltipla exposição ao BTEX para populações de trabalhadores de postos de combustíveis.

Por fim, a GST corresponde a uma família de enzimas com diferentes localizações celulares, que também auxilia na resposta ao estresse oxidativo com a detoxificação de xenobióticos nocivos pela conjugação do grupamento GSH com substratos eletrofílicos, que podem ser endógenos ou metabólitos de xenobióticos provenientes da primeira etapa (reações de fase I) do processo de metabolização de

substâncias químicas realizado pelo organismo^{45,46}. A atividade enzimática da GST apresentou correlação negativa com o ensaio cometa ($p = 0,028$, $R = -0,228$) e correlação positiva com o tempo de trabalho na atual função ($p = 0,011$, $R = +0,278$). É importante ressaltar que a atividade da GST pode ser influenciada por indução enzimática devido ao longo tempo de metabolização desses compostos⁴⁶. Dessa forma, uma maior atividade da enzima de detoxificação GST pode contribuir para a diminuição das concentrações dos metabólitos reativos do benzeno, protegendo o material genético de danos oxidativos e levando a uma correlação negativa com o ensaio cometa. Entretanto, estudos que relacionam a exposição ao BTEX e a atividade enzimática da GST são poucos e não conclusivos, havendo necessidade de mais estudos nesta área.

Os resultados obtidos dos indicadores biológicos e dos dados ocupacionais dos 97 trabalhadores também foram comparados quanto às diferentes funções de trabalho relatadas: administrativa, frentista, borracheiro e lavador. A função de frentista apresentou diferença significativa entre os grupos masculino e feminino para todos os indicadores biológicos e para os dados ocupacionais. Além disso, no grupo feminino, as duas funções relatadas, que foram administrativa e frentista, apresentaram diferença significativa para o teste de ensaio cometa. Essa diferença observada entre o grupo de mulheres e não observada entre o grupo de homens pode estar relacionada às diferenças nas atividades de função inerentes ao gênero, pois mulheres na função administrativa dificilmente realizam atividades de frentista, o que foi relatado frequentemente para o gênero masculino, fazendo com que os homens na função administrativa se exponham mais que as mulheres.

Com relação ao conjunto total de trabalhadores masculinos e femininos, o único indicador biológico

que apresentou diferença entre as funções foi a atividade da CAT, sendo maior na função administrativa e menor nas funções de frentista e lavador. Esse resultado confirma uma diminuição da atividade da CAT com o aumento da exposição. A função de lavador, apesar de teoricamente apresentar uma menor exposição ao BTEX se comparada à função de frentista, possivelmente apresenta atividade laboral com maior frequência respiratória, o que colabora com o aumento da exposição. Entretanto, mais estudos em trabalhadores expostos a BTEX que analisem a atividade enzimática da CAT devem ser realizados.

As atividades que envolvem a exposição dos trabalhadores aos riscos decorrentes da exposição aos solventes presentes nos combustíveis, em especial ao benzeno presente na gasolina, representam grande preocupação para o campo da saúde do trabalhador. Além das atividades relacionadas ao armazenamento

e manuseio de líquidos inflamáveis serem classificadas como perigosas⁴⁸, a exposição crônica ao benzeno possui importante relevância toxicológica, sendo preconizado o monitoramento ambiental e biológico. Além disso, para a exposição ao benzeno, foi adotado o Valor de Referência Tecnológico (VRT) no lugar do Limite de Tolerância (LI), assumindo-se legalmente que, mesmo estabelecendo um valor ambiental em termos de vigilância sanitária, não se excluiu o risco causado à saúde dos trabalhadores expostos⁴⁹. Nesse contexto, todos os trabalhadores dos postos de combustíveis avaliados são considerados vulneráveis, principalmente os trabalhadores das funções frentista e borracheiro, cujas atividades impõem maior risco de exposição.

Os resultados deste estudo indicam que a exposição ao BTEX, e mais especificamente ao benzeno em baixas concentrações, contribui para o risco genotóxico à saúde humana. Entretanto, como limitação deste estudo, ressalta-se a utilização de um desenho transversal que capturou todas as informações para o trabalho em um mesmo período de tempo, de maneira que não se pode assumir aqui a indicação da causalidade. No entanto, apesar de suas limitações, esse desenho tem sido o mais utilizado em pesquisas com objetivos similares ao deste estudo^{2,17,23-25}, não sendo limitada, portanto, a comparabilidade de seus resultados.

Conclusões

A avaliação ambiental realizada neste estudo identificou concentrações de BTEX dentro dos valores permitidos pela legislação em todos os postos de combustíveis avaliados. Entretanto, os resultados do ensaio cometa apresentaram oscilação com o aumento da concentração de BTEX nos postos de combustíveis avaliados, sendo os danos genéticos maiores em trabalhadores alocados em postos com menores concentrações de benzeno no ar. Uma possível influência do recente tempo de trabalho na atual função nos resultados de danos no material genético também foi observada. Esses resultados da avaliação

biológica são coerentes com estudos recentes que indicam uma segunda via metabólica do benzeno e uma relação supralinear na curva dose-resposta para exposição a baixas doses da substância, o que possivelmente acarreta em sua maior metabolização e maior produção de metabólitos tóxicos. Sendo assim, os resultados deste trabalho sugerem que a exposição ao BTEX contribui para o risco genotóxico à saúde humana, mesmo em baixas concentrações. Porém, isso não significa que trabalhadores de postos de combustíveis expostos a maiores concentrações de BTEX no ar não sejam também levados ao adoecimento, havendo necessidade de mais estudos sobre o mecanismo da toxicidade hematopoiética do benzeno e dos demais hidrocarbonetos presentes na gasolina “e outros combustíveis”.

Além disso, não se deve descartar a possibilidade de um risco ambiental para a população do entorno dos postos de combustíveis, ainda que as concentrações de BTEX estejam dentro dos limites legais estabelecidos em um raio de aproximadamente 200 m. Por sua vez, mesmo com o benzeno destacando-se como o principal composto de relevância toxicológica em razão de seus efeitos carcinogênicos à saúde humana, o dano no material genético observado neste estudo não pode ser atribuído exclusivamente à substância, levando-se em consideração a múltipla exposição a que os trabalhadores de postos de combustíveis estão submetidos.

Por isso, identificar um biomarcador precoce em relação às alterações hematológicas e sensível em diferentes condições é de grande importância para a saúde do trabalhador. Desse modo, a utilização de técnicas mais sensíveis, que utilizem enzimas endonucleases, capazes de clivar o DNA nos pontos de formação da oxidação, pode ser uma possível abordagem para o monitoramento biológico de populações expostas. Portanto, estudos que contemplem o monitoramento biológico de populações expostas devem continuar sendo realizados, assim como estudos de elucidação dos mecanismos de ação do benzeno e dos demais hidrocarbonetos presentes na gasolina e no organismo humano.

Contribuições de autoria

Costa-Amaral IC, Carvalho LVB, Pimentel JNS, Vieira JA, Castro VS, Borges RM, Nogueira SM, Tabalipa MM, Otero UB, Oliveira KMPG, Corrêa SM, Fonseca ASA, Alves SR, Moreira JC, Peres F e Menezes MAC contribuíram substancialmente no projeto, levantamento, análise e interpretação dos dados. Costa-Amaral IC, Teixeira LR, Mattos RCOC, Sarcinelli PN e Larentis AL participaram da elaboração do manuscrito e contribuíram na revisão crítica. Costa-Amaral IC, Alves SR, Mattos RCOC, Teixeira LR, Sarcinelli PN e Larentis AL participaram da aprovação final da versão a ser publicada.

Referências

- Osterreicher-Cunha P, Vargas Jr. EA, Guimarães JRD, Campos TM, Nunes CMF, Costa A, et al. Evaluation of bioventing on a gasoline-ethanol contaminated undisturbed residual soil. *J Hazard Mater.* 2004;110(1-3):63-76.
- Tunsaringkarn T, Siritwong W, Rungsiyothin A, Nopparatbundit S. Occupational exposure of gasoline station workers to BTEX compounds in Bangkok, Thailand. *Int J Occup Environ Med.* 2012;3(3):117-25.
- Okumura LL, Stradiotto NR. Simultaneous determination of neutral nitrogen compounds in gasoline and diesel by differential pulse voltammetry. *Talanta.* 2007;72(3):1106-13.
- Brasil. Ministério de Minas e Energia. Empresa de Pesquisa Energética. Balanço Energético Nacional 2014: relatório síntese – ano base 2013. Rio de Janeiro: EPE; 2014.
- Brasil. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Portaria nº 309, de 27 de dezembro de 2001. Estabelece as especificações para a comercialização de gasolinas automotivas no Brasil. *Diário Oficial da União.* 28 dez 2001.
- World Health Organization. Environmental Health Criteria; 214. Human exposure assessment. International Programme on Chemical Safety. Geneva: WHO; 2000.
- International Agency for Research on Cancer. Some industrial chemicals and dyestuffs. *Iarc Monogr Eval Carcinog Risk Chem Hum.* 1982;29:1-398.
- American Conference of Governmental Industrial Hygienist. Threshold limit values for chemicals substances and physical agents and biological exposure indices. Cincinnati, Ohio: ACGIH; 2003.
- Tsitou P, Heneweer M, Boogaard PJ. Toxicogenomics in vitro as an alternative tool for safety evaluation of petroleum substances and PAHs with regard to prenatal developmental toxicity. *Toxicol In Vitro.* 2015;29(2):299-307.
- Brasil. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Portaria nº 72, de 26 de abril de 2000. Regulamenta os procedimentos a serem observados pelo distribuidor de combustíveis derivados de petróleo, álcool combustível, biodiesel, mistura de óleo diesel/biodiesel especificada ANP e outros combustíveis automotivos para aquisição de gasolina automotiva, óleo diesel e óleo combustível para turbina elétrica, do produtor. *Diário Oficial da União* 27 abr 2000.
- Brasil. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. Portaria nº 40, de 25 de outubro de 2013. Regulamento técnico. *Diário Oficial da União* 25 out 2013.
- Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 776, de 28 de abril de 2004. Dispõe sobre a regulamentação dos procedimentos relativos à vigilância da saúde dos trabalhadores expostos ao benzeno, e dá outras providências. *Diário Oficial da União* 29 abr 2004.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Ações de Planejamento Estratégicas. Risco químico: atenção à saúde dos trabalhadores expostos ao benzeno. Brasília: Ministério da Saúde; 2006. p. 48.
- Meek MEB, Klaunig JE. Proposed mode of action of benzene-induced leukemia: Interpreting available data and identifying critical data gaps for risk assessment. *Chem Biol Interact.* 2010;184(1-2):279-85.
- Hays SM, Pyatt DW, Kirman C, Aylward L. Biomonitoring Equivalents for benzene. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2012;62(1):62-73.
- Yoon BI, Li GX, Kitada K, Kawasaki Y, Igarashi K, Kodama Y, et al. Mechanism of action of benzene toxicity: cell cycle suppression in hemopoietic progenitor cells (CFU-GM). *Exp Hematol.* 2001;29(3):278-85.
- Moro AM, Charão MF, Brucker N, Durgante J, Baierle M, Bubols G, et al. Genotoxicity and oxidative stress in gasoline station attendants. *Mutat Res.* 2013;754(1-2):63-70.
- Azqueta A, Collins AR. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. *Arch Toxicol.* 2013;87(6):949-68.
- Collins AR. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(2):794-800.
- Collins AR, Azqueta OA. Single-cell gel electrophoresis combined with lesion-specific enzymes to measure oxidative damage to DNA. *Methods Cell Biol.* 2012;112:69-92.
- Moura-Correa MJ, Jacobina AJR, Santos SA, Pinheiro RDC, Menezes MAC, Tavares AM, et al. Exposição ao benzeno em postos de revenda de combustíveis no Brasil: Rede de Vigilância em Saúde do Trabalhador (Visat). *Cienc Saúde Coletiva.* 2014;19(12):4637-48.
- Benites IC, Amado LL, Vianna RAP, Martino-Roth MG. Micronucleus test on gas station attendants. *Genet Mol Res.* 2006;5(1):45-54.
- Rosa JCF, Fiegenbaum M, Soledad AL, Claus MS, Nunes ADS, Cardoso VV. Cytogenetic evaluation and the association with polymorphisms the CPY1A1 and NR1I3 genes in individuals exposed to BTEX. *Environ Monit Assess.* 2013;185(7):5883-90.
- Trevisan P, Silva JN, Silva AP, Rosa RFM, Paskulin GA, Thiesen FV, et al. Evaluation of genotoxic effects of benzene and its derivatives in workers of gas stations. *Environ Monit Assess.* 2014;186(4):2195-204.
- Santiago F, Alves G, Otero UB, Tabalipa MM, Scherrer LR, Kosyakova N, et al. Monitoring of gas station attendants exposure to benzene, toluene, xylene (BTX) using three-color chromosome painting. *Mol Cytogenet.* 2014;7(1):15.

26. Mitri S, Fonseca ASA, Otero UB, Tabalipa MM, Moreira JC, Sarcinelli PN. Metabolic polymorphisms and clinical findings related to benzene poisoning detected in exposed brazilian gas-station workers. *Int J Environ Res Public Health*. 2015;12(7):8434-47.
27. Lacerda LP, Dantas EBS, Cerqueira GS, Peron AP, Sousa JMC. Occupational toxicology study emphasizing the citotoxic and mutagenic activity among workers exposed to gasoline. *Biotemas*. 2015;28(3):135-41.
28. Corrêa SM, Arbillia G, Marques MRC, Oliveira KMPG. The impact of BTEX emissions from gas stations into the atmosphere. *Atmos Pollut Res*. 2012;3(2):163-9.
29. Arbillia G; Martins EM, Oliveira KMPG; Gatti LV. Exposure to volatile organic compounds in an ethanol and gasoline service station. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2007;79(2):237-41.
30. Aebi H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol*. 1984;105:121-6.
31. Habig WH, Jakoby WB. Assay for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol*. 1981;77:398-405.
32. Pinto JC, Schwaab M. Análise de dados experimentais. Rio de Janeiro: E-papers; 2007.
33. Brasil. Ministério do Trabalho e Emprego. Portaria no 14, de 20 de dezembro de 1995. NR 15 – Atividades e operações insalubres. Anexo nº 13-A Benzeno. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil* 14 dez 1995.
34. Brasil. Ministério do Trabalho e Emprego. Portaria nº 3.214, de 6 de junho de 1978. NR 15 – Atividades e operações insalubres. Brasília, DF, 1978. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil* 6 jul 1978.
35. Carrieri M, Bonfiglioa E, Scapellatoa ML, Maccàa I, Tranfob G, Farandab P, et al. Comparison of exposure assessment methods in occupational exposure to benzene in gasoline filling-station attendants. *Toxicol Lett*. 2006;162(2-3):146-52.
36. Góth L. A simple method for determination of serum catalase activity and revision of reference range. *Clin Chim Acta*. 1991;196(2-3):143-51.
37. Amérand A, Vettier A, Moisan C, Belhomme M, Sébertet P. Sex-related differences in aerobic capacities and reactive oxygen species metabolism in the silver eel. *Fish Physiol Biochem*. 2010;36(3):741-7.
38. Tsuber V, Kadamov Y, Tarasenko L. Activation of antioxidant defenses in whole saliva by psychosocial stress is more manifested in young women than in young men. *PLoS One*. 2014;9(12):1-17.
39. Rappaport SM, Kim S, Lan Q, Vermeulen RCH, Waidyanatha S, Zhang L, et al. Evidence that humans metabolite benzene via two pathways. *Environ Health Perspect*. 2009;117(6):946-52.
40. Vlaanderen J, Portengen L, Rothman N, Lan Q, Kromhout H, Vermeulen R. Flexible meta-regression to assess the shape of the benzene-leukemia exposure-response curve. *Environ Health Perspect*. 2010;118(4):526-32.
41. World Health Organization. International Programme on Chemical Safety. Environmental Health Criteria 150: benzene. Geneva: Who; 1993.
42. Arnold SM, Angerer J, Boogaard PJ, Hughes MF, O'Lone RB, Robison SH, et al. The use of biomonitoring data in exposure and human health risk assessment: benzene case study. *Crit Rev Toxicol*. 2013;43(2):119-53.
43. Boogaard PJ. Biomonitoring of the workplace and environment. General, applied and systems toxicology. 3rd ed. Hoboken: Wiley; 2009. p. 2559-89.
44. Guliaev AB, Hang B, Singer B. Structural insights by molecular dynamics simulations into specificity of the major human AP endonuclease toward the benzene-derived DNA adduct, pBQ-C. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(9):2894-52.
45. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45:51-88.
46. Huber PC, Almeida WP, Fátima A. Glutathione e enzimas relacionadas: papel biológico e importância em processos patológicos. *Quim Nova*. 2008;31(5):1170-9.
47. Boušová I, Skálová L. Inhibition and induction of glutathione S-transferases by flavonoids: possible pharmacological and toxicological consequences. *Drug Metab Rev*. 2012;44(4):267-86.
48. Brasil. Ministério do Trabalho e Emprego. Portaria nº 3.214, de 6 de junho de 1978. NR 16 – Atividades e operações perigosas. *Diário Oficial da União* 6 jul 1978.
49. Arcuri ASA, Cardoso LMN. Acordo e legislação sobre o benzeno – 10 anos. São Paulo: Fundacentro; 2005.